Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Alteraciones sexo-específicas en sociabilidad y neuroinflamación en un modelo en ratón de autismo

Kazlauskas, Nadia

2017-03-17

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Kazlauskas, Nadia. (2017-03-17). Alteraciones sexo-específicas en sociabilidad y neuroinflamación en un modelo en ratón de autismo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Kazlauskas, Nadia. "Alteraciones sexo-específicas en sociabilidad y neuroinflamación en un modelo en ratón de autismo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-17.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Alteraciones sexo-específicas en sociabilidad y neuroinflamación en un modelo en ratón de autismo

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Nadia Kazlauskas

Directora de tesis: Dra. Amaicha Mara Depino
Consejera de estudios: Dra. Lidia Szczupak
Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET).

Buenos Aires, 2017
Fecha de defensa: 17 de marzo de 2017

Alteraciones sexo-específicas en sociabilidad y neuroinflamación en un modelo en ratón de autismo

El autismo es un desorden del desarrollo neural caracterizado por impedimentos en la interacción social, habilidades comunicativas reducidas y la presencia de comportamientos estereotipados o repetitivos. Estos síntomas típicamente aparecen durante los primeros años de vida, y pueden afectar hasta a 1 en 38 niños, con una incidencia entre tres y cuatro veces mayor en varones que en mujeres. Actualmente no se conoce una única causa del desorden, sino que se proponen múltiples agentes etiológicos. Estudios *postmortem* realizados en humanos han establecido un nexo entre autismo y neuroinflamación.

El objetivo general de esta tesis fue dilucidar el rol de la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central, particularmente la activación glial, en el desarrollo del autismo. Para ello utilizamos el modelo de administración prenatal de Ácido Valproico (VPA) en ratón. Encontramos que la exposición al VPA produce una disminución en la sociabilidad de los ratones macho adultos, pero no así de los ratones hembra. Además, las hembras VPA presentan micro y astrogliosis en el cerebelo, y una respuesta inflamatoria periférica exacerbada ante la administración de un estímulo inflamatorio. Sin embargo, dichas alteraciones no se encuentran presentes en los machos.

Dado que los síntomas del autismo aparecen de manera temprana durante la infancia, caracterizamos el estado inflamatorio periférico y central en el período postnatal y evidenciamos signos de alteraciones gliales tempranas en cerebelo e hipocampo entre el día postnatal (P) 21 y P35. Con el fin de evaluar el efecto directo de la inflamación postnatal en los niveles de sociabilidad de los animales, administramos un estímulo inflamatorio a lo largo de dicho período crítico.

Observamos que la inflamación postnatal afecta diferencialmente la interacción social en los ratones VPA, dependiendo del sexo de los mismos. Mientras las hembras ven reducidos sus niveles de sociabilidad, los machos restauran sus niveles normales.

Al estudiar los mecanismos moleculares mediante los cuales se encuentra actuando el VPA, encontramos una disminución en los niveles de acetilación de histonas en el cerebelo de animales P14. Dado que este fenómeno precede al período postnatal crítico, sugerimos que las alteraciones neuroinflamatorias observadas en el modelo podrían estar siendo guiadas por un mecanismo epigenético.

Los resultados aquí presentados evidencian efectos sexo-específicos del VPA sobre la sociabilidad y el estado inflamatorio de los animales, tanto central como periférico. Además, se demuestran efectos diferenciales de la inflamación postnatal sobre los comportamientos sociales de machos y hembras. Dado que la mayor parte de la investigación en modelos animales de autismo ha sido desarrollada en animales macho, consideramos que este trabajo puede ayudar en la comprensión de los síntomas particulares observados en las niñas autistas, y adicionalmente aportar evidencias sobre posibles mecanismos de resiliencia dentro de la población femenina.

Palabras clave: autismo, neuroinflamación, ácido valproico, modelo animal, sociabilidad, acetilación de histonas.

Sex-specific social and neuroinflammatory alterations in a mouse model of autism

Autism is a neurodevelopmental disorder characterized by impediments in social interaction, reduced communicative skills and the presence of stereotyped or repetitive behaviors. These symptoms typically appear during the first years of childhood, and can affect 1 in 38 children. Remarkably, incidence is three to four times higher in boys than in girls. Although many factors have been implicated in this disorder, the exact underlying causes are still unclear. Postmortem studies performed in humans have established a link between autism and neuroinflammation.

The general aim of this thesis was to elucidate the role of the central nervous system inflammatory response, glial activation in particular, in autism development. To do this, we used the Valproic Acid (VPA) prenatal administration mouse model. We found that VPA exposure produces decreased sociability in adult male mice, but not in females. Besides, we have found that adult female mice show increased micro and astroglial cell density in the cerebellum, and an exacerbated peripheral inflammatory response upon the administration of an inflammatory stimulus. However, these alterations are not present in male mice.

Given that autism symptoms appear early in childhood, we characterized the peripheral and neuroinflammatory state along the postnatal period and found early signs of glial activation in the cerebellum and hippocampus between postnatal day (P) 21 and P35. To further explore the direct effect of postnatal inflammation on sociability, we administered an inflammatory stimulus during this critical period. We found that eliciting postnatal inflammation produces distinct behavioral outcomes depending on sex. While female mice show reduced sociability, male mice restore their normal social levels.

When studying the molecular mechanisms behind VPA effects, we found a decrease in histone acetylation levels in the cerebellum of P14 animals. Given that this phenomenon precedes the postnatal critical period, we suggest that the

neuroinflammatory alterations present in our model could be guided by an epigenetic mechanism.

The results presented here evidentiate VPA sex-specific effects on mice sociability and on the peripheral and neuroinflammatory state. Additionally, we have proven differential effects of postnatal inflammation on social behavior in male and female VPA mice. Given that most of the research on animal models of autism has been conducted in male subjects, we consider that this work could help understand the particular symptoms observed in autistic girls, and also contribute with evidences of possible resiliency mechanisms in the female population.

Keywords: autism, neuroinflammation, valproic acid, animal model, sociability, histone acetylation.

Publicaciones

Los resultados mostrados en esta tesis han sido incluidos total o parcialmente en las siguientes publicaciones:

Trabajos publicados

Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid.

N. Kazlauskas, M. Campolongo, L. Lucchina, C. Zappala, A. Depino.

Psychoneuroendocrinology 2016 Oct; 72:11-21. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2016.06.001. Epub 2016 Jun 7.

Trabajos en preparación

Sex-specific effects of VPA on behavior and neuroinflammation: relevance for susceptibility and resilience in autism.

N. Kazlauskas, M. Campolongo, A. Seiffe, A. Depino.

A postnatal inflammatory event affects female mouse sociability in animals prenatally exposed to VPA.

N. Kazlauskas, M. Campolongo, C. Zappala, A. Depino.

Capítulos de libros

Neuroinflammation in animal models of autism.

N. Kazlauskas, M. Robinson-Agramonte, A. Depino.

Capítulo del libro “Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder” publicado por Springer International Publishing en enero de 2015. ISBN: 978-3-319-16320-8

Abreviaturas

ANOVA = *Analysis of Variance*, análisis de la varianza

BHE = Barrera Hematoencefálica

GD = Día Gestacional

GD = Giro Dentado

GFAP = *Glial fibrillary acidic protein*, proteína ácida fibrilar glial

HDAC = *Histone deacetylases*, deacetilasa de histonas

HPA = Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal

IBA1 = *Anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1*, enzima de unión a calcio 1

IF = Inmunofluorescencia

IL-x = Interleuquina x

Ip = Intraperitoneal

IS = Interacción Social

LNS = Lado No Social

LPS = Lipopolisacárido

LS = Lado Social

MIA = *Maternal immune activation*, activación inmune materna

P = Día Postnatal

PAMPs = *Pathogen-associated molecular pattern*, patrones moleculares asociados a patógenos

PB = Buffer Fosfato

PBS = Buffer Fosfato Salino

PFA = Paraformaldehído

PPA = Ácido Propiónico

RIA = Radioinmunoensayo

SEM = *Standard Error of the Mean*, error standard de la media

SNC = Sistema Nervioso Central

TBS = Buffer Tris Salino

TEA = Trastornos del Espectro Autista

TLRs = Receptores Toll

Tx = Detergente Tritón x-100

USVs = Vocalizaciones Ultrasónicas

VPA = Ácido Valproico

Índice

1. Introducción general 14

1.1 Trastornos del Espectro Autista (TEA) 14
1.2 Etiología 15
1.2.1 Factores genéticos 16
1.2.2 Factores ambientales 17
1.3 Respuesta inmunológica 19
1.3.1 Citoquinas 20
1.4 Neuroinflamación 21
1.4.1 Células gliales 22
1.5 Interacción entre sistema inmune y sistema nervioso 28
1.5.1 Alteraciones en pacientes con TEA 30
1.6 Modelos animales de TEA 32
1.6.1 Modelos inflamatorios de TEA 35
1.6.2 Modelos genéticos de TEA 38
1.6.3 Combinación de modelos genéticos e inflamatorios 40
1.6.4 Modelos ambientales no inflamatorios de TEA: modelo VPA 41
1.6.4.1 Antecedentes de nuestro laboratorio 43
1.7 Epigenética 44
1.7.1 Epigenética y VPA 47

Hipótesis y objetivos 50

2. Materiales y métodos 52

2.1 Animales 52
2.1.1 Obtención de los animales experimentales 52
2.2 Tratamiento prenatal 54
2.3 Tratamientos postnatales 54
2.4 Análisis comportamentales 56
2.4.1 Test de Interacción Social (Social Interaction) 57
2.4.2 Test de Auto-acicalamiento (Self-Grooming) 57

2.4.3 Test de Campo Abierto (Open Field) 58
2.5 Análisis histológico 58
2.5.1 Procesamiento de los tejidos 58
2.5.2 Inmunofluorescencia 60
2.5.3 Obtención y análisis de imágenes 62
2.6 Radioinmunoensayo 65
2.7 Análisis epigenético 67
2.7.1 Extractos enriquecidos en histonas 67
2.7.2 Western Blot 67
2.8 Análisis estadístico 68

3. Caracterización de los efectos del VPA sobre el estado inflamatorio y sobre el comportamiento social en machos y hembras adultos 71

3.1 Interacción Social 72
3.2 Respuesta inflamatoria periférica 73
3.3 Neuroinflamación 77
3.3.1 Corteza prefrontal 78
3.3.2 Hipocampo 79
3.3.3 Cerebelo 81
3.4 Discusión y conclusiones 85

4. Caracterización del estado inflamatorio central y periférico durante el período postnatal 88

4.1 Respuesta inflamatoria periférica 89
4.2 Neuroinflamación 91
4.2.1 Corteza prefrontal 91
4.2.2 Hipocampo 92
4.2.3 Cerebelo 99
4.3 Período crítico en animales macho 103
4.3.1 Respuesta inflamatoria periférica 103
4.3.2 Neuroinflamación 105
4.4 Discusión y conclusiones 107

5. Efectos de un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre el estado inflamatorio y los comportamientos relacionados con el autismo 111

5.1 Exposición a un único evento inflamatorio 111
5.2 Exposición prolongada al estímulo inflamatorio 113
5.2.1 Interacción social 116
5.2.2 Autoacicalamiento 119
5.2.3 Ensayo de campo abierto, locomoción en un medio novedoso 120
5.2.4 Respuesta inflamatoria periférica 123
5.2.5 Neuroinflamación 126
5.3 Discusión y conclusiones 137

6. Mecanismo de acción del VPA 142

6.1 Acetilación de histonas 143
6.2 Acetilación durante el período postnatal 143
6.3 Discusión y conclusiones 146

7. Discusión general 149

7.1 Recapitulación de los resultados obtenidos en esta tesis 149
7.2 ¿Por qué estudiar hembras? 150
7.3 Alteraciones sexo-específicas 152
7.4 Susceptibilidad masculina VS resiliencia femenina 154
7.4.1 Dimorfismo sexual: eje HPA 156
7.4.2 Dimorfismo sexual: respuesta inmune periférica 157
7.4.3 Dimorfismo sexual: neuroglía en el desarrollo 159
7.5 Posible rol protector de la neuroinflamación 162
7.6 Modelo propuesto 166

8. Bibliografía 169

1

Introducción General

1. Introducción general

1.1 Trastornos del Espectro Autista (TEA)

El psiquiatra austríaco Leo Kanner sentó las bases del estudio del autismo en el año 1943, cuando realizó una descripción detallada de 11 niños señalando las particularidades del síndrome (Kanner, 1943). En la actualidad, a través del término "autismo" usualmente se hace referencia a un grupo de desórdenes denominados Trastornos del Espectro Autista (TEA), que según el Manual Estadístico de Diagnóstico (DSM) - 5 se encuentran catalogados dentro de los Trastornos del Neurodesarrollo.

El autismo es un desorden severo del desarrollo neural que se encuentra principalmente caracterizado por un impedimento sostenido en la interacción social, reducción en las habilidades de comunicación verbal y no verbal, y por la presencia de patrones estereotipados o restrictivos en el comportamiento y en los intereses (Chakrabarti y Fombonne, 2005; Fombonne, 2005). Estos síntomas pueden combinarse de maneras altamente variables, aparecen típicamente dentro de los primeros años de vida y el síndrome se manifiesta completamente a alrededor de los 4 años de edad (American Psychiatric Association, 2000; World Health Organization, 1994).

En el año 2009 el autismo afectaba a 1 de cada 100-200 niños nacidos (Baron-Cohen et al., 2009; Centers for Disease Control and Prevention, 2009), dependiendo del país de nacimiento. Sin embargo, en años recientes el número de niños diagnosticados ha ido en aumento, llegando a valores de hasta 1 en 38 (Kim et al., 2011; Zablotsky et al., 2015), y convirtiéndola en una de las enfermedades con más alta incidencia en niños en los países desarrollados. Es importante remarcar que estos reportes indican que la incidencia es entre tres y cuatro veces mayor en niños que en niñas.

Se debate si este aumento en la prevalencia se debe a un aumento en la

frecuencia del desorden o a un mejoramiento en el diagnóstico debido a la mayor conciencia sobre la enfermedad, pudiendo llegar también a estar teniendo lugar un sobre-diagnóstico (Fombonne, 2008; Wing y Potter, 2002). Sin embargo, los estudios más conservadores concluyen que existe un aumento real, aunque tal vez menor al reportado. Aunque las terapias de estimulación temprana han resultado en el mejoramiento de algunos de los síntomas del autismo, no existen tratamientos médicos para este desorden. Una de las principales causas para la falta de desarrollo de tratamientos eficientes es lo poco que se conoce acerca de la etiología y neuropatología de la enfermedad.

1.2 Etiología

Los TEA son clínicamente heterogéneos, y en alrededor del 10% de los pacientes pueden estar asociados con desórdenes genéticos y neurológicos tales como los síndromes de Rett, Down y del Frágil X, o la Esclerosis Tuberosa. 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 (Pardo y Eberhart, 2007).

Si bien diversas evidencias sugieren fuertemente un componente heredable en la etiología del autismo, los estudios orientados a vincular mutaciones individuales con el autismo han fracasado (Wassink et al., 2004). En cambio, hoy existe consenso acerca de la existencia de una multiplicidad de genes que confieren susceptibilidad y que están influenciados tanto por sus interacciones con otros genes como por interacciones con el ambiente. Así, varios estudios han proporcionado evidencias que sugieren que los TEA son desórdenes biológicos con etiologías genéticas y no genéticas, provocados por un proceso patofisiológico que surge de la interacción de un perjuicio ambiental con una predisposición genética a la enfermedad.

En resumen, entre los distintos agentes que contribuyen a la etiología de este desorden se encuentran factores ambientales, genéticos y epigenéticos (Persico y

Bourgeron, 2006); pero más importante aún parecen ser las interacciones que puedan surgir entre todos ellos.

1.2.1 Factores genéticos

Si bien ha sido mencionado que los estudios dirigidos a encontrar causas genéticas simples han fracasado, existen evidencias que sugieren que el desorden es heredable. Mientras que la tasa de concordancia para personas con TEA reportada a partir de poblaciones de gemelos dicigóticos (mellizos) varía entre el 0 y el 37%, la de los gemelos monocigóticos varía entre el 44 al 91% (Steffenburg et al., 1989; Bailey et al., 1995; Constantino y Todd, 2000; Kates et al., 2004). Sumado a la heredabilidad observada en los gemelos, el riesgo de que un hermano de un paciente con TEA desarrolle también el desorden es 25 veces mayor que para la población general (Jorde et al., 1991). Todo esto sugiere que la composición genética puede contribuir como un factor de riesgo para el desarrollo del desorden.

Sin embargo serían múltiples genes los involucrados, y estos a su vez variarían entre individuos y grupos familiares. Hoy en día se cuenta con una amplia lista de genes candidatos asociados a los TEA, generada a través de estudios de asociación genética, detección de variación del número de copias y análisis de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) (Abrahams y Geschwind, 2008). Entre ellos podemos mencionar RELN (Skaar et al., 2004), SHANK3 (Moessner et al., 2007), NLGN3 y NLGN4X (Jamain et al., 2003), MET (Campbell et al., 2008), GABRB3 (Buxbaum et al., 2002), OXTR (Wu et al., 2005), MeCP2 -responsable del síndrome de Rett- (Swanberg et al., 2008), FMR1 -responsable del síndrome de frágil X- (Belmonte y Bourgeron, 2006), y TSC1 o TSC2 -responsables de la esclerosis tuberosa- (Wiznitzer, 2004). Entre los genes candidatos, varios desempeñan roles en el funcionamiento inmunológico, como por ejemplo en la regulación de la interleuquina (IL) 12, producción de células mieloides y cambios del fenotipo de macrófagos de perfil M1 al perfil M2 (Fukao et al., 2002).

No obstante, la combinación de todos los factores genéticos mencionados sólo

puede explicar entre el 10 y el 20% de los casos de TEA (Abrahams y Geschwind, 2008). Esto, sumado a que varios de los factores de riesgo genético pueden hallarse también en individuos que no padecen TEA, sugiere que la composición genética puede aumentar el riesgo de desarrollar el desorden, pero que se requiere de factores de riesgo adicionales para que se produzca su manifestación.

1.2.2 Factores ambientales

En la sección anterior hemos hecho mención a varios trabajos que sugieren la existencia de un componente heredable como causa del autismo. Sin embargo, un amplio estudio realizado con gemelos sugiere que la heredabilidad juega un rol relativamente pequeño, y se centra en el rol fundamental del ambiente pre y postnatal compartido (Hallmayer, 2011). Teniendo en cuenta que los primeros síntomas del autismo surgen al final del primer año de vida, y que los gemelos comparten el ambiente durante este período, algunos de los factores ambientales podrían estar impactando durante un período crítico sobre un contexto genético susceptible a desarrollar TEA.

En esta línea, recientemente se han aumentado los esfuerzos en favor del estudio de los factores ambientales que contribuyen a la etiología de los TEA (Berg, 2009), y cómo estos factores pueden interactuar con ciertos alelos durante un período crítico del desarrollo. Así han sido postulados diversos factores ambientales en la patogénesis del autismo. Estudios epidemiológicos sugieren un aumento en la tasa de esta enfermedad en regiones geográficas particulares (Gillberg, 1983), asociado a la edad de los padres (Gardener et al., 2009), al bajo peso al nacer (Schendel y Bhasin, 2008), a nacimientos múltiples (Hallmayer et al., 2002), a nacimientos en determinadas estaciones (Stevens et al., 2000), y relacionado con factores virales y/o inmunológicos (Licinio et al., 2002; Singh, 1996).

Al mismo tiempo, se han propuesto una gran variedad de factores o contaminantes ambientales como agentes etiológicos, como por ejemplo metales

pesados -plomo, mercurio, cadmio y arsénico (Landrigan, 2010)-, insecticidas (Roberts et al., 2007), ftalatos utilizados en plásticos y cosméticos (Larsson et al., 2009), y productos de limpieza como jabones antibacterianos (Becker, 2007).

La exposición *in utero* a agentes teratogénicos como la talidomida, un medicamento contra las náuseas utilizado por mujeres embarazadas entre 1957 y 1962, también ha sido señalado como factor de riesgo (Moore et al., 2000; Stromland et al., 2008). Un estudio reveló que alrededor del 30% de los niños expuestos a talidomida entre los días 20 y 24 de gestación desarrollaron TEA (Stromland y Miller, 1993; Stromland et al., 1994). Este es el momento en que se producen el cierre del tubo neural y el desarrollo de las primeras neuronas.

En esta misma línea, otro de los agentes medioambientales más estudiados como factor de riesgo es el ácido valproico (VPA). El VPA es un ácido graso utilizado como medicina anticonvulsiva y estabilizador del humor, principalmente como tratamiento para la epilepsia y el desorden bipolar. Al ser ingerido durante el primer trimestre del embarazo puede ocasionar el llamado “síndrome de valproato fetal”. Este síndrome se encuentra caracterizado por anormalidades fenotípicas en el rostro, problemas de desarrollo y, ocasionalmente, anormalidades respiratorias y cardiovasculares, entre otras. Curiosamente, muchos de estos niños también presentan un fenotipo conductual similar al observado en el autismo, con problemas en el habla y el lenguaje, intereses restringidos y comportamientos repetitivos, además de una disminución en la interacción social (Williams et al., 2001). Esto sugiere una conexión entre el desarrollo de los TEA y la exposición prenatal a este teratógeno.

El significativo aumento del riesgo de que niños expuestos a VPA durante la gestación desarrollen posteriormente TEA fue confirmado en un estudio poblacional realizado por Christensen et al. (2013). En este mismo estudio se sugieren mecanismos de acción del VPA, como ser una posible interferencia en la función de neurotransmisores, apoptosis neuronal, modificación de la plasticidad, inhibición de deacetilasas de histonas e interrupción del metabolismo del ácido fólico (Christensen et al., 2013).

Por otro lado, se ha mostrado la asociación entre brotes de enfermedades virales como la rubéola y un aumento en la incidencia de autismo (Hornig y Lipkin,

2001; Patterson, 2008), así como la exposición prenatal a diferentes virus, incluido el herpes simple (DeLong et al., 1981; Ghaziuddin et al., 1992; Gillberg 1986; Greer et al., 1989), citomegalovirus (Ivarsson et al., 1990; Markowitz 1983; Stubbs 1978), viruela (Ring et al., 1997; Singh y Jensen 2003) y meningitis viral (Ring et al., 1997). Adicionalmente, un amplio estudio mostró el aumento en la prevalencia de autismo en niños nacidos de madres expuestas a infecciones virales durante el primer trimestre de embarazo, o a infecciones bacterianas durante el segundo (Atladottir et al., 2010). Todo esto sugiere una base inmunológica o infecciosa en la etiología y/o desarrollo de la enfermedad (Hornig y Lipkin, 2001). En particular, la infección viral materna ha sido citada como la principal causa no-genética del autismo (Ciaranello y Ciaranello, 1995).

Ante una infección materna, la respuesta inflamatoria desencadenada podría inducir inflamación en la placenta e incluso en el feto (Stolp y Dziegielewska, 2009). Sin embargo, esto podría ocurrir también por la acción de factores medioambientales, como la exposición a una determinada sustancia, o debido a alteraciones genéticas.

Hoy en día es sabido que el sistema inmune puede afectar el funcionamiento del sistema nervioso central (SNC), y que éste puede a su vez regular la función inmune tanto mediante vías neuronales como hormonales (revisado en Besedovsky y Rey, 2007). Además, en el caso de desórdenes del desarrollo neural, como es el caso de los TEA, el sistema inmune podría estar afectando no sólo el funcionamiento del SNC sino también su desarrollo, resultando en alteraciones a largo plazo que den cuenta de los síntomas del desorden (revisado en Patterson, 2002).

Dado que los TEA son un grupo de desórdenes extremadamente heterogéneos, podríamos relacionar este hecho directamente con la gran diversidad de factores ambientales de riesgo aquí mencionados. No obstante, más allá de la diversidad de potenciales factores etiológicos, todos ellos podrían converger en un mismo mecanismo subyacente, afectando por ejemplo las mismas vías de señalización y ocasionando así los síntomas centrales de los TEA.

1.3 Respuesta inmunológica

El sistema inmunológico que poseen los mamíferos les permite defenderse de agentes externos. Ante una lesión o tras la invasión de un patógeno es desencadenada la respuesta inmune. En una primera instancia, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) tales como lipopolisacáridos, peptidoglicanos o ácidos nucleicos, son reconocidos por receptores Toll (TLRs) presentes en las células del sistema inmune innato, activando la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. Esta respuesta generalizada es denominada inflamación y se encuentra guiada por macrófagos, células dendríticas y leucocitos, que son concentradas en el tejido infectado a través del torrente sanguíneo, creando un foco inflamatorio (Roitt, 1988). Además de aislar y eliminar al agente infeccioso, se repara el tejido dañado, ya que se proveen factores de crecimiento necesarios para iniciar este proceso (Simpson y Ross, 1972).

La segunda línea de defensa del organismo está constituida por la respuesta inmune adaptativa, dada por el reconocimiento específico de antígenos por parte de los linfocitos T y B. La capacidad de responder de manera específica se mantiene a través del tiempo gracias a las células de memoria, quienes permiten una rápida eliminación del patógeno ante una segunda infección.

Tras la eliminación del patógeno y la reparación de los tejidos, las respuestas inflamatorias suelen extinguirse. Sin embargo, si el estímulo persiste en el tiempo, o ante una desregulación de la respuesta, la inflamación puede tornarse crónica o llevar a una enfermedad autoinmune, con efectos nocivos para el organismo.

Ambas respuestas no son independientes entre sí, sino que se encuentran acopladas. Por un lado, los macrófagos y células dendríticas son quienes actúan como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T; y, además, las citoquinas secretadas por las células de la inmunidad innata pueden activar la respuesta adaptativa (Medzhitov y Janeway, 2000). Estas moléculas son los principales mediadores en respuestas inmunológicas e inflamatorias.

1.3.1 Citoquinas

Bajo este término suelen agruparse un variado número de proteínas de bajo peso molecular (5-20 kDa), tales como quimioquinas, interferones e interleuquinas. Estas moléculas son expresadas por una gran variedad de tipos celulares, principalmente leucocitos, linfocitos y macrófagos, y participan en numerosos procesos biológicos. Poseen la propiedad de pleiotropía, es decir que pueden presentar múltiples efectos sobre diferentes tipos celulares. Además, interactúan entre sí de maneras complejas, ya que dependiendo de qué citoquinas se encuentren presentes en el medio pueden darse efectos redundantes, sinérgicos, y antagónicos.

Las citoquinas son especialmente importantes en el sistema inmune, ya que modulan el balance entre las respuestas humoral y celular; regulan la maduración y crecimiento de poblaciones celulares específicas y la reparación tisular (Schmitz y Chew, 2008). Sin embargo, estas moléculas y sus receptores son también expresados en células del SNC como ser neuronas, células gliales y endoteliales, que pueden secretarlas dentro del parénquima cerebral, junto con linfocitos y macrófagos infiltrados desde la periferia, generando efectos sobre el funcionamiento y desarrollo del cerebro (Hopkins y Rothwell, 1995).

1.4 Neuroinflamación

La entrada de células inmunes y sus mediadores al cerebro se encuentra limitada por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), una estructura formada por uniones estrechas de células endoteliales alrededor de los capilares que separa la sangre circulante del fluido extracelular cerebral.

Por esta razón se consideró durante mucho tiempo que el SNC contaba con un estado de inmunoprivilegio: aislado de anticuerpos, células inmunes y sus moléculas de señalización provenientes de la circulación sistémica (Muldoon et al., 2013). Este

concepto surgió principalmente por la aparente segregación entre las respuestas inmunes llevándose a cabo en el cerebro y en la periferia (Keane y Hickey, 1998; Wilson et al., 2010; Engelhardt y Sorokin, 2009). La falta de células dendríticas residentes capaces de activar una respuesta adaptativa, sumado al ambiente antiinflamatorio del tejido neural, promueven procesos inmunológicos atenuados, retrasados o incluso ausentes dentro del SNC (Ransohoff y Brown, 2012).

Actualmente, este concepto ha sido redefinido, debido a numerosas evidencias que muestran la existencia de procesos inflamatorios e inmunológicos en el sistema nervioso, regulados de manera estricta (Muldoon et al., 2013). Estas respuestas pueden ser mediadas por células de inmunidad innata específicas del SNC, como los astrocitos y las células microgliales. Estas células gliales también pueden interactuar con células infiltradas del sistema inmune innato periférico.

1.4.1 Células gliales

Las células gliales primordiales aparecieron de manera temprana en la evolución. El desarrollo de masas neuronales compactas probablemente estimuló la aparición de células de soporte, capaces de controlar la homeostasis extracelular y proveer sostén metabólico. La evolución de un sistema nervioso centralizado también llevó a su aislamiento del resto del cuerpo a través de la BHE, formada en un primer momento exclusivamente por células gliales. A su vez, el aumento del tamaño corporal de los animales suscitó la necesidad de un aumento en la velocidad de propagación eléctrica a través de los axones, para permitir la correcta comunicación entre la periferia y los órganos neurales centralizados. Esta presión de selección llevó a la aparición de la mielina, provista por los oligodendrocitos y las células de Schwann. La aparición evolutiva de estas células determinó el ulterior desarrollo del SNC. Por otro lado, además, el aislamiento del tejido nervioso requirió su propio mecanismo de defensa: células inmunes de los bivalvos, crustáceos e insectos invadieron el ganglio neural formando la microglía ancestral (Kettenmann y Verkhratsky, 2013).

Las células gliales fueron originalmente descritas como tejido conectivo (Virchow, 1858) y pueden clasificarse en macroglía, células de origen embrionario ectodérmico al igual que las neuronas; y la microglía, células de origen mieloide (mesodérmico). La neuroglía ha alcanzado su máximo desarrollo en los mamíferos, incrementando tanto su número como su complejidad. Estas células cumplen importantes roles en el funcionamiento neuronal y la homeostasis, además de participar en los procesos inflamatorios e inmunológicos del sistema nervioso. Se encuentran involucradas en diversos fenómenos tales como la organización cortical, el guiado neuroaxonal, y la plasticidad sináptica (Fields y Stevens-Graham, 2002).

Dado que las células neurogliales tienen roles tanto en la respuesta inmune como en el funcionamiento neuronal, podemos concluir que ante un estado neuroinflamatorio pueden producir grandes modificaciones sinápticas y neuronales, que posteriormente afectarán el comportamiento y los procesos cognitivos.

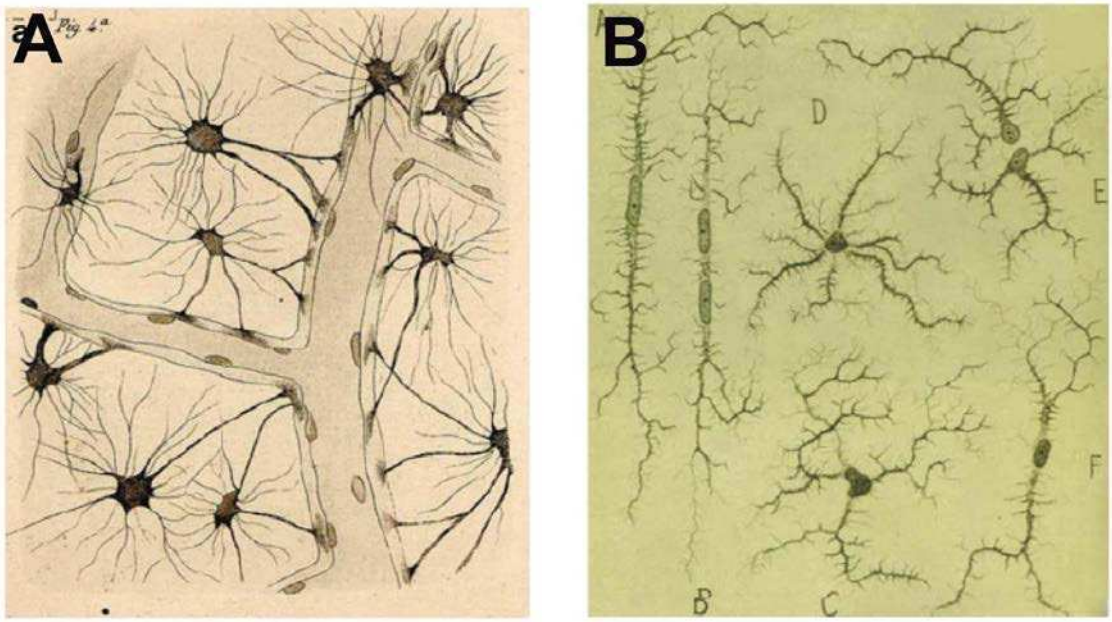

Figura 1.1 - Primeras representaciones de células neurogliales. (A) Astrocitos protoplásmicos en la materia gris teñidos y esquematizados por Camilo Golgi (Golgi, 1883). (B) Esquemas de Pío del Río-Hortega de los distintos tipos morfológicos de las células microgliales (Río-Hortega del, 1919).

1.4.1.1 Astrocitos

Los astrocitos son las células neurogliales más numerosas y diversas del SNC, presentando una marcada heterogeneidad en su morfología y función fisiológica, dependiendo de la región cerebral en la que se encuentren. En general, son células con forma de estrella, con numerosas prolongaciones citoplasmáticas con filamentos intermedios, que forman el citoesqueleto. El componente principal de estos filamentos intermedios es la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), cuya expresión es comúnmente utilizada como un marcador específico para identificar astrocitos. Dichos procesos se encuentran involucrados en la estructuración física del cerebro: poseen función mecánica de sostén y actúan como armazón para la migración celular durante el desarrollo del sistema nervioso.

Dentro de los distintos tipos de astrocitos, existen algunos que presentan mayor relevancia a los efectos de esta tesis. Los astrocitos protoplásmicos se encuentran presentes en la materia gris, poseen procesos finos, elaborados y complejos, con un promedio de 50 µm de largo. Estos procesos contactan los vasos sanguíneos, formando los pies perivasculares, y forman además múltiples contactos con neuronas (Kettenmann y Verkhratsky, 2013). Otro gran grupo de células astrogliales lo conforma la glía radial, células bipolares con un cuerpo celular ovoide y procesos elongados. Estas células son las primeras en desarrollarse de los progenitores neurales durante el desarrollo del cerebro, sus fibras forman una matriz que asiste a las nuevas neuronas en la migración celular. El cerebelo contiene una glía semi-radial especializada llamada glía de Bergmann; estas células presentan pequeños somas y procesos que se extienden desde la capa de células de Purkinje hacia la superficie pial. Estos son extremadamente elaborados y forman íntimos contactos con las sinapsis de las células de Purkinje (Kettenmann y Verkhratsky, 2013).

Las células astrogliales presentan variadas funciones, como ser construir la micro-arquitectura del parénquima cerebral, almacenar y distribuir sustratos

energéticos y producir factores de crecimiento. Son responsables de mantener la homeostasis extracelular: regulan la concentración de iones, aminoácidos excitatorios, neurotransmisores y metabolitos (Parpura y Verkhratsky, 2012; Nedergaard et al., 2003; Alvarez-Buylla y Lim, 2004; Giaume et al., 2007; Wang y Bordey, 2008; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Participan también en el control de la conectividad de los circuitos neuronales: la astroglia regula la formación, maduración, mantenimiento y estabilidad de las sinapsis a través de distintos mecanismos. Por ejemplo, el colesterol es un factor determinante en la formación de nuevas sinapsis, y es producido y secretado por astrocitos. Además, expresan proteínas específicas esenciales para la sinaptogénesis, pueden controlar la densidad de receptores postsinápticos, como así también eliminar sinapsis a través de la secreción de factores y enzimas proteolíticas que destruyen la matriz extracelular, reduciendo la estabilidad del contacto sináptico (Kettenmann y Verkhratsky, 2013).

Por último, los astrocitos también pueden afectar procesos de plasticidad de los circuitos neuronales, ya que las membranas astrogliales pueden envolver procesos neuronales y competir con las sinapsis. El estrecho contacto entre astrocitos y estructuras sinápticas permite que éstos sean expuestos a la liberación de neurotransmisores de los terminales sinápticos, asemejándose a una neurona postsináptica. De esta manera surge el concepto de sinapsis tripartita, según el cual las sinapsis presentan tres componentes igualmente importantes: el terminal presináptico, la membrana neuronal postsináptica y el astrocito circundante (Kettenmann y Verkhratsky, 2013).

La astroglía se encuentra involucrada en todos los tipos de patologías cerebrales, desde lesiones agudas como trauma o infarto, a procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple y enfermedades psiquiátricas (Giaume et al., 2007). Cuando el cerebro o la médula espinal sufren un daño se dispara un mecanismo de defensa evolutivamente conservado denominado astrogliosis reactiva. Este proceso limita el área dañada a través de la formación de una cicatriz y remueve el tejido dañado (Verkhratsky et al., 2010; Verkhratsky et al., 2013).

Los astrocitos expresan receptores de reconocimiento de patrones moleculares

asociados a patógenos (PAMPs) y gatillan respuestas inflamatorias locales (Farina et al., 2007). Los astrocitos activados también producen señales que pueden regular la respuesta inflamatoria, como citoquinas, quimioquinas y metaloproteasas. Por otro lado, limitan la extravasación de leucocitos periféricos, promueven la restauración de la barrera hematoencefálica, y promueven la supervivencia neuronal (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004).

1.4.1.2 Microglía

El SNC tiene sus propias células inmunes residentes llamadas microglía, un tipo de célula glial. Estas células se diferencian desde progenitores hematopoyéticos en la médula ósea y migran hacia el cerebro durante el desarrollo postnatal, típicamente hasta el día postnatal (P) 10 en roedores. Allí se distribuyen homogéneamente, se asientan y completan su diferenciación a células microgliales, adquiriendo el fenotipo específico.

En condiciones fisiológicas normales, las células microgliales se encuentran en el denominado “estado de reposo”, caracterizado por un cuerpo celular pequeño y numerosos procesos finos y elaborados. Expresan constitutivamente una variedad de marcadores de superficie tales como CD11b (Perry et al., 1985) y la enzima de unión a calcio IBA1 (Ito et al., 1998), que suelen ser utilizados para identificar dichas células de manera específica. Los procesos microgliales poseen múltiples ramificaciones que se extienden en todas direcciones, y se encuentran en rápido y constante movimiento; estos procesos representan las estructuras móviles más rápidas del cerebro: el parénquima cerebral puede ser escaneado completamente cada varias horas (Hanisch y Kettenmann, 2007).

Cuando una lesión es detectada, se desencadena la respuesta conocida como “activación microglial” cuya característica más saliente es la transformación morfológica gradual que sufren las células (Ransohoff y Perry, 2009; Kettenmann et al., 2011). En la fase inicial las células retraen sus procesos, que se vuelven más

gruesos y menos numerosos; en los estadíos intermedios los procesos son cada vez más cortos y gruesos y el tamaño de los somas aumenta. Algunas células entran en estado proliferativo, y además, utilizando movimientos ameboides se dirigen hacia el sitio dañado; lo que produce su multiplicación en el sitio circundante a la lesión. En última instancia, si el daño persiste, se alcanza la fase de máxima activación donde las células adoptan una forma ameboidea y se convierten en fagocitos (Kettenmann y Verkhratsky, 2013). Kreutzberg llamó estadio I al estado basal, estadios II y III a los estadios intermedios, y estadio IV al estado fagocítico (Kreutzberg, 1996).

En paralelo a la transformación morfológica ocurren también cambios moleculares, ya que aumenta la expresión de marcadores como CD11b (Perry et al., 1985) e IBA1 (Ito et al., 1998), y se estimula la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y moléculas co-estimulantes como CD45, CD4, CD80, CD86 y CD40 (Streit et al., 1988; London et al., 2013). La expresión de este complejo molecular convierte a las células microgliales en las células presentadoras de antígeno dominantes en el sistema nervioso (Shaked et al., 2004). Además, a través de la liberación de citoquinas, las células microgliales reclutan leucocitos hacia el SNC, e interactúan con linfocitos T infiltrados, mediando la respuesta inmune en el cerebro (Wilson et al., 2010; Boche et al., 2013).

La función fagocítica de las células microgliales no sólo es esencial en la respuesta inmune del cerebro, sino que además es importante bajo condiciones normales, ya que participa en la remoción de células apoptóticas; y durante el desarrollo, ya que participa en la remoción de sinapsis o poda sináptica *(pruning),* en el cerebro postnatal (Tremblay et al., 2011). Además, la microglía cuenta con funciones en el desarrollo neural, la plasticidad sináptica y procesos cognitivos (Schwarz y Bilbo, 2012; Perry y Teeling, 2013; Kettenmann et al., 2011).

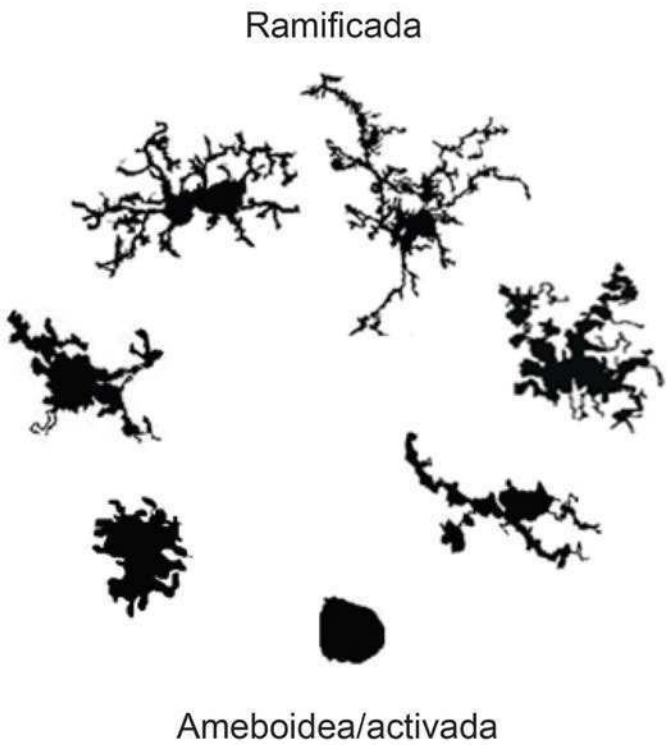

Figura 1.2 - Morfología de células microgliales. La microglía en reposo (ramificada) puede activarse ante un estímulo, adquiriendo un fenotipo fagocítico con forma ameboidea. Las formas ilustradas aquí representan estadios de transformación reversibles a cada paso (adaptado de Karperien et al., 2013).

1.5 Interacción entre sistema inmune y sistema nervioso

El sistema nervioso se encuentra aislado del resto del organismo a través de la barrera hematoencefálica (BHE) formada por uniones estrechas entre células endoteliales. El microambiente que rodea la barrera también participa en el mantenimiento estructural y funcional de la misma. La unidad neurovascular es una construcción conceptual formada por elementos estructurales, incluyendo al endotelio con su lámina basal y los pies de los astrocitos; y también de elementos contextuales como astrocitos, neuronas, pericitos y microglía (Muldoon et al., 2013).

Ante una lesión, la integridad de la barrera puede verse comprometida y existir

infiltrado celular; de esta forma, dichas células pueden transmitir señales que provienen de la periferia. Sin embargo, en situaciones normales también existen vías de comunicación entre el SNC y la periferia: la vía humoral y la neuronal.

La vía humoral consiste en la entrada directa de citoquinas al cerebro a través de un mecanismo de transportadores en la BHE, y a través de los órganos circunventriculares, zonas con capilares fenestrados donde se rompe la impermeabilidad de la barrera. También puede producirse la comunicación a través de los receptores presentes en las células endoteliales de la BHE, que luego transmiten la señal hacia el interior del cerebro. Esta forma de comunicación involucra la producción local de citoquinas y otros mediadores, y es fundamental en la inducción de fiebre y activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) (Rivest, 2009).

La vía neuronal involucra al nervio vago, que inerva el timo, hígado, pulmones y tracto gastrointestinal. Se encuentra asociado a nódulos linfáticos y sus aferentes desembocan en el núcleo del tracto solitario. Esta vía es típicamente activada ante infecciones intraperitoneales, cumpliendo un papel protagónico en el comportamiento asociado a enfermedad (Dantzer et al., 2000).

Las citoquinas tienen un papel protagónico en la comunicación entre el sistema inmune periférico y el sistema nervioso central. Actualmente se sabe que estímulos inflamatorios periféricos pueden inducir cambios en los niveles de citoquinas en el SNC (Layé et al., 1994; Pitossi et al., 1997). Las citoquinas penetran en el cerebro a través de los órganos circunventriculares y otras regiones permeables en la BHE (Konsman et al., 2002), y también a través de transporte activo (Banks et al., 1995). Además, citoquinas periféricas son capaces de estimular el nervio vago (Johnston y Webster, 2009) y de inducir la expresión de citoquinas en las células endoteliales, que pueden ser liberadas luego al parénquima cerebral (Kerschensteiner et al., 2009). De esta manera, las citoquinas inician modificaciones en el SNC que posteriormente darán lugar a respuestas comportamentales.

El caso más destacado de respuesta comportamental inducida por una respuesta inmune es el del comportamiento asociado a la enfermedad, conocido también como *sickness behavior* (Hart, 1988). Este representa un cambio en el estado motivacional de los individuos enfermos, que experimentan debilidad, letargia, pérdida

de apetito e interés en sus alrededores, y una reducción del movimiento en general (Dantzer, 2001). Estos síntomas forman parte de una estrategia altamente organizada para luchar contra la enfermedad, y son las citoquinas proinflamatorias las encargadas de sincronizar los componentes fisiológicos, metabólicos y comportamentales necesarios (Dantzer, 2001). También se las encuentra asociadas a procesos de diferenciación neuronal (Mathieu et al., 2010), comportamientos de aprendizaje (Depino et al., 2004) y procesos de mielinización (Schmitz y Chew, 2008).

El rol de las citoquinas como nexo entre el sistema inmune y nervioso promueve que su acción prolongada o desregulada se encuentre involucrada en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas y algunas enfermedades psiquiátricas (Dantzer y Kelley, 2007; Dantzer et al., 2008).

1.5.1 Alteraciones en pacientes con TEA

En años recientes se han acumulado numerosas evidencias de anormalidades inmunológicas y neuroinflamatorias en pacientes con desórdenes psiquiátricos clásicos. Más allá de que el autismo afecta principalmente la función cerebral, también se ven afectados otros sistemas y órganos.

Al consultar la literatura pueden encontrarse evidencias de alteraciones inmunes centrales y periféricas. Se han reportado anomalías en la inmunidad innata, como por ejemplo un aumento de citoquinas proinflamatorias secretadas por monocitos (Enstrom et al., 2010); como así también en la respuesta inmune adaptativa, como un desequilibrio entre células Th1 y Th2 (van Gent et al., 1997; Gupta et al., 1998) y un menor número de células T regulatorias, encargadas de prevenir respuestas autoinmunes (Mostafa et al., 2010). Estudios genéticos realizados en niños y adultos autistas han identificado varios genes relacionados con la señalización y función inmunológicas, así como también genes reguladores del desarrollo de los sistemas inmune y nervioso (Garbett et al., 2008; Pardo y Eberhart 2007).

Desde el punto de vista neuroendocrino, se han detectado elevados niveles basales de cortisol en plasma en niños varones autistas (Iwata et al., 2011) y una respuesta incrementada de cortisol en respuesta a un estresor (Spratt et al., 2011), lo que podría significar un incorrecto funcionamiento del eje HPA.

Por otro lado, se han reportado diversas anormalidades gastrointestinales y del tracto digestivo en individuos con TEA. La prevalencia de inflamación gastrointestinal puede ir desde el 9 al 91% (Buie 2011; Coury et al., 2012), y se ha hipotetizado que este hecho puede influenciar la homeostasis cerebral y modular el comportamiento de estos pacientes. La exposición a determinados antígenos provenientes de la dieta, bacterias y sus productos metabólicos y una alterada composición de la microbiota intestinal (Finegold et al., 2002; Parracho, 2005; Adams et al., 2011) pueden alterar la regulación inmune y por ende afectar la actividad del SNC.

Sin embargo, al día de hoy la presencia de autoanticuerpos contra proteínas del SNC es considerada como una de las evidencias más consistentes y robustas en pacientes con autismo (Mostafa y Al-Ayadhi 2011; Singh et al., 1997; Wills et al., 2007; Connolly et al., 1999; Singh y Rivas 2004; Todd et al., 1988; Vojdani et al., 2002; Mostafa y Al-Ayadhi 2011; Wills et al., 2011). Alrededor del 25-70% de los pacientes presentan autoanticuerpos reactivos a proteínas neurales (Singh et al., 1997), lo que sugiere una interacción anormal entre los sistemas inmunes materno y fetal durante el desarrollo del feto (Braunschweig y Water, 2012). Dado que los anticuerpos maternos pueden atravesar la placenta, patologías autoinmunes durante el embarazo pueden resultar en la transferencia de autoanticuerpos contra blancos neuronales de la madre al feto (Braunschweig et al., 2008), que podrían interferir con el correcto desarrollo neuronal.

Se ha demostrado en distintos modelos animales que la administración de estos autoanticuerpos maternos pueden afectar el funcionamiento neuronal y alterar el comportamiento de las crías. Por ejemplo, la inyección de IgGs provenientes de madres con al menos un hijo autista en hembras embarazadas de mono rhesus resultó en crías con comportamiento social atípico y un aumento en comportamientos estereotipados (Martin et al., 2008). Este tipo de autoanticuerpos contra proteínas del SNC ha sido detectado también en pacientes con autismo (Silva et al., 2004; Singer et

al., 2006; Wills et al., 2007), donde han sido identificados numerosos antígenos incluyendo filamentos axonales gliales y neuronales (Singh et al., 1997), mielina (Singh et al., 1993), receptores de serotonina (Todd and Ciaranello, 1985) y el factor de crecimiento nervioso (Mostafa y Al-Ayadhi 2011).

Aunque en una primera instancia las alteraciones mencionadas, así como distintas etiologías y patofisiologías propuestas de los TEA, pueden parecer desconectadas entre sí debido a su diversidad, existe un punto en común que las subyace. Todos estos factores se encontrarían activando las mismas moléculas efectoras, las citoquinas, que estarían actuando en el cerebro alterando el desarrollo y el comportamiento.

Individuos con autismo presentan en plasma niveles elevados de citoquinas proinflamatorias (Ashwood et al., 2011) y niveles reducidos de citoquinas antiinflamatorias (Ashwood et al., 2009). Estudios *postmortem* han mostrado niveles alterados de citoquinas en cerebro y señales de activación microglial en el cerebro de pacientes autistas (Vargas et al., 2004). En el cerebro, las citoquinas pueden actuar sobre las células neurogliales e inducir un estado neuroinflamatorio. En análisis de cerebros *postmortem* se han encontrado señales de inflamación crónica, dadas por activación astro y microglial en la materia blanca subcortical del giro frontal medio, el giro cingulado anterior, y en la capa de células granulares, células de Purkinje y materia blanca del cerebelo (Pardo et al., 2005; Vargas et al., 2004).

Todas estas evidencias sugieren a los TEA como un desorden con alteraciones inmunes tanto centrales como periféricas, a nivel celular y sistémico. De manera de lograr una intervención terapéutica temprana de la enfermedad es necesario identificar los agentes que contribuyen a la etiología del desorden, al mismo tiempo que comprender los mecanismos inmunes y neurales implicados. Con este objetivo se convierte en esencial el desarrollo de modelos animales para el estudio del autismo.

1.6 Modelos animales de TEA

Según McKinney (McKinney, 1984), un modelo animal es un preparado desarrollado en una especie con el propósito de estudiar fenómenos que ocurren en otra. Sin pasar por alto las restricciones dadas por las diferencias entre los sistemas nerviosos e inmunes de los humanos y de los roedores, los modelos animales de enfermedades humanas son valiosas herramientas que permiten no sólo estudiar las causas y los mecanismos de una enfermedad, sino también evaluar nuevos tratamientos.

Existen ciertos requisitos que un modelo animal debe cumplir para modelar una enfermedad humana. En primer lugar, debe contar con validez de constructo, es decir que las causas que originan la enfermedad humana son las mismas que lo hacen en el modelo animal. Evaluar esta característica en un modelo implica conocer la etiología de la enfermedad, por lo tanto resulta muchas veces imposible. Además, debe contar con validez aparente: las alteraciones observadas en los animales deben ser similares a aquellas presentes en los pacientes humanos. Aquí se está asumiendo que la similaridad fenotípica es consecuencia de los mismos procesos fisiológicos actuando en ambos casos, aunque esta suposición resulta muchas veces imposible de evaluar. Finalmente, se considera que el requisito principal que los modelos animales deben cumplir es permitir realizar predicciones. Un modelo animal cuenta con validez predictiva si un tratamiento evaluado en animales tiene los mismos efectos al ser administrado en humanos. Esta característica puede resultar útil aunque no se conozcan las causas, mecanismos y procesos fisiológicos implicados en la enfermedad. Entonces, un modelo animal será más valioso cuantas más características comparta con la enfermedad humana. Es decir, cuantos más síntomas comparta, cuantos más factores etiológicos recapitule, y con cuanta mayor certeza prediga los resultados de un tratamiento.

En el caso de los modelos animales de autismo, su fuerza proviene principalmente de su validez aparente. El foco se ha puesto en modelar los tres síntomas llamados “nucleares” del síndrome: sociabilidad reducida, deficiencias en la

comunicación y comportamientos estereotipados o repetitivos. Para evaluarlos, han sido desarrollados numerosos ensayos comportamentales en roedores (Crawley 2004; Crawley 2007).

Dado que los ratones son animales sociales por naturaleza, es relativamente sencillo detectar y cuantificar una reducción en la sociabilidad analizando las interacciones entre dos individuos; aunque también se han analizado respuestas a estímulos sociales novedosos, preferencia de sitio condicionada, patrones de anidado, y evitación de la mirada (Balemans et al., 2010; de Theije et al., 2014; Defensor et al., 2012; DeLorey et al., 2008; Depino et al., 2011; Lucchina y Depino, 2013; MacFabe et al., 2011; Hsiao et al., 2011; McFarlane et al., 2008; Pearson et al., 2012; Schneider y Przewlocki, 2004).

Por otro lado, algunos comportamientos naturales de roedores son considerados estereotipados cuando son expresados sin necesidad, como ser el autoacicalamiento, o la excavación o *marble burying*. Estos comportamientos pueden ser cuantificados y utilizados para modelar dicho síntoma del autismo (Amodeo et al., 2012; Depino et al., 2011; McFarlane et al., 2008; Pearson et al., 2011). También se ha evaluado la reversión de ciertos aprendizajes, como ser una posición apetitiva en un laberinto en T o en el test acuático de Morris (de Theije et al., 2014; MacFabe et al., 2011); o la respuesta a un objeto novedoso en comparación con uno familiar (Pearson et al., 2011).

Por último, los déficits comunicacionales han sido modelados fundamentalmente con el estudio de las vocalizaciones y las respuestas a éstas, vocalizaciones ultrasónicas (USVs) de crías y marcas de orina (Scattoni et al., 2008, 2011; Wohr et al., 2011).

Los modelos animales han probado ser herramientas muy valiosas en el estudio de los mecanismos biológicos detrás de los desórdenes psiquiátricos. En los últimos años han surgido numerosos modelos animales de TEA, y su generación se ha cimentado principalmente en estudios epidemiológicos para inducir fenotipos relacionados con el autismo en roedores. En estos estudios se ha observado que diversos estímulos inmunes pueden tener como consecuencia una reducción en la sociabilidad y un aumento en los comportamientos repetitivos. Asimismo, han sido

reportadas alteraciones inmunes en modelos genéticos y ambientales de TEA. Aunque los mecanismos no han sido aún elucidados, dichas evidencias sugieren un rol de ciertos factores inmunes en el desarrollo de los comportamientos relacionados con el autismo. En la actualidad existen numerosos grupos utilizando modelos animales para evaluar el rol de las alteraciones inmunológicas en el desarrollo de dichos comportamientos.

Para estudiar el rol de la inflamación en los TEA pueden ser empleados dos enfoques distintos. Por un lado, los eventos inflamatorios e inmunes podrían tener un rol en la etiología del desorden; por lo que pueden ser generados modelos mediante la administración de estímulos inflamatorios en distintos momentos del desarrollo. Por el otro lado, las alteraciones inmunológicas e inflamatorias pueden ser evaluadas en modelos generados mediante la utilización de otros factores ambientales o variantes genéticas ligadas al autismo.

1.6.1 Modelos inflamatorios de TEA

Entre los numerosos factores ambientales involucrados en la patofisiología del autismo, la infección materna es mencionada como la principal causa no genética del desorden (Ciaranello y Ciaranello 1995). Como se ha mencionado en la sección 1.2.2, estudios epidemiológicos han mostrado una fuerte asociación entre autismo e infección viral materna (Atladottir et al., 2010).

Entre los modelos utilizados para estudiar los efectos de la inflamación prenatal en el desarrollo neural del feto podemos encontrar el de la infección por influenza respiratoria materna (Shi et al., 2003; Fatemi et al., 2002), infección por bacteria periodontal (Lin et al., 2003), o los modelos de activación inmune materna (MIA, por sus siglas en inglés) (Smith et al., 2007). Este último se encuentra basado en la inyección de ratones o ratas preñadas con el ARN sintético doble cadena polyI:C (polyinosinic:polycytidylic acid), un ligando para el receptor Toll 3 (TLR3), involucrado en la respuesta inmune innata ante una infección viral. La utilización de este agente

inflamatorio genérico permite modelar factores comunes a varias infecciones, independizándose de la naturaleza particular de cada patógeno.

Se ha observado que el momento de la infección es determinante, ya que ni el funcionamiento del sistema inmune materno (Claman, 1993) ni la susceptibilidad del sistema en desarrollo del feto son homogéneos a lo largo del período de gestación. Un estudio epidemiológico realizado en Dinamarca encontró una asociación entre la infección viral materna durante el primer trimestre de embarazo, o infección bacteriana materna durante el segundo trimestre, y el diagnóstico de TEA en el niño (Atladottir et al., 2010). Resultados similares se han encontrado en el modelo en ratón de MIA: Meyer et al. (2006) inyectó polyI:C en hembras preñadas de ratón al día gestacional 9 (GD9) o al GD17, tiempos que corresponden a la transición entre el primer y el segundo trimestre, y entre el segundo y el tercer trimestre en los embarazos humanos, respectivamente. Estos experimentos mostraron una dependencia de las alteraciones conductuales relacionadas con el autismo con el momento de administración del estímulo inflamatorio; aunque en ambos casos encontraron diferencias en el perfil de expresión de citoquinas en el suero materno y cerebro fetal posterior a la activación inmune.

Además, las crías MIA poseen déficits en la comunicación y sociabilidad, y presentan elevados niveles de comportamientos estereotipados o repetitivos (Malkova et al., 2012); es decir que un estímulo inflamatorio prenatal puede generar los tres síntomas principales del autismo. Considerando las alteraciones inmunes que se observan en los pacientes, cabe preguntarse si un único evento inmune durante la embriogénesis puede llevar a una desregulación inmunológica persistente en la adultez.

En esta línea, Hsiao et al. (2012) encontró que los animales MIA poseen un déficit sistémico en el número de células T regulatorias, que además presentan una respuesta alterada ante un estímulo. Estas, entre otras anormalidades, le otorgan a los animales MIA un fenotipo proinflamatorio, que podría ser explicado por una programación intrínseca de las células madre hematopoyéticas durante el desarrollo. Para ahondar en esta cuestión, se realizó un trasplante de médula ósea de animales MIA en animales salina y MIA previamente irradiados. Curiosamente, las

anormalidades inmunes no fueron transferidas, sugiriendo un rol para el microambiente de células madre hematopoyéticas en el mantenimiento del fenotipo proinflamatorio.

¿Podrían estas alteraciones inmunológicas ser responsables de la generación o el mantenimiento de las alteraciones conductuales halladas en los ratones MIA? ¿O son dos manifestaciones independientes, no relacionadas, del desorden? Los animales MIA irradiados, trasplantados luego con médula ósea de animales salina, no muestran comportamientos repetitivos, pero mantienen el déficit en la preferencia social. Estos resultados añaden evidencia a un grupo de estudios que muestran la capacidad del trasplante de médula ósea en mejorar los síntomas de distintos desórdenes neurológicos (Derecki et al., 2012), y también subrayan la importancia del ambiente periférico en el mantenimiento de las alteraciones inmunes en los ratones MIA.

Por otro lado, se sabe que la microbiota es capaz de modular la fisiología del huésped, particularmente la función inmune. Pero además, recientemente ha sido demostrado que ésta puede impactar en el desarrollo cerebral y comportamiento de los mamíferos (Diaz Heijtz et al., 2011): las bacterias comensales afectan los comportamientos sociales, emocionales y relacionados con la ansiedad (Cryan y Dinan 2012; Collins et al. 2012). Como hemos mencionado previamente, los pacientes con TEA suelen sufrir problemas gastrointestinales, como permeabilidad intestinal elevada y enfermedades intestinales inflamatorias (Kohane et al., 2012). También se ha encontrado que estos sujetos poseen una composición atípica de su microbiota intestinal (Adams et al., 2011; Finegold et al., 2012; Kang et al., 2014; Parracho et al., 2005), por lo que se ha propuesto una conexión entre las anomalías bacterianas y gastrointestinales y el fenotipo conductual de los TEA.

Hsiao et al. (2013) exploró dichas alteraciones en el modelo MIA y encontró que las crías tratadas con polyI:C durante la gestación presentan un déficit en la integridad de la barrera intestinal, perfiles de expresión de citoquinas alterados en intestino y disbiosis de la microbiota intestinal. Sin embargo, cuando estos ratones fueron tratados con bacterias comensales, la permeabilidad intestinal y los perfiles de citoquinas fueron restaurados a niveles normales. Más aún, el tratamiento mejoró los

comportamientos relacionados con la ansiedad, redujo los niveles de comportamientos estereotipados y el comportamiento repetitivo, aunque no pudo restaurar los déficits en la sociabilidad y en la preferencia de novedad social. Estos resultados indican la posible existencia de diversos circuitos neuronales responsables por los comportamientos asociados a los TEA con sensibilidad diferencial a los efectos de la modulación por microbiota.

Un posible mecanismo de acción de la microbiota para la modulación del comportamiento es a través del efecto de sus productos metabólicos en el SNC. Entre las moléculas producidas por la flora intestinal se encuentra el ácido propiónico (PPA, por sus siglas en inglés), un intermediario en el metabolismo celular de los ácidos grasos, también presente de manera natural en los alimentos, y usualmente utilizado como conservante alimenticio. El PPA intestinal es capaz de cruzar las barreras intestinal y hematoencefálica, consiguiendo acceso al SNC, donde puede alterar la liberación de neurotransmisores e inhibir las uniones estrechas mediante la acidificación del interior celular (Bonnet et al., 2000; Karuri et al., 1993). También, niveles elevados de PPA estimulan la secreción de citoquinas proinflamatorias como IFN-gamma (Cavaglieri et al., 2003).

Estas evidencias indican que el PPA podría potencialmente alterar la comunicación neuronal y el comportamiento, así como también modular el funcionamiento inmunológico. Es más, dado que los niveles de PPA aumentan durante las patologías gastrointestinales como las observadas en los pacientes de TEA, esta molécula podría ser una conexión entre la bacteria comensal y el fenotipo del autismo. En esta línea, ratas tratadas de manera intracerebroventricular con PPA mostraron intereses restringidos a un objeto específico y anormalidades en el comportamiento social (MacFabe et al., 2011; Shultz et al., 2015). También se observó astrogliosis reactiva y microglía activada en el hipocampo de animales inyectados con PPA, sugiriendo una respuesta inflamatoria innata (Shultz et al., 2008; MacFabe et al., 2011). Estos resultados respaldan la utilización del ácido propiónico para generar un modelo de TEA en roedores.

1.6.2 Modelos genéticos de TEA

Los trastornos del espectro autista son un grupo de desórdenes heterogéneos, que en algunos casos pueden ser asociados con desórdenes genéticos tales como el síndrome de Rett y de frágil X, o la tuberosis esclerosa. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes no ha sido posible identificar un único mecanismo patofisiológico y no se conocen las causas del desorden (Pardo y Eberhart, 2007).

Existen diversas evidencias que sugieren que los TEA poseen un componente heredable, por lo que numerosos modelos animales han sido creados mediante la manipulación de genes candidatos identificados en estudios poblacionales. Algunas líneas mutantes se basan en aberraciones monogénicas, y otras en *loci* que otorgan susceptibilidad al desorden. Dado que los intentos de vincular los TEA con mutaciones individuales no han sido exitosos (Wassink et al., 2004), existe hoy en día un consenso sobre la existencia de múltiples genes que confieren susceptibilidad al desorden, los cuales son influenciados tanto por sus interacciones con otros genes, como por factores ambientales.

Moy et al. (2007) realizó un estudio en el que ratones macho de diez cepas endocriadas fueron caracterizados para comportamientos relacionados con el autismo, como sociabilidad, preferencia por novedad social, y reversión del aprendizaje de la ubicación espacial de un refuerzo en distintos laberintos. Encontraron que la cepa BTBR T + tf/J presenta reducción en la sociabilidad y resistencia al cambio de rutina en el laberinto acuático. Estos resultados son consistentes con un fenotipo autista, por lo que algunos grupos han propuesto utilizar la cepa BTBR como un modelo de autismo.

Otros grupos han profundizado la caracterización de esta cepa (McFarlane et al., 2008; Amodeo et al., 2012; Pearson et al., 2011; Pearson et al., 2012; Pobbe et al. 2011) y hallado una reducción en el acercamiento social, déficits en interacciones sociales recíprocas y alteraciones en el juego juvenil. Además, también muestran altos niveles de autoacicalamiento y resistencia a la reversión de un aprendizaje, sumado al repertorio inusual de USVs tanto en la adultez como a edades tempranas (Scattoni et

al., 2008; Scattoni et al., 2010; Wohr et al. 2010). En conclusión, los ratones BTBR muestran los tres síntomas nucleares del autismo: sociabilidad reducida, comportamientos repetitivos y problemas en la comunicación.

En cuanto al funcionamiento del sistema inmune, Heo et al. (2011) encontró niveles elevados de anticuerpos cerebro-reactivos en cerebro y suero, al mismo tiempo que un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro, tales como IL-33, IL-18 e IL-1β. En un estudio posterior se estudió el rol de la polarización de macrófagos (M1/M2) en esta cepa, y se observó que los macrófagos de los ratones BTBR presentan mayor producción de citoquinas inflamatorias, y una tendencia mayor a polarizarse hacia un fenotipo M1 (Onore et al., 2013). También evaluaron la relación entre los fenotipos comportamentales e inmunes, analizando los comportamientos sociales y repetitivos y su correlación con los distintos perfiles de producción de citoquinas. Por un lado, hallaron que el comportamiento de autoacicalamiento se encuentra asociado con varias citoquinas, sugiriendo la existencia de una relación directa entre citoquinas inflamatorias y comportamientos repetitivos más severos por un lado, y de citoquinas antiinflamatorias con mejoras comportamentales por el otro. Por el contrario, no encontraron asociaciones entre perfiles de citoquinas y el comportamiento social, indicando que la sociabilidad no se encuentra fuertemente afectada por las citoquinas alteradas (Onore et al., 2013). Este estudio sugiere que el fenotipo comportamental y el perfil inmuno-inflamatorio de los ratones BTBR no serían eventos independientes, sino fenómenos conectados.

1.6.3 Combinación de modelos genéticos e inflamatorios

Como hemos discutido previamente, actualmente la hipótesis más aceptada sobre la causa del autismo es que no existe un único proceso patofisiológico, sino que es la consecuencia de la combinación de factores ambientales, genéticos y epigenéticos. Por este motivo, es importante estudiar cómo estos factores interactúan entre sí.

En esta línea, Schwartzer et al. (2013) hipotetizó que el trasfondo genético de un ratón podría influenciar la severidad del fenotipo de tipo autista generado por un factor ambiental tal como la infección viral materna (MIA). Para poner a prueba esta hipótesis se utilizaron hembras preñadas de las cepas BTBR y C57BL/6J (C57) que fueron inyectadas con polyI:C en el GD12.5. Posteriormente sus crías fueron evaluadas para los comportamientos relacionados con el autismo. Tanto en los ratones BTBR como en los controles C57, la administración de polyI:C durante la gestación afectó las USVs, produjo alteraciones en el comportamiento social, y aumentó los comportamientos repetitivos. Sin embargo, algunos de estos efectos fueron mayores en los ratones BTBR.

También evaluaron la respuesta inducida de los esplenocitos, midiendo los niveles de citoquinas. Curiosamente, observaron una interacción entre los factores cepa y tratamiento prenatal respecto a la liberación de la citoquina IL-17, con los ratones BTBR expuestos a polyI:C secretando la máxima cantidad.

Estos resultados se encuentran en línea con evidencias halladas en los modelos BTBR y MIA, que demuestran que tanto factores ambientales como la predisposición genética pueden resultar en fenotipos conductuales similares. Más aún, este estudio fomenta la hipótesis sinérgica, donde la combinación de factores genéticos y ambientales exacerban el fenotipo autista generado por cada factor de manera independiente. Futuros estudios podrían ayudar a elucidar los mecanismos a través de los cuales la inflamación contribuye en los comportamientos relacionados con el autismo tanto en los modelos genéticos como en los ambientales.

1.6.4 Modelos ambientales no inflamatorios de TEA: modelo VPA

A la fecha hemos podido identificar sólo un modelo ambiental no inflamatorio de autismo, en el que la función inmune e inflamatoria han sido parcialmente estudiadas: la exposición prenatal al ácido valproico (VPA). Como se ha desarrollado

en la sección 1.2.2, varios estudios han vinculado la exposición prenatal a drogas antiepilépticas, VPA en particular, con los TEA (Vinten et al., 2009; Christensen et al., 2013; Moore et al., 2000; Williams et al., 2001); lo que ha llevado a la generación de modelos animales en roedores. Rodier et al. (1996) fue el primero en desarrollar un modelo de autismo en ratas a través de la exposición prenatal a VPA. Desde entonces, el número de estudios utilizando inyecciones de VPA en el período prenatal o postnatal temprano ha ido en aumento.

Un estudio identificó que una única inyección de 400 mg/kg de VPA en ratas preñadas al GD12.5 resulta en crías con baja sociabilidad (Kim et al., 2011). Curiosamente, estos efectos no son observados al realizar la inyección al GD7, GD9.5 o GD15, demostrando que existe una ventana crítica en la que el VPA afecta el comportamiento social. Posteriormente, estos resultados obtenidos en ratas Sprague-Dawley fueron verificados en otras cepas de ratas (Schneider et al., 2008; Schneider y Przewlocki, 2004; Roullet et al., 2010; Bambini-Junior et al., 2011) y en distintas cepas de ratón (Kataoka et al., 2013; Lucchina y Depino, 2013; de Theije et al., 2013; Wagner et al., 2006; Yochum et al., 2008).

Una caracterización más profunda ha mostrado que la exposición prenatal a VPA provoca no sólo disminución en la interacción social, sino también hiposensibilidad al dolor, intensificación de la memoria de miedo, y cambios en el tipo de USVs (Vorhees, 1987; Wagner et al., 2006; Dufour-Rainfray et al., 2011; Lin et al., 2013). Además, este modelo también muestra alteraciones en comportamientos asociados a la presencia de TEA, como ser un mayor comportamiento relacionado con la depresión (Nakasato et al., 2008) y la ansiedad (Mehta et al., 2011), e incluso desregulaciones en los ritmos circadianos (Tsujino et al., 2007).

Por otro lado, animales expuestos prenatalmente a VPA muestran un aumento en la expresión de marcadores neuroinflamatorios tales como GFAP, CD11c, IL-1β y Cox-2 en el hipocampo (de Theije et al., 2014). Dichos ratones presentan también signos de inflamación intestinal, dados por la infiltración de neutrófilos en el tracto intestinal y la pérdida de células epiteliales, produciendo daños en la barrera epitelial del intestino (de Theije et al., 2014). Además, estos fenómenos se correlacionan con alteraciones en la flora intestinal, no sólo en su composición sino también en su

actividad (de Theije et al., 2013).

El modelo de autismo generado mediante el tratamiento prenatal con VPA presenta validez de constructo, ya que niños expuestos a VPA *in utero* muestran un síndrome con similitudes fenotípicas con el autismo. Pero las evidencias mencionadas muestran que también posee validez aparente, ya que los animales tratados con VPA muestran características comportamentales semejantes a las que se observan en humanos. Este modelo animal permite estudiar no sólo el fenotipo comportamental, la patofisiología y la relación entre distintas alteraciones inmunes y los niveles de sociabilidad, sino que también permite la posibilidad de evaluar el efecto de distintas terapias y tratamientos.

1.6.4.1 Antecedentes de nuestro laboratorio

En el laboratorio se ha utilizado el modelo de exposición prenatal al VPA con el objetivo de estudiar el rol de los procesos inflamatorios en el desarrollo de los comportamientos relacionados con el autismo.

Los estudios previos han sido enfocados en la caracterización conductual y del estado inflamatorio basal, así como de la respuesta a estímulos inflamatorios agudos, tanto en la periferia como en el cerebro. Estos se han realizado en ratones macho adultos, pertenecientes a una F1 híbrida, generada a partir de la cruza de hembras BALB/c con machos C57.

En primer lugar se ha validado el fenotipo comportamental, ya que los ratones VPA muestran una reducción en la sociabilidad, dada por un menor tiempo de exploración de un ratón estímulo; así como también presentan un aumento del comportamiento relacionado con la ansiedad en un laberinto elevado en cruz. Asimismo, se han reportado alteraciones duraderas en la respuesta inflamatoria. Los animales VPA muestran respuestas inflamatorias exacerbadas, en el centro y la periferia, a un estímulo inflamatorio. En la periferia, una inyección de lipopolisacárido (LPS) induce una activación exacerbada del eje HPA y un aumento en la expresión de

la citoquina pro-inflamatoria IL-6. En el cerebro, los ratones VPA muestran signos de activación microglial crónica en el cerebelo, revelando gliosis crónica. Además, el estímulo inflamatorio periférico aumenta el número de células microgliales en el hipocampo y la expresión de citoquinas inflamatorias en el cerebelo de los animales VPA (Lucchina y Depino, 2013).

Por otro lado, también hemos estudiado el período postnatal temprano, a través de la caracterización de comportamientos y reflejos típicos que aparecen en determinados momentos del desarrollo en los ratones. Hemos encontrado que la exposición prenatal al VPA genera un retraso en la aparición de los reflejos de enderezamiento y de sobresalto por ruido. Estos efectos no se deben a diferencias en el cuidado materno durante la primera semana postnatal, como así tampoco a problemas en el desarrollo, ya que no existen diferencias entre los grupos en la aparición de marcadores físicos de desarrollo (estos resultados formaron parte de mi tesis de licenciatura y están contenidos en la publicación Kazlauskas et al., 2016, junto con resultados de esta tesis).

En conjunto, estos resultados proveen evidencias de la existencia de un estado neuroinflamatorio basal y una respuesta inflamatoria alterada en los animales VPA; además de alteraciones conductuales que pueden advertirse en distintos momentos de la vida del animal.

A pesar de que en nuestro modelo de estudio la administración de VPA es un evento único durante el período gestacional, sus efectos pueden ser detectados tanto en el período postnatal temprano como en la adultez. De este hecho se desprende no sólo la pregunta acerca del mecanismo de acción mediante el cual el VPA afecta el estado inflamatorio y la conducta, sino además de qué manera sus efectos se sostienen a través del tiempo.

1.7 Epigenética

El término epigenética fue introducido por primera vez por Hal Waddington en 1942, para referirse al estudio de los mecanismos que modulan la expresión genética generando un determinado fenotipo. Más precisamente, se refiere a modificaciones en el genoma que influyen en la expresión génica, ya sea activando o reprimiendo la transcripción, pero no involucran cambios en la secuencia nucleotídica. Esta regulación de la expresión se produce a través de cambios en la estructura de la cromatina por medio de modificaciones en las histonas y metilación del ADN (Jaenisch y Bird, 2003).

Las histonas son proteínas que se asocian al ADN, formando la cromatina. Brevemente, un nucleosoma es la unidad de construcción de la cromatina. Éste consiste de un octámero de histonas (incluyendo H2A, H2B, H3, H4) y 147 pares de bases de ADN, envueltos alrededor del núcleo de histonas. Dos nucleosomas adyacentes se encuentran vinculados entre sí por aproximadamente 50 pares de bases de ADN. El extremo N-terminal de cada histona está formado por una cadena de aminoácidos, llamadas “colas de histonas”, sujetas a ser modificados a través de la añadidura de un grupo funcional.

Estas modificaciones alteran la carga eléctrica de las proteínas y regulan el acceso de los factores de transcripción al ADN asociado, pudiendo determinar así los niveles de expresión genética. Entre las modificaciones de histonas más comunes podemos encontrar acetilación, metilación y fosforilación; mientras que la modificación típica del ADN es la metilación. Todas ellas se encuentran mediadas por determinadas enzimas: acetilasas, metilasas y fosforilasas de histonas, y metilasas de ADN. Estas enzimas son susceptibles a la influencia de factores internos y externos, como ser la acción de hormonas, neurotransmisores, estrés y drogas (Black y Whetstine, 2011).

En células adultas y diferenciadas, la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac) es catalizada por varias acetiltransferasas de histonas, y junto a dicha modificación, la acetilación de varios otros residuos de lisinas de la histona H2A, H2B y H4 generalmente facilitan la transcripción génica. Por el contrario, la desacetilación

mediada por distintos tipos de histona deacetilasas (HDACs) suprimen la transcripción génica (Thiagalingam et al., 2003; Kouzarides, 2007). La metilación de histonas presenta la posibilidad de activar o reprimir la transcripción, dependiendo si los residuos se encuentran mono-, bi- o trimetilados, y de la posición del aminoácido en la histona (Barbon et al., 2006; Jarome y Lubin, 2013). Por otro lado, las modificaciones en las histonas también definen el estado de la estructura cromosómica y la configuración de los bucles de la cromatina, promoviendo el contacto físico de regiones promotoras con elementos regulatorios lejanos, como *enhancers* o *silencers*, añadiendo otra dimensión de regulación de la expresión génica (Dekker y Misteli, 2015).

De esta manera, las modificaciones epigenéticas en las histonas y el ADN diagraman la identidad tejido-específica y el perfil transcripcional de una célula. Estos procesos resultan cruciales durante el desarrollo, ya que, por ejemplo, la metilación del ADN se encuentra implicada en la inactivación del cromosoma X o *imprinting* genómico, en el desarrollo del cerebro y en los ritmos circadianos (Suzuki y Bird, 2008; Nakahata et al., 2007). Consistentemente, anomalías epigenéticas han sido vinculadas a desórdenes del neurodesarrollo, incluyendo esquizofrenia y autismo (Dempster et al., 2011; Wong et al., 2013).

El gen MeCP2 posee un rol importante en el control de la metilación y está involucrada en la activación y represión temporal de la expresión génica (Chahrour et al., 2008). Se encuentra fuertemente relacionado con desórdenes del neurodesarrollo como ser el síndrome de Rett (Amir et al., 1999), el autismo (Swanberg et al., 2009), la esquizofrenia y en defectos en el tubo neural (Wang et al., 2010). En el síndrome de frágil X, la hipermetilación del gen FMR1 se encuentra asociada a su expresión reducida y al fenotipo de la enfermedad (Sutcliffe et al., 1992; De Vries et al., 1996).

Adicionalmente a los estudios de genes específicos, análisis *genome-wide* del metiloma de ADN en cerebros *postmortem* y en sangre de pacientes con TEA revelaron anomalías en regiones regulatorias de varios otros genes, sumado a la hipometilación del ADN total (Ladd-Acosta et al., 2014; Nardone et al., 2014).

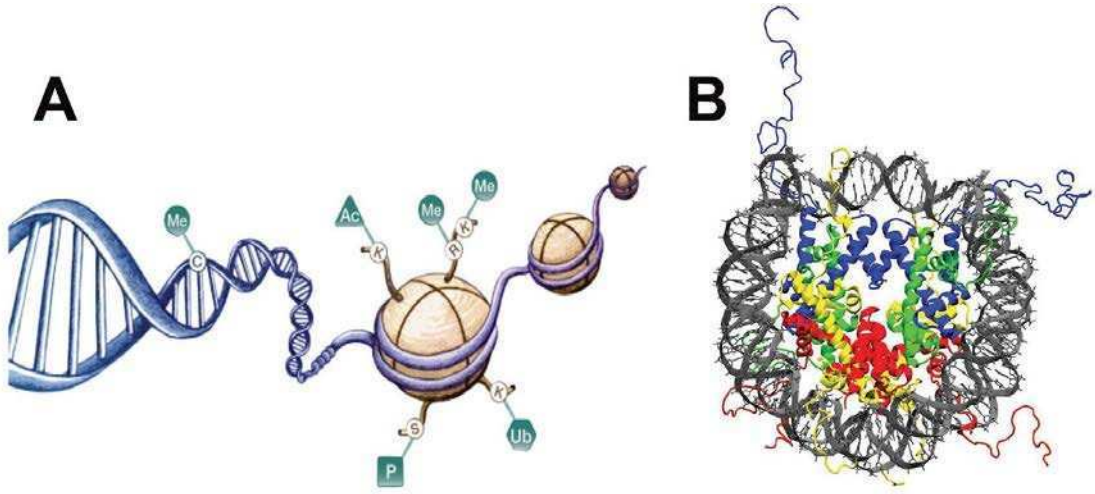

Figura 1.3 - Representación esquemática de la cromatina y estructura cristalográfica de un nucleosoma. (A) Se ilustran algunas de las modificaciones epigenéticas que pueden sufrir el ADN y las histonas. (B) La estructura cristalográfica del nucleosoma muestra cómo sobresalen las colas de histonas por fuera de la estructura del octámero, dejándolas susceptibles a ser modificadas por distintas maquinarias biológicas. Me, metilación; Ac, acetilación; P, fosforilación; Ub, ubiquitinación.

1.7.1 Epigenética y VPA

El rol de los mecanismos epigenéticos en la etiología del autismo es un concepto relativamente nuevo, y el modelo de exposición al ácido valproico resulta particularmente útil para explorarlo.

Se han propuesto múltiples mecanismos para explicar la acción antiepiléptica del VPA, como ser el aumento de los niveles de GABA, la disminución de los niveles de aspartato, el bloqueo de canales iónicos dependientes de voltaje (Chapman et al., 1982), y efectos sobre algunos receptores de esteroides (Blaheta y Cinatl, 2002). Pero además de todos estos efectos, ha sido demostrado su efecto inhibidor sobre la actividad deacetilasa de histona (HDAC) (Gottlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001;

Mitchell et al., 2005), provocando la hiperacetilación de histonas y afectando la expresión de una gran cantidad de genes. Curiosamente, la exposición prenatal a otras drogas antiepilépticas que no inhiben la HDAC no aumentan el riesgo de TEA en niños (Nadebaum et al., 2010; Nadebaum et al., 2011).

Tung y Winn (2010) analizó las alteraciones epigenéticas en el modelo VPA. Estudiaron los cerebros de los embriones 3 hs luego de la exposición al VPA y hallaron un incremento en la acetilación de histonas, acompañado de cambios en la metilación de la histona H3, particularmente en el neuroepitelio. En otro trabajo fueron estudiados no sólo los efectos de la exposición prenatal al VPA sino también a la valpromida, un análogo de VPA sin actividad inhibitoria de HDAC (Kataoka et al., 2011). Interesantemente, mientras que el VPA produjo un aumento transiente en los niveles de acetilación de histonas en el cerebro de los embriones, la valpromida no afectó los parámetros comportamentales, bioquímicos ni histológicos de la misma manera que el VPA .

Estos antecedentes sugieren que la ola de hiperacetilación inducida por la administración prenatal de VPA juega un rol clave en la generación del fenotipo en este modelo animal; y aún más, dadas las características de las marcas epigenéticas, este mecanismo podría ser capaz de explicar también el mantenimiento del fenotipo durante toda la vida del animal.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis y objetivos

Nuestra hipótesis general de trabajo en el laboratorio supone que procesos inflamatorios centrales, particularmente la activación glial, subyacen el desarrollo del autismo. De ésta se desprenden dos hipótesis alternativas, específicas para el trabajo presentado en esta tesis:

- La activación glial observada en el cerebro adulto afecta el comportamiento de modo agudo, durante su evaluación en la adultez.

- La activación glial postnatal afecta el desarrollo postnatal, de modo de resultar en alteraciones a largo plazo en los comportamientos relacionados con el autismo. Existe una ventana temporal durante el desarrollo en que ocurre la maduración y consolidación de los sistemas neurales responsables de los síntomas del autismo.

A su vez, nuestro objetivo general es dilucidar el rol que juega la respuesta inflamatoria/glial del sistema nervioso central en el autismo; y los objetivos particulares del trabajo expuesto en esta tesis son:

- Evaluar el efecto del sexo en el modelo VPA
- Caracterizar el desarrollo postnatal de las hembras VPA
- Evaluar el efecto de un estímulo inflamatorio postnatal sobre el desarrollo de comportamientos relacionados con el autismo en la adultez
- Elucidar los procesos moleculares que subyacen las alteraciones observadas en el modelo

2

Materiales y métodos

2. Materiales y métodos

2.1 Animales

A lo largo de este trabajo se utilizaron ratones de la cepa exocriada CrlFcen:CF1 provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ratones machos y hembras adultos de 8-10 semanas de edad fueron utilizados en los apareamientos necesarios para obtener los animales experimentales. Esta cepa exocriada fue seleccionada para su uso debido a que se observó una mejor performance de apareamiento que con cepas endocriadas. En todos los casos se utilizaron hembras vírgenes de manera de reducir la variabilidad en el comportamiento materno entre las distintas camadas.

Todos los animales fueron criados en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, donde fueron expuestos a un ciclo de luz:oscuridad 12:12 hs y temperatura constante de 18-22°C. Durante todo el período en que los experimentos fueron realizados los ratones tuvieron a su disposición comida y bebida *ad libitum.*

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo a las normas para el uso de animales de laboratorio del National Institute of Health, Washington DC, USA y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (Protocolo CICUAL Nro. 6/2012).

2.1.1 Obtención de los animales experimentales

Se realizaron apareamientos entre machos y hembras de 8-10 semanas de edad. Cada hembra fue colocada en una jaula junto a un macho por la tarde del denominado día 1. A partir de la mañana del día siguiente, antes de las 10 am, las

hembras fueron controladas para detectar la presencia del tapón vaginal de semen, y en caso de observarse, se consideró a este como el día gestacional 0.5 (GD0.5). Los ratones se mantuvieron juntos hasta el quinto día o bien hasta que fue observada la presencia del tapón vaginal; por la mañana del día 5 todas las parejas restantes fueron separadas.

Las hembras fueron mantenidas en jaulas conteniendo 4 animales hasta el momento del tratamiento, mientras que los machos se mantuvieron en jaulas individuales hasta la siguiente ronda de apareamiento. Aquellas hembras a las que no se les observó tapón vaginal fueron controladas durante 7 días antes de volver a ser utilizadas en la siguiente ronda de apareamiento, de manera de no utilizar hembras preñadas.

En el GD12.5 las hembras fueron aleatoriamente asignadas a un tratamiento y separadas en jaulas individuales. A partir del GD18, las jaulas fueron observadas diariamente entre las 10:00 am y las 02:00 pm de manera de detectar nacimientos. El día del nacimiento fue indicado como día postnatal 0 (P0), y en función de evitar alteraciones en el nido, no se realizaron cambios de viruta en las jaulas durante la primera semana postnatal. Sólo se utilizaron camadas compuestas por 6 a 10 animales; en caso de superar las 10 crías, las excedentes fueron sacrificadas antes de P2. Esto último fue realizado ya que junto con el tamaño de la camada varía el comportamiento y el cuidado de la hembra hacia sus crías, al mismo tiempo que la ganancia de peso de los animales. Al regular el tamaño de las camadas se intentó homogeneizar estos factores.

Las crías fueron destetadas a P21: fueron separadas de su madre y mantenidas en jaulas conteniendo 4 o 5 animales del mismo sexo y tratamiento hasta su utilización en los experimentos. Animales de distintas camadas pertenecientes al mismo tratamiento fueron mezclados al momento del destete de modo de reducir el efecto camada + jaula.

2.2 Tratamiento prenatal

Al alcanzar el GD12.5, cada hembra preñada fue inyectada de manera subcutánea en el pliegue de la nuca con 600 mg/kg de VPA (valproic acid sodium salt; Sigma, St. Louis, MO, USA) en solución salina (grupo VPA) o con solución salina (grupo Sal). El volumen de inyección fue entre 100 y 150 µl, dependiendo del peso del animal.

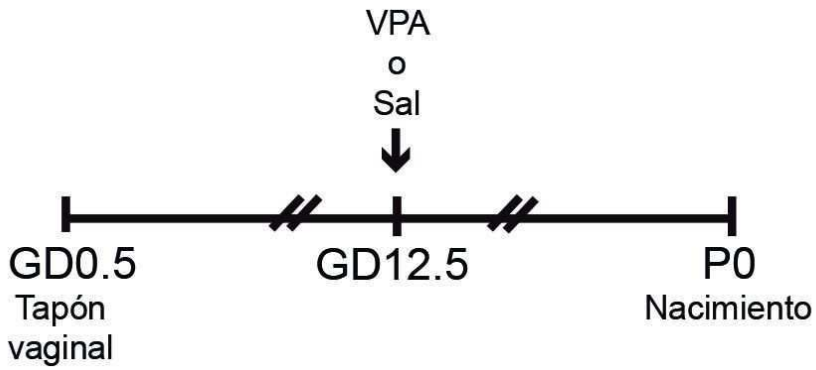

Figura 2.1 - Esquema del tratamiento prenatal administrado. Hembras preñadas fueron inyectadas de manera subcutánea con VPA o Sal en el día de gestación 12.5

2.3 Tratamientos postnatales

Tanto los animales VPA como Sal recibieron tratamientos postnatales según los requisitos de los distintos experimentos.

2.3.2 Administración de LPS

El lipopolisacárido (LPS) es una molécula que puede ser encontrada en la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Es un inflamógeno capaz de

desencadenar una respuesta inmune aguda e inespecífica (Bilbo et al., 2007) de manera independiente del patógeno, es decir sin producir una infección real.

Animales Sal y VPA fueron inyectados intraperitonealmente con 25 µg/kg de LPS (*Escherichia coli* LPS, serotipo 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) disuelto en solución salina estéril (grupo LPS) o con solución salina estéril (grupo SAL). Esta dosis fue elegida debido a que en otros estudios en nuestro laboratorio hemos observado que es capaz de ocasionar un aumento de la corticosterona en plasma 2 hs después de la inyección, y además es suficiente para desencadenar la disminución en la locomoción relacionada con el *sickness behavior*. También es importante mencionar que con dicha dosis los animales se encuentran totalmente recuperados 24 hs post-inyección.

El LPS fue administrado tanto de manera aguda como de manera crónica, dependiendo del experimento realizado.

2.3.2.1. Tratamiento agudo con LPS

En el caso del tratamiento agudo, los animales fueron inyectados con LPS o SAL con el fin de evaluar la respuesta inflamatoria periférica aguda 2 hs después de la inyección en los cuatro grupos experimentales: VPA-LPS, VPA-SAL, Sal-LPS y Sal-SAL.

Las inyecciones se realizaron entre las 8:30 y las 10:00 am de manera de evitar el efecto de las variaciones circadianas en los niveles de corticosterona. Se utilizaron distintas concentraciones de LPS de manera de poder inyectar entre 100 y 150 µl para ratones mayores a P21 y de 50-100 µl para ratones menores a P21, dependiendo del peso de cada ratón.

2.3.2.2. Tratamiento crónico con LPS

En el caso del tratamiento crónico con LPS se realizaron inyecciones de LPS o SAL entre P21 y P35, con el objetivo de evaluar el efecto de una inflamación postnatal prolongada. Las inyecciones se realizaron de manera intraperitoneal, día por medio, entre las 10:00 y las 12:00 hs. Dentro de una jaula correspondiente a animales VPA o Sal, los ratones fueron aleatoriamente asignados a los tratamientos de LPS y SAL, cuidando que en cada jaula cohabitaran animales correspondientes a ambos grupos: VPA-LPS y VPA-SAL, y Sal-LPS y Sal-SAL.

2.4 Análisis comportamentales

Todos los ensayos conductuales fueron realizados en animales adultos, a partir de las 8 semanas de edad. Éstos fueron realizados de manera secuencial en el orden que se presentan, con un intervalo de 7 días entre ensayos.

Previamente a la evaluación se realizó un período de habituación de 30 minutos en la sala donde fueron llevados a cabo los experimentos, con niveles de luz acordes a los distintos requerimientos de los ensayos. El orden de testeo de las jaulas fue establecido al azar, y luego de cada evaluación el animal fue retirado de la arena experimental, identificado y colocado en una jaula limpia. Las arenas y objetos utilizados en los ensayos fueron limpiados con etanol 20% entre sesiones, de manera de eliminar residuos y olores. Una vez completo el análisis de cada jaula, los animales fueron devueltos a su jaula original.

Los ensayos fueron grabados y cuantificados mediante el software de seguimiento digital ANY-maze (Stoelting CO, USA).

2.4.1 Test de Interacción Social (*Social Interaction*)

Con el fin de evidenciar los niveles de interacción social de los animales (Depino et al., 2011), se utilizó un aparato de color negro compuesto por dos compartimentos laterales de 15x15 cm y un compartimento central de 10x15 cm. Estos tres compartimentos se encuentran comunicados por dos aberturas de 7,5 cm de ancho (Figura 2.2 A) a través de los cuales el ratón experimental puede circular libremente. En los compartimentos laterales se colocaron dos cilindros de Plexiglass transparente de 7,5 cm de diámetro, con agujeros que permiten que el ratón atraviese el tubo con su hocico. La base del aparato fue cubierta con viruta, que fue reemplazada por viruta limpia luego del testeo de cada ratón. La intensidad lumínica en la sala fue de 25 lux.

El ensayo consta de una primera fase de habituación, donde al animal se le permite explorar libremente la arena experimental durante 5 minutos; y una segunda fase de testeo de 10 minutos. Entre ambas fases fue colocado en uno de los cilindros un ratón juvenil de entre 21 y 28 días de edad y mismo sexo que el ratón experimental, de manera de evitar interacciones de tipo sexual o comportamientos agresivos; mientras que en el otro cilindro se colocó un objeto pequeño a manera de control. El compartimento con el ratón fue denominado “lado social” (LS) y el compartimento con el objeto “lado no social” (LNS). Durante ambas fases se cuantificó el tiempo de exploración olfatoria del ratón sobre cada uno de los cilindros. Se consideró como exploración activa los momentos en los que el animal se encontró con el hocico dentro de alguno de los orificios del cilindro o dirigido hacia él a una distancia menor a 1 cm.

2.4.2 Test de Auto-acicalamiento (*Self-Grooming*)

El acicalamiento o *grooming* es un comportamiento típico de los roedores, que puede ser desencadenado por situaciones estresantes (Crawley, 2012). Para evaluar

este comportamiento se utilizaron tubos de Plexiglass transparente de 5,5 cm de diámetro y 20 cm de alto, con uno de los extremos abiertos por donde se introdujo al ratón (Figura 2.2 B). Posteriormente éste fue cubierto con un barbijo de manera de evitar la salida del animal. El ensayo se realizó a lo largo de 3 días consecutivos. En los primeros dos el ratón fue habituado al tubo durante 60 minutos. En el tercer día fue cuantificado el tiempo de acicalamiento durante 10 minutos, luego de un período de 10 minutos de habituación.

2.4.3 Test de Campo Abierto (*Open Field*)

Este ensayo permite evaluar los niveles de comportamientos relacionados con la ansiedad (Bailey, 2009) en un ambiente novedoso, amplio y con un centro iluminado y desprotegido. Bajo estas condiciones altamente ansiogénicas se cuantifican los niveles de locomoción.

El animal fue colocado dentro de la arena experimental, consistente en una caja negra de 30x45x45 cm (Figura 2.2 C) bajo una intensidad lumínica de 100 lux. La arena fue dividida en dos secciones, el centro, un cuadrado ubicado a 13 cm de distancia de las paredes, y la periferia. Se cuantificó durante 10 minutos la distancia total recorrida por el animal, y el tiempo transcurrido y la distancia recorrida en el centro y en la periferia.

2.5 Análisis histológico

2.5.1 Procesamiento de los tejidos

Los animales fueron profundamente anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg) administrada a través de una

inyección intramuscular. Por razones de tamaño de los animales, en el caso de ratones menores a P21 la inyección fue realizada de manera intraperitoneal.

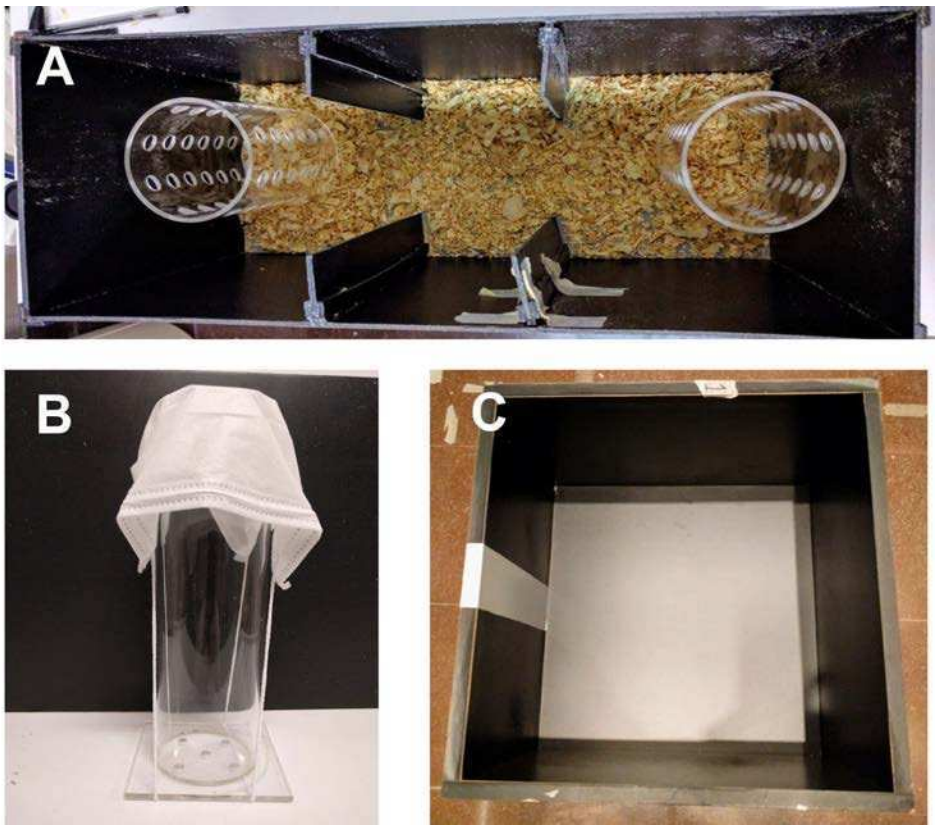

Figura 2.2 - Aparatos empleados en los ensayos comportamentales. (A) Aparato de tres compartimientos utilizado en el ensayo de interacción social, (B) tubo donde se evaluó el autoacicalamiento y (C) arena experimental del test de campo abierto.

A partir de P14, los animales fueron perfundidos transcardíacamente con solución salina heparinizada (0,9% NaCl, 0,20 U/ml heparina) seguida de una solución fría de paraformaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2. Las perfusiones fueron realizadas a flujo constante utilizando una bomba peristáltica (LKB 2115, LKB-produkter AB, Zurich, Suiza). Los cerebros fueron extraídos, post-fijados en PFA por 4 hs a 4°C y criopreservados en una solución de sacarosa 30% en PB 0,1 M a 4°C. Este procedimiento no fue realizado en los ratones P7 por impedimentos de

tamaño, en cambio éstos fueron rápidamente decapitados y sus cerebros post-fijados en PFA por 24 hs, antes de ser criopreservados en sacarosa 30%.

Todos los cerebros fueron congelados con isopentano (J. T. Baker, NJ, USA) en baño de etanol y hielo seco y posteriormente seccionados de manera seriada en crióstato (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania). Los cerebros entre P7 y P42 fueron seccionados completos cada 20 µm de manera sagital, montados en portaobjetos gelatinizados y mantenidos a -20 °C hasta su utilización. Los cerebros de animales adultos fueron seccionados de manera coronal y los cerebelos sagitalmente, cada 40 µm, y almacenados a -20 °C en solución de criopreservación (3 vol de glicerol, 3 vol de etilenglicol, 4 vol de PB 0,1M) en placas multiwell hasta su utilización.

2.5.2 Inmunofluorescencia

Con el fin de evaluar el estado inflamatorio en los cerebros, se realizaron diversos análisis de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos primarios para proteínas específicas de los diversos tipos celulares de interés, reconocidos por anticuerpos secundarios fluorescentes. En todos los casos se utilizó suero de burro (*donkey serum,* Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA*)* de manera de bloquear el pegado inespecífico de proteínas.

Al finalizar cada protocolo las muestras fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y se esperó su secado durante 60 min, antes de agregarles solución de montado de fluorescencia (13% Mowiol 4-88, 33% glicerol en Tris 0,2 M pH 8,5) y los cubreobjetos.

2.5.2.1 GFAP

Para evaluar el estado astroglial se realizó un análisis de inmunofluorescencia anti-*glial fibrillary acidic protein* (GFAP), un filamento intermedio expresado por

astrocitos en reposo, cuya expresión es aumentada durante la astrocitosis, permitiéndonos utilizar dicha proteína como marcador de astrocitos.

Las muestras fueron lavadas y permeabilizadas repetidas veces con PBS-Tx 0,1%, incubadas durante 45 minutos en solución de bloqueo (suero de burro 1% en PBS-Tx 0,1%) seguido de incubación con el anticuerpo primario de conejo anti-GFAP (1:700, DAKO, Glostrup, Dinamarca) durante toda la noche en agitación. Al día siguiente se lavó con PB y se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1:200, Jackson, Baltimore, USA) durante 2 hs en oscuridad. Por último, las muestras se lavaron con PB.

2.5.2.2 IBA1

Para el análisis microglial se realizó un análisis de inmunofluorescencia anti-*ionized calcium-binding adaptor molecule* 1 (IBA1), una proteína de unión a calcio específica de macrófagos y microglía.

Al fijar los tejidos se altera la estructura proteica tridimensional, algunos antígenos son resistentes al procesado con formaldehído, pero otros pierden su reactividad inmunológica. Mediante las técnicas de desenmascaramiento se busca restaurar la conformación de los epítopes. En este caso fue necesario aplicar un protocolo de recuperación de antígeno (*antigen retrieval)* luego de lavar y permeabilizar las muestras con PBS.

Las muestras de P7 a P42, ya montadas en portaobjetos gelatinizados, fueron incubadas con 250 ml de buffer citrato (citrato de sodio 10 mM, Tween 20 0,05%, pH 6) en un recipiente plástico y calentadas en el microondas en tres etapas diferentes con 5 minutos de separación, reemplazando el buffer por uno nuevo cada vez (1 min a potencia máxima, 2 min a potencia media dos veces). Las muestras de animales adultos fueron incubadas con 2 ml de buffer citrato en una placa multiwell en baño térmico a 85 °C durante 20 minutos. Posteriormente, para ambos casos se incubó con solución de bloqueo (suero de burro 1% en PBS-Tx 0,1%) por 60 minutos, seguido del

anticuerpo primario de conejo anti-IBA1 (1:3000, WAKO, Osaka, Japón) por dos noches a 4°C en agitación. Dos días después, se realizaron cuatro lavados consecutivos, uno con PBS-Tx 0,1%, uno con PBS y dos con PB. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1:200, Jackson, Baltimore, USA) durante 2 hs en oscuridad. Para finalizar, las muestras se lavaron con PB.

2.5.3 Obtención y análisis de imágenes

Se obtuvieron fotografías de los preparados con un microscopio confocal Olympus FV300/BX61 (número de campo 20) con un aumento de 400x. Las imágenes de Z stack fueron tomadas cada 1 µm y analizadas con los software de procesamiento de imágenes OlympusFluoview viewer (Versión 04.01.02.02, Olympus Co.) e ImageJ (Versión 1.48, NIH, USA). Para cada marcador, se fotografiaron entre 3 y 5 secciones por animal en cada estructura cerebral analizada.

Se estudiaron tres regiones, corteza prefrontal, cerebelo e hipocampo; debido a que existen evidencias de que dichas áreas se encuentran afectadas en el autismo. Dentro del cerebelo, el análisis fue limitado al lóbulo VII, donde se realizó una subdivisión en dos zonas: capa granular (incluyendo los núcleos de las neuronas granulares y de células de Purkinje) y capa molecular (Figura 2.3 A). Para el hipocampo se tomaron fotografías en dos áreas, CA1 y Giro Dentado (GD), las cuales a su vez fueron subdivididas en tres zonas: *Stratum Oriens,* capa piramidal y *Stratum Radiatum* para CA1 (Figura 2.3 B) y capa granular, capa molecular y Hilus para GD (Figura 2.3 C).

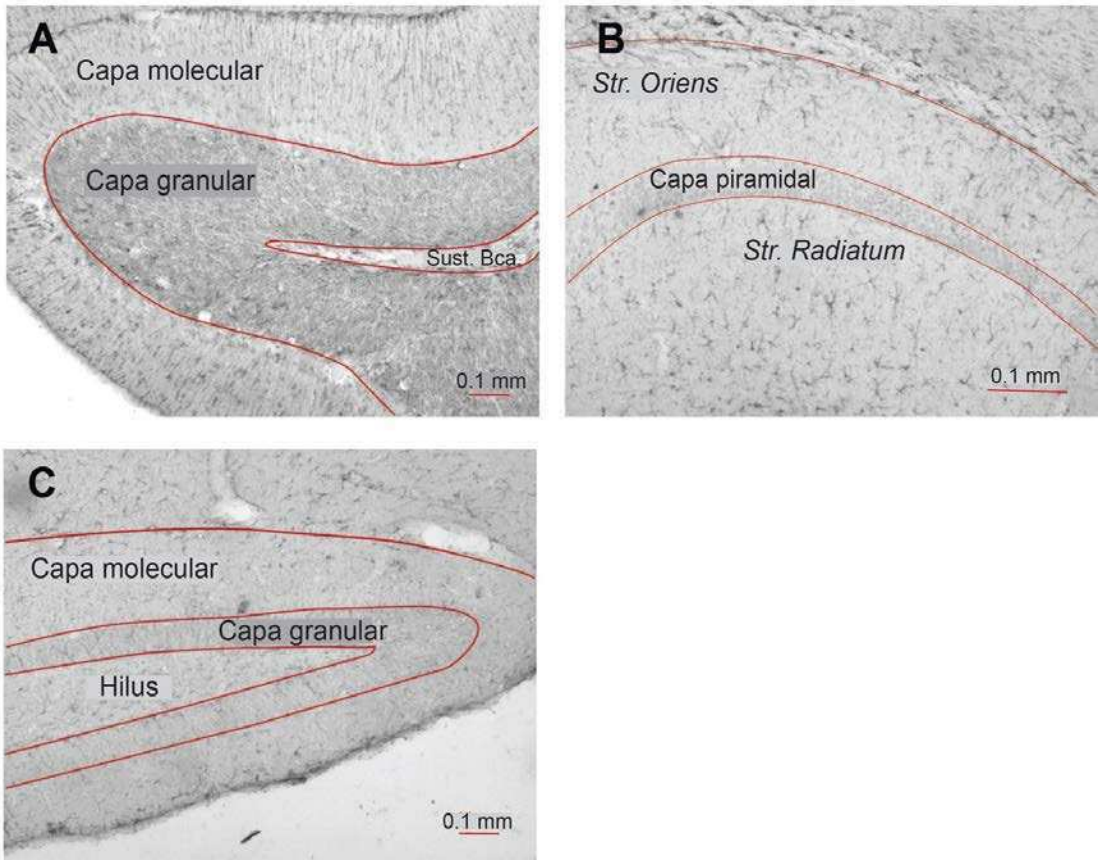

Figura 2.3 - Subdivisión de las regiones cerebrales estudiadas. Se muestran las distintas zonas analizadas en (A) el lóbulo VII del cerebelo, (B) CA1 y (C) el giro dentado.

2.5.3.4 Cuantificación de densidad celular

En cada fotografía de cada región de estudio se delimitaron las zonas y se midió el área de cada una, que junto con el z stack permitieron calcular el volumen del tejido. Al contar el número de células dentro de cada zona fue posible cuantificar la densidad celular.

En el caso de los astrocitos, simplemente se contó el número de células GFAP+. En el caso del análisis de la microglía, las células IBA1+ fueron cuantificadas teniendo en cuenta los distintos estadios morfológicos adoptando la clasificación de

activación de la microglía de Kreutzberg (Kreutzberg, 1996). Se separaron las células en Tipo I, aquellas con procesos largos, finos y ramificados; células Tipo II-III, poseedoras de procesos cortos y gruesos y células Tipo IV, aquellas con cuerpo celular redondo y procesos prácticamente ausentes (Figura 2.4).

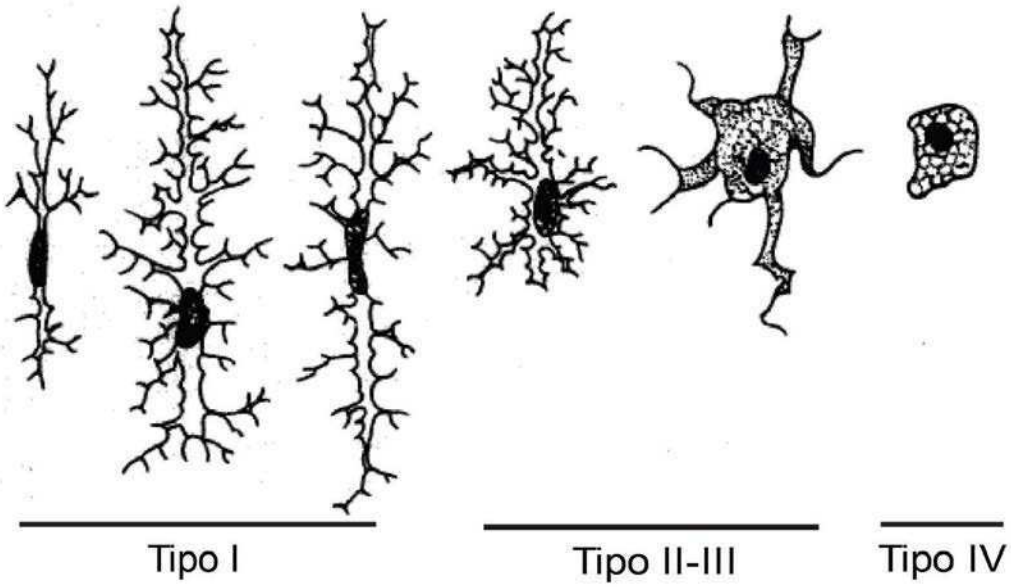

Figura 2.4 - Estadios de activación de las células microgliales según su morfología. De izquierda a derecha, desde el estado de reposo al de máxima activación, donde se asemejan a células fagocíticas (Kreutzberg, 1996).

2.5.3.5 Cuantificación de área marcada

Debido a las características morfológicas de la astroglia en el cerebelo, resulta imposible distinguir una célula de la otra, impidiendo la cuantificación de la densidad celular como en el resto de las regiones. Por ende, fue necesaria la cuantificación del área GFAP+.

Se midió el porcentaje de área inmunoreactiva para GFAP estableciendo el umbral de modo que todas las células inmunopositivas y sus procesos fueran

seleccionadas. Luego, al delimitar una zona se midió el porcentaje de área ocupada por astrocitos.

2.6 Radioinmunoensayo

Fue evaluada la respuesta periférica aguda de los animales ante un estímulo inflamatorio, a través de la cuantificación de los niveles de corticosterona en plasma mediante radioinmunoensayo (RIA).

Animales VPA y Sal fueron inyectados con LPS o SAL entre las 8:30 am y las 10:00 am, con el fin de evitar el efecto de las variaciones circadianas en los niveles de corticosterona. Los animales fueron profundamente anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg) y sacrificados 2 hs después de la inyección, dado que este tiempo ha sido evidenciado como el pico de los niveles de corticosterona en sangre después de una inyección de LPS (Pitossi et al., 1997). La sangre de ratones P7 fue recolectada por decapitación, mientras que en el resto de los animales se extrajo sangre troncal desde el corazón con aguja y jeringa heparinizadas. La sangre fue colectada en tubos eppendorf heparinizados, se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó 15 minutos a 1000g. Por último se separó el plasma, que fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

La extracción de esteroides fue realizada partiendo de 100 µl de plasma; en el caso de los ratones P7 fue necesario utilizar plasma proveniente de dos ratones para alcanzar dicho volumen. Se añadieron 3 vol de éter etílico y se guardaron las muestras a -80 °C durante 30 minutos, de manera que el congelamiento evidenciara las dos fases. Se extrajo la fase orgánica y se repitió el procedimiento, añadiendo 2 vol de éter. Ambas fases orgánicas se reservaron en un tubo eppendorf, que se dejó en campana hasta evaporar completamente el solvente. Las muestras fueron resuspendidas en 100 µl de buffer B (Tris 0,05 M pH 8, NaCl 0,1 M, Azida sódica 0,1%, BSA 0,1%).

De manera de poder estimar la concentración de corticosterona en las muestras, se realizó una curva de calibración de concentraciones conocidas de corticosterona a partir de una solución estándar de 2 µg/ml de hormona fría en etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y una cantidad fija de hormona marcada (10000 dpm 1,2,6,7-^{3}H(N)-corticosterona, Perkin-Elmer, Whaltman, MA, USA) con una actividad específica de 70000 Ci/mmol. Esta curva abarcó un rango de concentraciones entre 200 pg/ml y 2500 pg/ml.

El ensayo fue llevado a cabo siguiendo el protocolo provisto por el fabricante del anticuerpo anti-corticosterona (C8784, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). En un tubo eppendorf fueron colocados 100 µl de solución estándar o muestra con 500 µl de una dilución 1:30 de anticuerpo anti-corticosterona en buffer AB (Tris 0,05 M pH 8, NaCl 0,1 M, Azida sódica 0,1%) y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a cada tubo se le añadieron entre 100 y 200 µl de corticosterona marcada (1:10000 en buffer B) y se dejó incubando a lo largo de la noche a temperatura ambiente. El volumen de hormona marcada a utilizar se determinó como aquel en el que se hallaran 10000 dpm. Al día siguiente, la reacción se detuvo colocando los tubos en hielo durante 15 minutos, y luego se añadió a cada uno 200 µl de una solución de carbón activado 0,5% con dextrano 0,05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) en buffer B, fría y en suspensión. Se incubaron los tubos en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 2000g durante 15 minutos a 4 °C. Se retiraron 700 µl del sobrenadante y se colocaron en un tubo transparente de polipropileno, se añadieron 1000 µl de líquido de centelleo (Optiphase Hisafe 3, Perkin-Elmer, Whaltman, MA, USA) y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo WALLAC.

Las cuentas totales fueron determinadas incubando la solución de corticosterona marcada en ausencia de corticosterona fría o muestra, anticuerpo y solución de carbón-dextrano. La unión no específica fue establecida incubando la corticosterona marcada en ausencia de corticosterona fría o muestra y anticuerpo, pero añadiendo solución de carbón-dextrano. El porcentaje de máxima unión fue calculado mediante la incubación de corticosterona marcada en presencia de

anticuerpo y solución de carbón-dextrano, pero en ausencia de corticosterona fría o muestra.

Los controles y puntos de la curva de calibración fueron realizados por triplicado, mientras que las muestras fueron corridas por duplicado.

2.7 Análisis epigenético

Se analizaron los niveles de acetilación de histonas, particularmente histona H3, de los animales Sal y VPA en cerebelo e hipocampo.

2.7.1 Extractos enriquecidos en histonas

Los extractos de proteínas nucleares enriquecidos en histonas fueron obtenidos según un protocolo descrito previamente (Federman et al., 2012). Los animales fueron profundamente anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg) y tras la decapitación fueron extraídos y procesados los cerebelos e hipocampos. Todos los procedimientos se realizaron a 4 °C. Los tejidos fueron colocados en un homogeneizador teflón-vidrio con 250 µl de buffer A (HEPES 10 mM, pH 7,8, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 10 mM, DDT 1 mM, butirato de sodio 5 mM) y homogeneizados mediante un motor tipo taladro con 12 movimientos del émbolo. El homogenato fue centrifugado a 7000 g durante 1 minuto, y el precipitado resuspendido en 200 µl de solución ácida de H_2SO_4 (180 µl de buffer A, DTT 0,5 mM, PMSF 1,5 mM, 20 µl de H_2SO_4 1,83 M). Se incubó durante 30 minutos en hielo de manera de extraer las histonas desde la fracción nuclear, y posteriormente se centrifugó a 14500 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf y las proteínas se precipitaron en 1200 µl de acetona a -20 °C durante toda la noche. El precipitado de proteínas básicas nucleares fue recogido por

centrifugación a 14500 g por 30 minutos, y el pellet resuspendido en 100 µl de buffer de siembra. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

2.7.2 *Western Blot*

Las muestras fueron incubadas a 100 °C en baño térmico seco durante 5 minutos e inmediatamente transferidas a hielo. Las proteínas fueron corridas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con acrilamida 15 % y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, para la detección con anticuerpos específicos. Las membranas fueron reveladas con anticuerpos primarios anti-histona H3 total (goat anti-histone H3, 1:2000, Abcam, Boston, USA) y anti-histona H3 acetilada (rabbit anti-acetyl histone H3, 1:5000, Millipore, Temecula, USA) según las especificaciones del fabricante. La detección fue llevada a cabo mediante los anticuerpos secundarios fluorescentes IRDye680RD burro anti-conejo e IRDye800CW burro anti-cabra (1:20000, LI-COR Biosciences, Lincoln, USA), y el sistema de detección Odyssey (Odyssey CLx(LI-COR) infrared imaging system). A partir de las imágenes se estimó la densidad óptica relativa mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ (Versión 1.48, NIH, USA). Cada membrana fue analizada con ambos anticuerpos con el fin de determinar la relación histona H3 acetilada/histona H3 total. El valor de esta relación de cada grupo fue normalizado al valor promedio del grupo Sal.

2.8 Análisis estadístico

Fueron utilizadas distintas pruebas estadísticas según los requisitos de los datos y el análisis lo exigiesen, detallado en cada sección.

De manera general, dado que el tratamiento con Sal o VPA es aplicado sobre la madre preñada, las crías no son unidades independientes. Las crías provenientes de la misma camada podrían ser más similares entre sí que ante otras crías, tanto

comportamental como fisiológicamente, lo que se conoce como efecto camada. Este efecto puede ser tenido en cuenta y evaluado mediante pruebas estadísticas apropiadas.

En los ensayos comportamentales fueron utilizados animales provenientes de la misma camada, por lo que se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) anidado, de uno o dos factores según correspondiere, teniendo en cuenta a la camada de origen como subgrupo. Para ello se utilizó el software InfoStat (versión 2016, InfoStat Group, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

En el resto de los análisis se utilizó un sólo animal proveniente de cada camada, por lo que fueron realizados ANOVA de uno o dos factores, según el caso.

En caso de hallar algún efecto principal o interacción entre los factores, se utilizó el test post-hoc LSD de Fisher para detectar significancias entre los grupos. En todos los casos se asumió la significancia estadística cuando $p < 0.05$.

3

Caracterización de los efectos del VPA sobre el estado inflamatorio y sobre el comportamiento social en machos y hembras adultos

3. Caracterización de los efectos del VPA sobre el estado inflamatorio y sobre el comportamiento social en machos y hembras adultos

El modelo de exposición prenatal a VPA ha sido utilizado en el laboratorio con el objetivo de estudiar el rol de los procesos inflamatorios en el desarrollo de los comportamientos relacionados con el autismo. En la sección 1.6.4.1 hemos mencionado, entre otros antecedentes de nuestro grupo, que los animales VPA macho adultos presentan una reducción en la sociabilidad y una respuesta exacerbada central y periférica a un estímulo inflamatorio. Además, muestran también signos de activación microglial crónica en el cerebelo (Lucchina y Depino, 2013). Todo esto sugiere una conexión entre procesos inmunológicos alterados y los comportamientos relacionados con el autismo.

La mayor parte de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas, incluyendo a los TEA, ha sido realizada en animales macho (Berkley, 1992; Blanchard et al., 1995; Sechzer et al., 1994); principalmente debido a la creencia de que los ensayos realizados con hembras presentan mayor variabilidad, dada por la evaluación de animales que se encuentran en distintas fases de su ciclo estral. En el caso de los TEA, tanto en el modelo VPA como en otros, el sesgo es comúnmente justificado debido a la mayor incidencia del desorden en niños que en niñas (Kim et al., 2013; Zablotsky et al., 2015).

Esto representa una problemática en el estudio del autismo, ya que son necesarios estudios sexo-específicos de manera de asistir en la comprensión de los síntomas particulares observados en las niñas. De manera de intentar equilibrar este sesgo, y dado que nuestro objetivo general es dilucidar el rol de la respuesta inflamatoria en el desarrollo del autismo, y uno de nuestros objetivos específicos es

evaluar el efecto del sexo en el modelo VPA, nos propusimos caracterizar inflamatoria y conductualmente a los animales hembra utilizando este modelo. No obstante, de manera de poder realizar comparaciones de forma directa sobre los efectos del tratamiento sobre ambos sexos, los análisis fueron también realizados en animales macho. Se realizaron distintos ensayos para evaluar los distintos parámetros de interés en animales adultos prenatalmente expuestos a una inyección de Sal o VPA (Figura 3.1), detallados en las siguientes secciones.

Figura 3.1 - Esquema experimental general. En la adultez se realizaron los ensayos de interacción social (IS), radioinmunoensayo (RIA) e inmunofluorescencia (IF).

3.1 Interacción Social

Una de las características principales del modelo con el cual trabajamos es la reducción en la interacción social en la adultez. Este hecho ha sido validado numerosas veces en nuestro laboratorio con ratones macho, mediante un test de interacción social.

Decidimos analizar hembras y machos simultáneamente, de manera de poder contar con un control interno del ensayo, y además poder comparar el efecto de ambos factores, sexo y tratamiento prenatal. Se cuantificó el tiempo que los animales pasaron explorando tanto a un objeto como a un ratón estímulo. Al realizar un ANOVA anidado de dos factores, encontramos un efecto del tratamiento prenatal ($F_{(1, 40)} = 6.37$;

p = 0.025) y un efecto del sexo ($F_{(1, 40)}$ = 4.13; p = 0.045). Puede observarse que mientras los machos VPA muestran niveles reducidos de sociabilidad, las hembras VPA exploran al ratón estímulo en una proporción de tiempo similar a las hembras Sal (Figura 3.2 A).

Este mismo fenómeno puede observarse en la Figura 3.2 B, tanto los ratones Sal ($F_{(1, 24)}$ = 6.88; p = 0.015) y VPA ($F_{(1, 20)}$ = 8.43; p = 0.009) hembras, como los ratones Sal machos ($F_{(1, 28)}$ = 6.69; p = 0.015) pasan una cantidad de tiempo significativamente mayor explorando el lado social del aparato, que contiene al ratón estímulo, frente al lado no social, que contiene al objeto. En cambio, esta exploración diferencial se encuentra ausente en los ratones VPA machos ($F_{(1, 34)}$ = 0.83; p = 0.368), quienes pasan la misma cantidad de tiempo olfateando al ratón y al objeto.

Estos resultados sugieren que la administración prenatal de VPA afecta los niveles de sociabilidad en la adultez de manera sexo-específica. Si tenemos en cuenta además que los animales provienen de las mismas camadas, es decir que comparten el trasfondo genético y el ambiente pre y postnatal, la anterior afirmación adquiere mayor solidez.

3.2 Respuesta inflamatoria periférica

Estudios previos realizados en el laboratorio examinaron los efectos del VPA en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), utilizando una inyección de LPS como estímulo inflamatorio y evaluando los niveles de corticosterona en plasma 2 hs después, a través de un radioinmunoensayo (Figura 3.3).

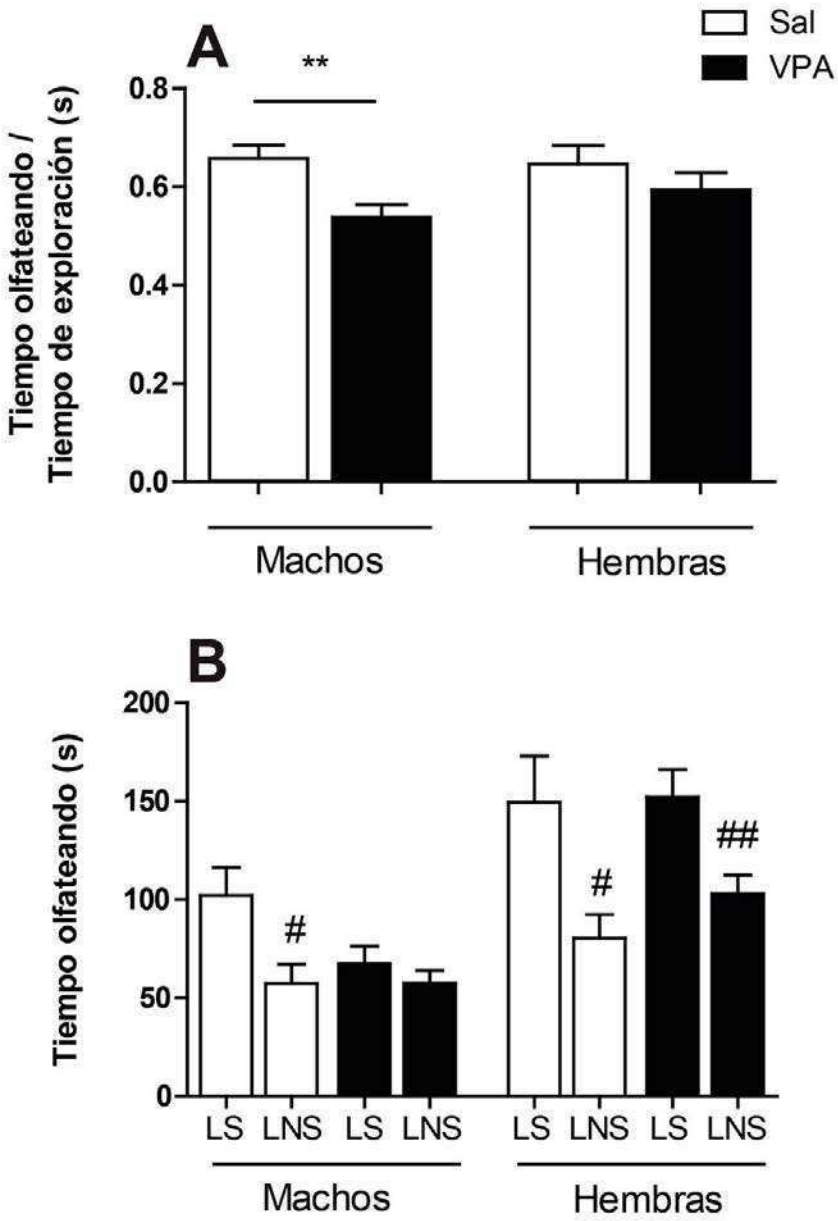

Figura 3.2 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la interacción social en animales machos y hembras durante la adultez. Se cuantificó la proporción del tiempo que los animales pasaron olfateando al ratón estímulo sobre el tiempo total de exploración. Los animales VPA machos mostraron menores niveles de exploración social (A). Al mismo tiempo, estos ratones son los únicos que no presentan una preferencia por el lado social (B). N machos: Sal = 15, VPA = 18; N hembras: Sal = 12, VPA = 11. Test LSD de Fisher: ** $p < 0.01$. ANOVA de un factor: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$. Se grafica la media + SEM. LS, lado social; LNS, lado no social.

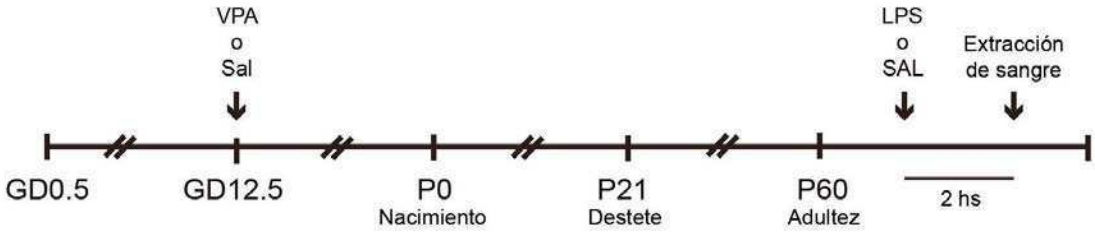

Figura 3.3 - Esquema experimental del estudio de la respuesta inflamatoria periférica en la adultez.

La inyección intraperitoneal de LPS, un inflamógeno presente en la membrana externa de las bacterias gram-negativas, desencadena una respuesta inflamatoria aguda (Bilbo et al., 2007), por lo que puede utilizarse para simular una infección bacteriana de manera independiente del patógeno. Este modelo ha sido utilizado ampliamente para estudiar respuestas inflamatorias agudas tanto de manera periférica como central (Pitossi et al., 1997).

Al realizar un ANOVA de dos factores no se hallaron diferencias en los niveles basales de corticosterona en plasma entre los grupos VPA y Sal. Sin embargo, la inyección de LPS activó el eje HPA en ambos grupos ($F_{(1,\ 13)} = 32.31$; $p < 0.001$), provocando la liberación de mayores niveles de corticosterona, como era esperado. Dado que no fue hallada una interacción entre los factores, la respuesta inflamatoria periférica no se encuentra exacerbada en machos adultos CF1 (Figura 3.4). Nota: estos datos corresponden a parte de un experimento realizado por el Lic. Marcos Campolongo en el marco de su tesis doctoral.

Realizamos este mismo experimento en animales hembra y machos simultáneamente, con los animales utilizados en el ensayo de interacción social. Dado que nos interesa particularmente comparar la respuesta de los animales expuestos a la inyección de LPS, y debido también a limitaciones en el número de animales, en ratones macho sólo se estudiaron los grupos Sal-LPS y VPA-LPS.

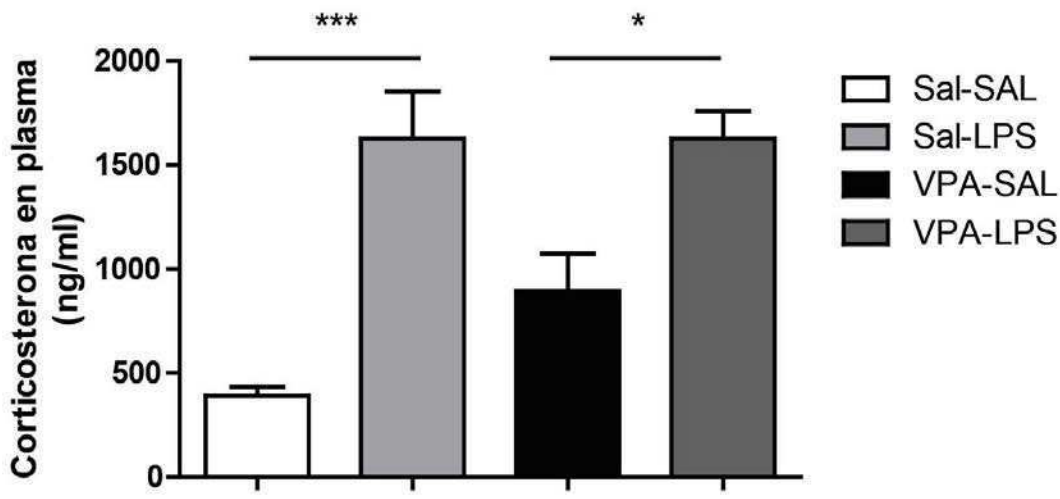

Figura 3.4 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA en la respuesta inflamatoria periférica ante un estímulo inflamatorio en animales macho durante la adultez. Se midieron los niveles de corticosterona en plasma 2 hs luego de la administración de LPS intraperitoneal, por medio de radioinmunoensayo. Ambos grupos responden de manera normal al estímulo inflamatorio. N: Sal-SAL = 4, Sal-LPS = 5, VPA-SAL = 4, VPA-LPS = 4. Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Se grafica la media + SEM

Debido a que no contábamos con animales de ambos sexos en todos los grupos experimentales, el análisis estadístico se realizó separando los datos de ambos sexos. Utilizando un ANOVA de un factor no pudieron encontrarse diferencias significativas en la respuesta inflamatoria de los ratones machos de ambos grupos, al igual que en el caso anterior (Figura 3.5). Para analizar a las hembras fue aplicado un ANOVA de dos factores que no mostró diferencias en los niveles basales de corticosterona, pero sí un aumento de corticosterona en plasma ante la administración de LPS ($F_{(1, 21)} = 124.61$; $p < 0.001$). Además, el ANOVA reveló una interacción significativa entre ambos factores ($F_{(1, 21)} = 6.61$; $p = 0.018$), por lo que puede concluirse que ante un estímulo inflamatorio las hembras VPA presentan una mayor liberación de corticosterona que las hembras Sal (Figura 3.5).

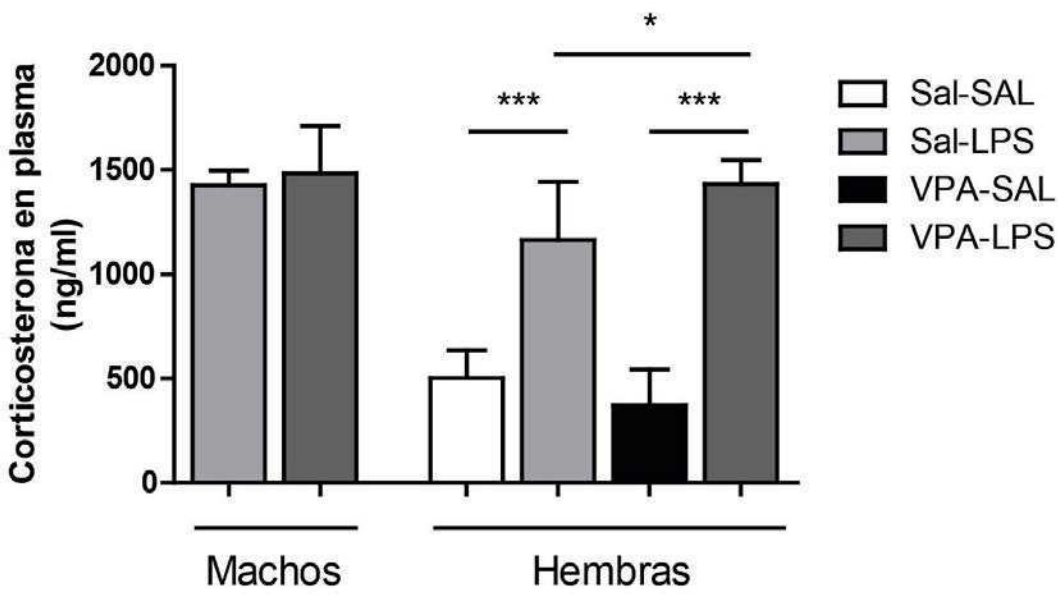

Figura 3.5 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA en la respuesta inflamatoria periférica ante un estímulo inflamatorio en animales machos y hembras durante la adultez. Aunque las hembras de ambos grupos responden al LPS aumentando la liberación de corticosterona, las hembras VPA presentan una mayor respuesta. Este fenómeno de exacerbación no se presenta en los animales machos. N machos: Sal-LPS = 4, VPA-LPS = 5; N hembras: Sal-SAL = 5, Sal-LPS = 7, VPA-Sal = 6, VPA-LPS = 7. Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Se grafica la media + SEM.

Podemos hablar, entonces, de una exacerbación de la respuesta inflamatoria periférica ante un estímulo inflamatorio en las hembras VPA. Este hecho contrasta con lo observado en machos, quienes no presentan alteraciones en su respuesta al LPS.

3.3 Neuroinflamación

Con el objetivo de caracterizar el estado inflamatorio central, estudiamos la activación astro y microglial. Decidimos enfocarnos en el hipocampo, el cerebelo y la

corteza prefrontal, ya que dichas regiones se encuentran vinculadas con los comportamientos relacionados con el autismo observados en nuestro modelo. Dentro del hipocampo y el cerebelo existen distintas zonas que pueden distinguirse por los cambios en la densidad y morfología de sus células. De manera de evitar que estas variaciones anatómicas naturales pudieran enmascarar algún posible efecto del tratamiento, decidimos analizarlas por separado, como se detalla en la sección 2.5.3.

En esa sección también pueden encontrarse detalladas la metodología y especificaciones del análisis. Brevemente, cuantificamos la densidad celular de astrocitos y área GFAP positiva, y la densidad celular de cada tipo de células microgliales: tipo I, tipo II-III y tipo IV. Esto último fue realizado de manera de estimar el nivel de activación de la microglía, clasificando las células según su morfología. En todas las zonas estudiadas las células de tipo I comprendieron la mayoría celular en ambos grupos, mientras que las células de tipo IV prácticamente no fueron observadas.

En una primera instancia caracterizamos a los animales hembras, y posteriormente, en caso de observar efectos en alguna región en particular, fueron analizados también los animales machos.

3.3.1 Corteza prefrontal

Ambos tipos de células gliales mostraron una distribución homogénea a lo largo de la corteza prefrontal en los animales Sal y VPA. No se encontraron diferencias en la densidad celular de astrocitos ni en la de células microgliales (Figura 3.6)

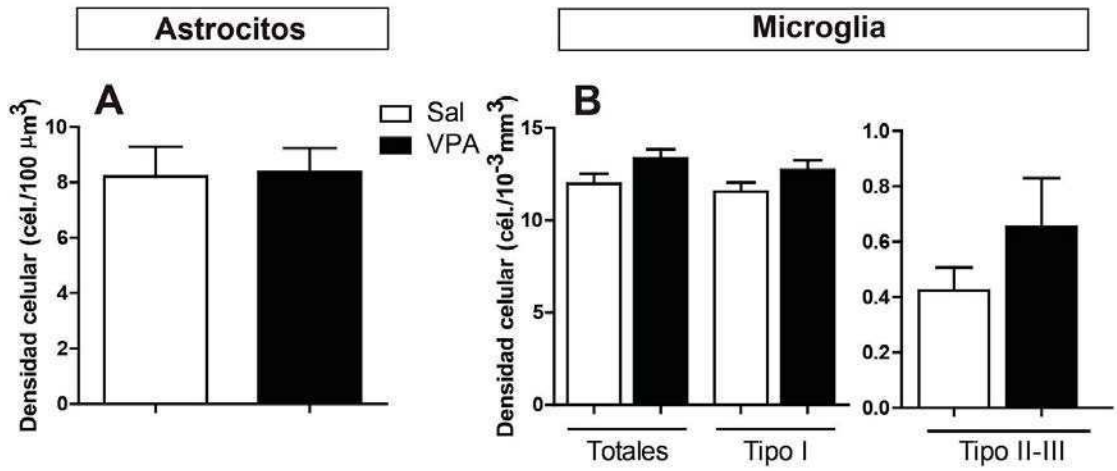

Figura 3.6 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA en la densidad glial en la corteza prefrontal en animales hembra durante la adultez. No fueron encontradas diferencias en la densidad celular de astro y microglía. Se grafica la media + SEM

Podemos concluir que la exposición prenatal a VPA no afecta la activación glial en la corteza prefrontal en hembras adultas.

3.3.2 Hipocampo

Analizamos ambas regiones del hipocampo, el giro dentado (GD) y la CA1. Dividimos el giro dentado en tres zonas, las capas granular y molecular, y el hilus. Sin embargo, en ninguna de ellas encontramos alteraciones en la densidad astro y microglial (Figura 3.7).

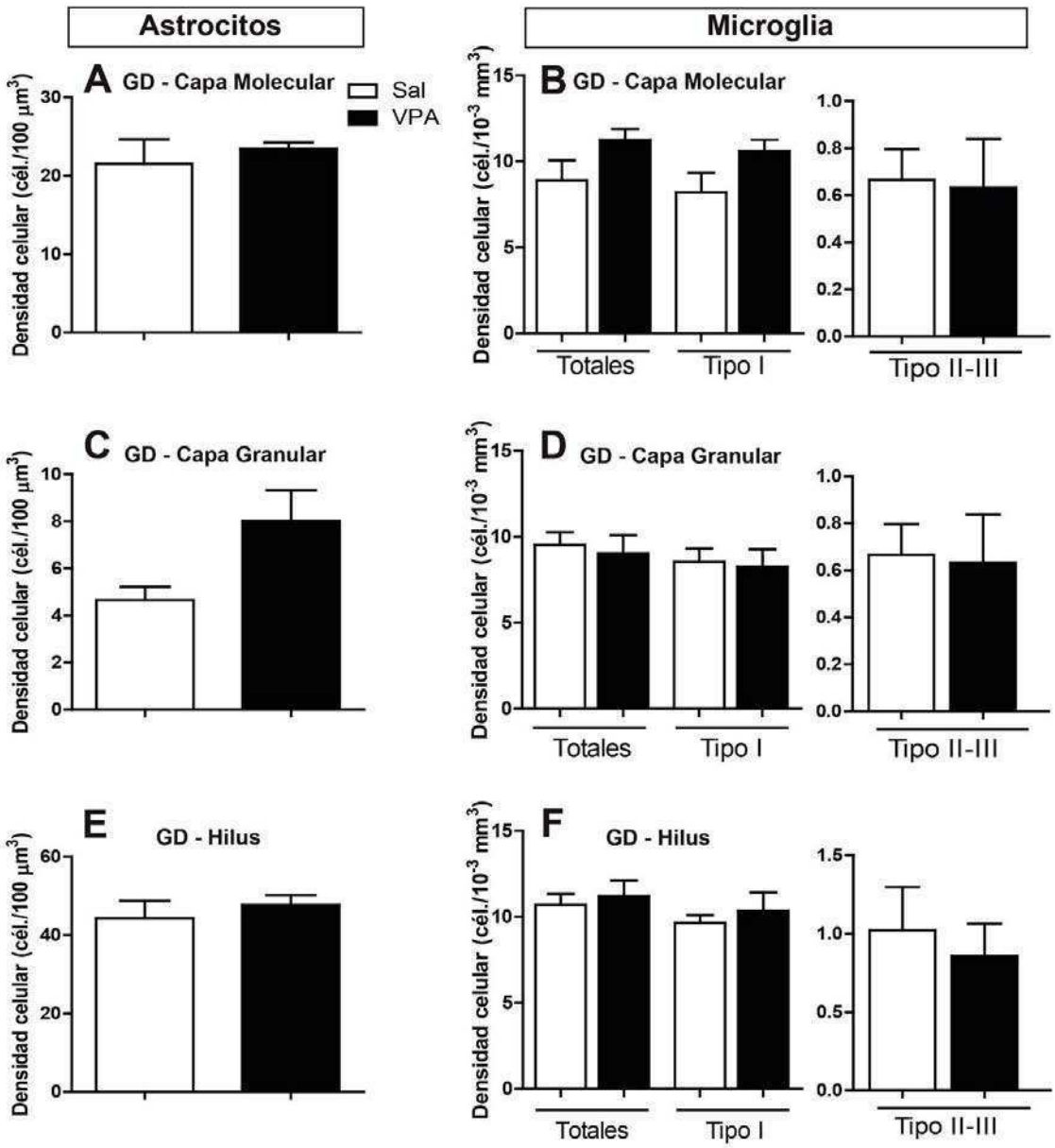

Figura 3.7 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA en la densidad glial en el giro dentado en animales hembras durante la adultez. No existen diferencias en la densidad de astrocitos ni de células microgliales en la capa molecular (A, B), capa granular (C, D) y hilus (E, F) del giro dentado. Se grafica la media + SEM. GD: giro dentado.

En cuanto a CA1, también fue dividido en tres zonas: *stratum oriens,* capa piramidal y *stratum radiatum.* Encontramos que la densidad microglial de los animales VPA no difiere en cuanto a la de los animales Sal para ningún tipo celular, con excepción de la capa piramidal. En esta zona, las hembras expuestas a VPA presentan una menor densidad de células de tipo II-III ($F_{(1, 7)} = 16.06$; $p = 0.005$), aunque no presentan diferencias en la densidad de células totales o de tipo I (Figura 3.8 D). El tratamiento con VPA no produjo cambios en la densidad celular astrocítica en ninguna de las zonas de CA1 (Figura 3.8 A, C, E).

Dado que la capa piramidal ocupa un área pequeña en cada foto de la región CA1, y las células tipo II-III no son especialmente abundantes (en ningún caso se contó más de una por foto), creemos que este resultado es muy sensible a errores de tipo humano. Por ello, y teniendo en cuenta además que no se hallaron alteraciones en ninguna otra región hipocampal, consideramos que no debe tomarse éste como un resultado especialmente relevante.

Dejando esto último de lado, podemos concluir que el tratamiento con VPA no genera alteraciones en la densidad astrocítica ni microglial en el hipocampo de hembras adultas.

3.3.3 Cerebelo

Existen evidencias de que el lóbulo VII del cerebelo se encuentra relacionado con la modulación de los niveles de sociabilidad (Shi et al., 2009), por lo que decidimos enfocarnos específicamente en este lóbulo. En los lóbulos del cerebelo podemos distinguir dos zonas, una capa molecular y una capa de células granulares. Entre ellas se encuentra la capa de células de Purkinje.

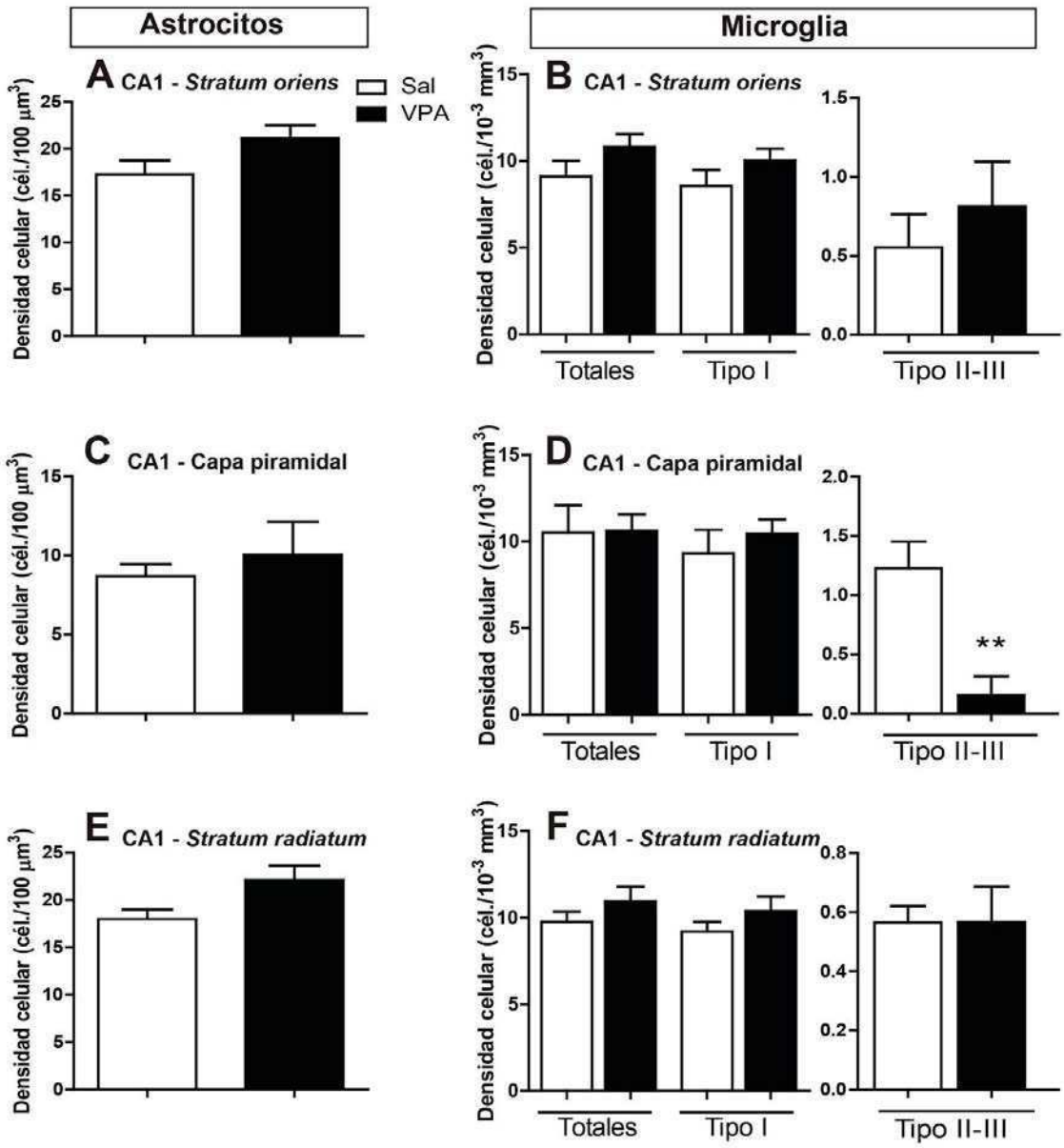

Figura 3.8 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA en la densidad glial en la región CA1 en animales hembras durante la adultez. Las hembras VPA no presentan alteraciones en la densidad microglial en el *stratum oriens* (B) ni *stratum radiatum* (F), aunque sí presentan una menor densidad de células de tipo II-III en la capa piramidal (D). La densidad astrocítica no se encuentra alterada en ninguna de estas zonas (A, C, E). ANOVA de un factor: ** $p < 0.01$. Se grafica la media + SEM.

La astroglía en el cerebelo presenta una distribución especial. A lo largo de la capa molecular pueden observarse las prolongaciones de la llamada glía de Bergmann, cuyos somas se encuentran entre las células de Purkinje, formando una empalizada. Dentro de la capa granular, los astrocitos se encuentran dispersos de manera aleatoria, formando una red. Estas características hacen imposible distinguir un cuerpo celular de otro, de manera de poder calcular la densidad celular en la región, por lo que cuantificamos el área GFAP positiva en estas zonas.

Observamos que las hembras expuestas prenatalmente a VPA presentan una densidad de células microgliales totales significativamente mayor a los animales Sal ($F_{(1, 7)} = 8.36$; $p = 0.023$) en la capa molecular, y no así en la capa granular, aunque puede observarse la misma tendencia (Figura 3.9 B, D). Para el caso de la astroglia los resultados son muy similares, ya que pudimos hallar diferencias significativas en la capa molecular ($F_{(1, 7)} = 6.73$; $p = 0.036$) pero no en la capa granular, donde también existe una tendencia a un mayor porcentaje de área GFAP positiva en los animales hembra VPA (Figura 3.9 A, C).

Ya que encontramos señales de activación astro y microglial en el cerebelo de las hembras VPA adultas, decidimos realizar este mismo análisis en los cerebelos de los animales machos, a fin de poder comparar el estado neuroinflamatorio de ambos sexos.

No hallamos diferencias en la densidad de células microgliales de ningún tipo al estudiar la capa granular, aunque sí encontramos una menor densidad de células de tipo II-III en la capa molecular ($F_{(1, 7)} = 23.86$; $p = 0.002$; Figura 3.9 B, D). No se observaron cambios en el área GFAP positiva en ninguna de las dos capas (Figura 3.9 A, C).

Estos resultados sugieren que los animales machos, contrariamente a lo hallado en los animales hembras, no presentan signos de inflamación en el cerebelo. Aún más, los resultados indicarían la presencia de un fenotipo donde la activación microglial se encuentra disminuida. Sin embargo, nos hallamos frente a un caso similar al de la capa piramidal de CA1 en los animales hembras, la poca cantidad de células involucradas y el contexto sin alteraciones nos llevan a desestimar este resultado.

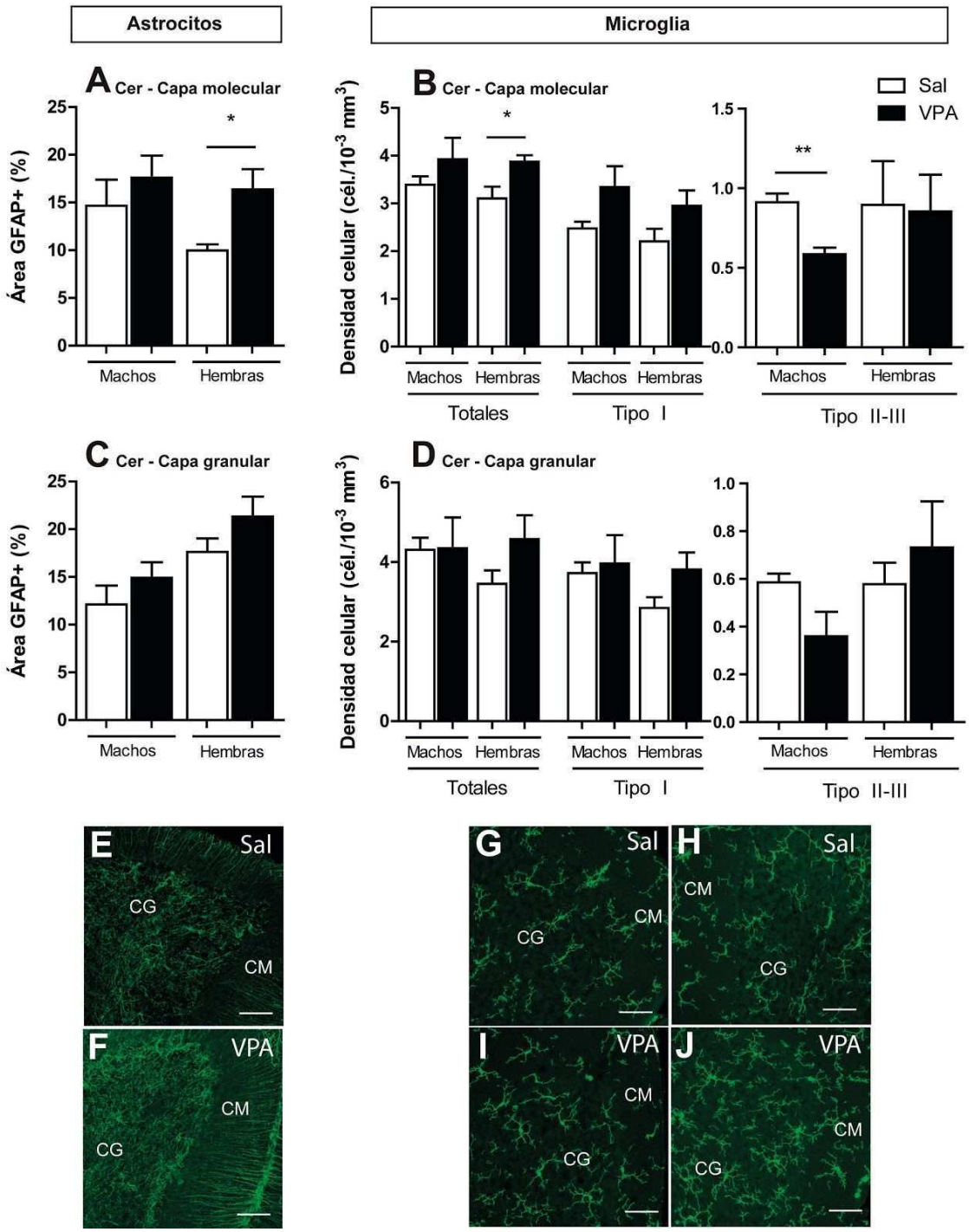

Figura 3.9 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA en la densidad glial en el lóbulo VII del cerebelo de animales machos y hembras durante la adultez. Los animales hembras presentan un mayor porcentaje de área GFAP-positiva en la capa molecular (A) pero no así en la granular (C), así como mayor densidad de células microgliales totales en la capa molecular (B) y no en la granular (D). Los animales machos muestran una menor densidad de células microgliales de tipo II-III únicamente en la capa molecular (B). ANOVA de un factor: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Se grafica la media + SEM. Cer: cerebelo.

3.4 Discusión y conclusiones

El objetivo que guió el diseño de los experimentos de esta sección en particular fue el de evaluar el efecto del sexo en el modelo VPA. Hemos hallado efectos diferenciales de la exposición prenatal al VPA en el comportamiento social y en el estado inflamatorio periférico y central de los animales.

Los resultados obtenidos en el ensayo de interacción social siguen la misma línea que los reportados en otros estudios, donde es observada una reducción en la sociabilidad en los ratones macho adultos (Kim et al., 2013; Lucchina y Depino, 2014; Schneider et al., 2008) pero no así en las hembras (Kim et al., 2013; Schneider et al., 2008).

Los efectos sexo-específicos se extienden a la respuesta inflamatoria periférica frente a un estímulo inflamatorio. Evidenciamos que mientras los animales machos Sal y VPA responden al LPS elevando los niveles de corticosterona en plasma en magnitudes similares, las hembras VPA presentan mayores niveles de la hormona en comparación con las Sal. Es por esto que podemos concluir que mientras los machos presentan una respuesta inflamatoria periférica normal, las hembras exhiben una respuesta exacerbada. Las hembras presentan mayores niveles de corticosterona en plasma de manera natural (Carey et al., 1995; Figueiredo et al., 2002), pero además, también presentan una mayor respuesta ante un estrés en comparación con los machos (Figueiredo et al., 2002; Pollard et al., 1975; Le Mevel et al., 1979). Creemos que el VPA podría estar actuando sobre este dimorfismo, incrementando la de por sí ya mayor reactividad de las hembras (ver sección 7.4.1).

Con respecto a la neuroinflamación, realizamos una cuantificación de la densidad astro y microglial en la corteza prefrontal, hipocampo y cerebelo en ratones hembras, hallando un incremento en la densidad celular de astrocitos y microglías únicamente en la capa molecular del cerebelo de los animales VPA. Sin embargo, cuando analizamos el cerebelo de los ratones machos, no pudimos encontrar ningún signo de activación glial. Este hecho no sólo implica un efecto sexo-específico del VPA sobre la neuroglía, sino que además no se condice con los resultados obtenidos

anteriormente en el laboratorio, donde se encontró activación microglial en el cerebelo de los ratones machos.

Los estudios previos fueron realizados con animales pertenecientes a una F1 híbrida, resultado de la cruza de hembras BALB/c con machos C57. Sin embargo, en esta tesis hemos utilizado ratones de la cepa exocriada CrlFcen:CF1 (ver sección 2.1). Esta cepa fue seleccionada debido a su mejor rendimiento en los apareamientos que las cepas endocriadas.

Numerosos trabajos muestran la existencia de diferencias fisiológicas, comportamentales y anatómicas entre distintas cepas endocriadas. Entre ellas, podemos encontrar comportamientos relacionados con la ansiedad (Crawley et al., 1997; van Gaalen y Steckler, 2000), actividad motora (Brooks et al., 2004), habilidades cognitivas (Brooks et al., 2005), comportamientos relacionados con la depresión y la ansiedad (Miller et al., 2010), sensibilidad a drogas antidepresivas (Crowley et al., 2005), expresión de perfiles cognitivos y comportamentales durante el desarrollo (Molenhuis et al., 2014), niveles de sociabilidad y de preferencia por la novedad social (Moy et al., 2004), comportamiento social, dominancia y agresividad, y perfiles de vocalizaciones ultrasónicas (Faure et al., 2016). Usualmente, estas diferencias se encuentran justificadas por el distinto trasfondo genético de los animales.

Consideramos que algo similar puede estar ocurriendo en este caso, donde las diferencias genéticas entre las cepas utilizadas se encontrarían detrás de las diferencias en el efecto del VPA sobre la activación glial en machos. Dado que este es un efecto sutil, es más proclive a verse afectado por el trasfondo genético del animal. Este fenómeno no se observa con respecto al comportamiento social, donde el VPA genera una marcada reducción en los niveles de exploración en los animales de ambas cepas.

4

Caracterización del estado inflamatorio central y periférico durante el período postnatal

4. Caracterización del estado inflamatorio central y periférico durante el período postnatal

A lo largo de la sección 3 analizamos los efectos del tratamiento prenatal con VPA en ratones adultos. Observamos que aunque los ratones macho presentan niveles reducidos de sociabilidad, no presentan alteraciones en la respuesta inflamatoria periférica ni en su estado neuroinflamatorio. Por el contrario, los animales hembra presentan un fenotipo conductual con niveles normales de sociabilidad, pero una respuesta inflamatoria periférica exacerbada y signos de activación glial en el cerebelo.

Estas alteraciones podrían ser consecuencia de dos fenómenos distintos. Por un lado, la administración prenatal de VPA podría generar cambios que, al ser mantenidos a lo largo del tiempo, produjeran los fenotipos sexo-específicos que observamos en la adultez. Por el otro lado, la exposición a VPA en un momento crítico podría ocasionar alteraciones en el desarrollo ulterior de los sistemas involucrados, generando como consecuencia los fenotipos hallados en el modelo.

Existe un estudio en el que ha sido demostrado que únicamente la exposición a VPA en el día gestacional 12.5 es capaz de provocar los síntomas relacionados con el autismo (Kim et al., 2011). Además, los síntomas de los TEA aparecen típicamente durante los primeros años de la infancia, momento hasta el cual los niños suelen desarrollarse normalmente. Estos hechos nos llevan a inclinarnos por la segunda alternativa, e hipotetizar además que existe un período crítico durante el desarrollo postnatal en el que ocurre la maduración y consolidación de los sistemas neurales responsables de los síntomas del autismo.

Identificar este período crítico podría ayudarnos a elucidar los mecanismos biológicos que alteran el desarrollo y resultan en las alteraciones conductuales y fisiológicas que se observan en el modelo VPA. El objetivo de esta sección es

determinar el momento del desarrollo postnatal en el que aparecen las alteraciones inflamatorias observadas en las hembras adultas. Para ello, caracterizamos la respuesta inflamatoria periférica y el estado neuroinflamatorio central en el período comprendido entre P7 y P42 en ratones hembra (Figura 4.1)

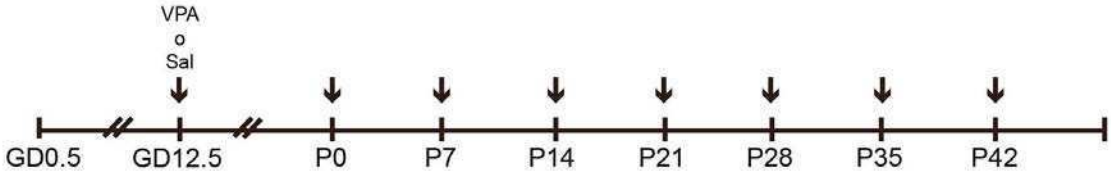

Figura 4.1 - Esquema experimental general.

4.1 Respuesta inflamatoria periférica

Como se ha mostrado en la sección 3, las hembras VPA adultas muestran una respuesta inflamatoria periférica exacerbada ante la administración de un estímulo inflamatorio, evidenciada por el aumento de corticosterona en plasma 2 hs después de la inyección. De manera de evaluar si este fenómeno se encuentra presente en edades tempranas, de igual forma que en el experimento anterior, inyectamos a las crías intraperitonealmente con SAL o LPS a distintas edades postnatales y medimos los niveles de corticosterona en plasma 2 hs después de la inyección, a través de un radioinmunoensayo. Como se ha mencionado previamente, el LPS desencadena una respuesta inflamatoria aguda, y es ampliamente utilizado para simular una infección bacteriana.

No hallamos diferencias en los niveles basales de corticosterona entre los grupos VPA y Sal en ninguna de las edades postnatales estudiadas (Figura 4.2). Por otro lado, la inyección de LPS activó el eje HPA en todos los animales (Efecto del tratamiento postnatal: $F_{(1, 12)} = 9.94$; $p = 0.008$ para P7; $F_{(1, 19)} = 6.88$; $p = 0.017$ para P14; $F_{(1, 16)} = 28.54$; $p < 0.001$ para P21; $F_{(1, 20)} = 10.72$; $p = 0.004$ para P28; $F_{(1, 16)} =$

18.96; $p < 0.001$ para P35 y $F_{(1, 11)} = 8.223$; $p = 0.015$ para P42) como era esperado (Figura 4.2). No se observó interacción entre el tratamiento prenatal y el postnatal, por lo que no existe una respuesta periférica exacerbada entre P7 y P42.

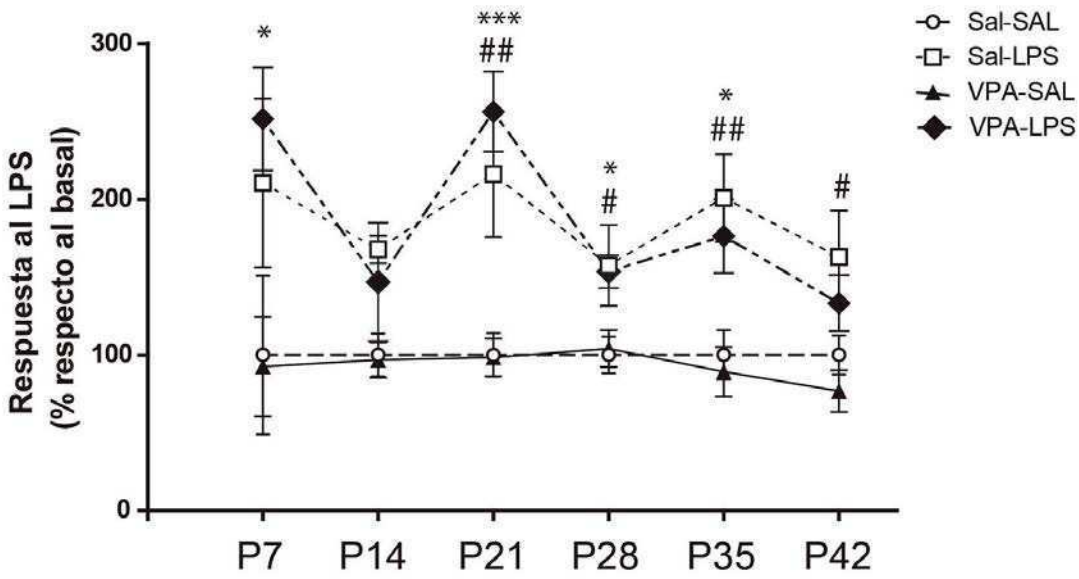

Figura 4.2 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la respuesta periférica ante un estímulo inflamatorio en animales hembras durante el período postnatal. La administración de VPA no afecta los niveles de corticosterona en plasma a nivel basal ni tras la administración de LPS, a lo largo de todo el período postnatal. Todos los valores se encuentran normalizados a la media del grupo Sal-SAL de la edad correspondiente de manera de facilitar su presentación en el mismo gráfico, ya que los niveles de corticosterona varían a lo largo de las distintas etapas del desarrollo postnatal. Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, VPA-SAL vs VPA-LPS; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, Sal-SAL vs Sal-LPS. Se grafica la media ± SEM.

Estos resultados muestran que los ratones hembras poseen un estado inflamatorio periférico normal a edades tempranas, independientemente del tratamiento prenatal recibido. Por lo tanto, esto sugiere que las alteraciones

observadas en las hembras VPA adultas deben surgir en algún momento entre P42 y la adultez.

4.2 Neuroinflamación

En la sección anterior estudiamos la activación de la astro y microglía en la corteza prefrontal, hipocampo y cerebelo en ratones adultos. Encontramos que las hembras VPA presentan signos de activación glial en el cerebelo, en particular una mayor densidad de células microgliales totales y un mayor porcentaje de área GFAP positiva en la capa molecular del lóbulo VII.

Este estado neuroinflamatorio alterado observado en animales adultos podría deberse a una activación glial crónica con inicio a edades tempranas, aunque también podría aparecer en un período postnatal tardío. De manera de poder discernir entre ambas posibilidades, caracterizamos el estado de activación glial en crías hembra entre P7 y P42 de manera análoga a lo realizado para los animales adultos. Brevemente, analizamos la densidad astro y microglial en corteza prefrontal, hipocampo y cerebelo a través de inmunofluorescencia.

4.2.1 Corteza prefrontal

Al igual que en el caso de los animales adultos, se observó una distribución homogénea de los astrocitos y las células microgliales en la corteza prefrontal a lo largo del desarrollo postnatal, y también entre ambos grupos, ya que no se halló efecto del tratamiento prenatal (Figura 4.3).

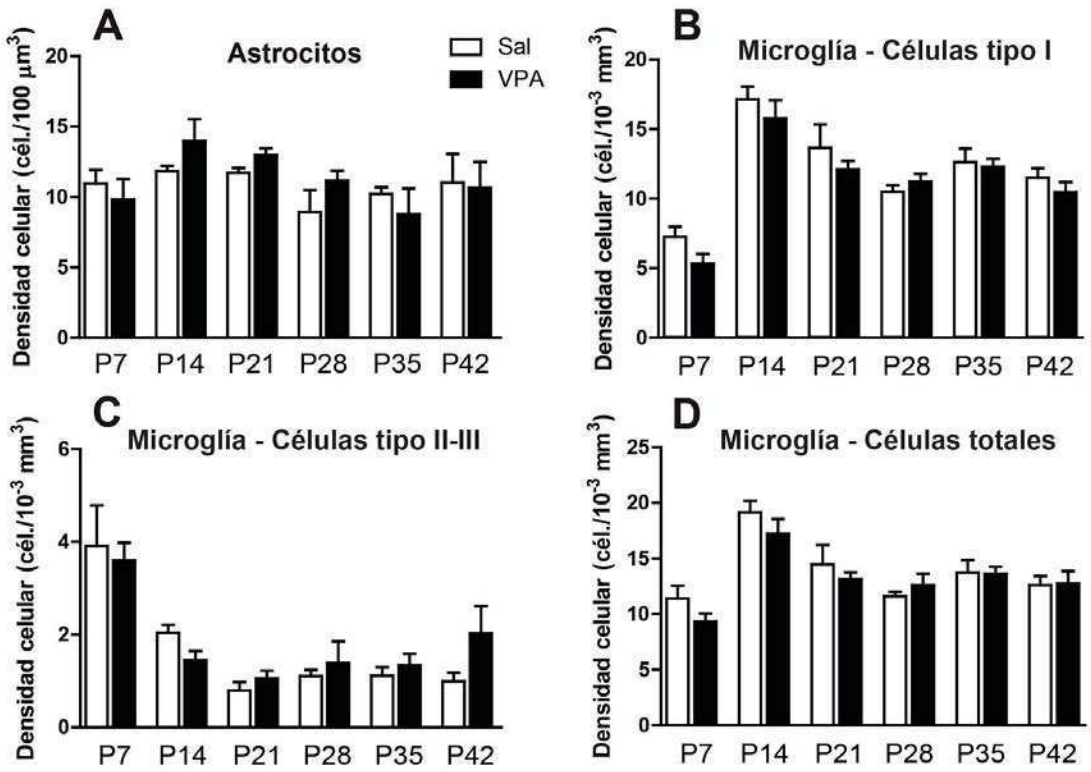

Figura 4.3 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad glial en la corteza prefrontal en animales hembras durante el período postnatal. En todas las edades estudiadas los animales Sal y VPA muestran densidades astrocitarias (A) y microgliales (B, C y D) similares en la corteza prefrontal. Se grafica la media + SEM.

4.2.2 Hipocampo

Dentro del hipocampo, se analizaron las regiones CA1 y giro dentado, dividiendo ambas en tres zonas, como se explica en la sección 2.5.3.

En el giro dentado (GD), encontramos que los animales VPA presentan un aumento en la densidad de células GFAP positivas en las capas molecular ($F_{(1, 8)}$ = 17.93; p = 0.003) y granular ($F_{(1, 8)}$ = 7.84; p = 0.023) a P21, aunque no se hallaron diferencias en el hilus (Figura 4.4). Tampoco fueron halladas diferencias entre los grupos experimentales para las células microgliales de tipo I o para la densidad celular

microglial total en ninguna de las tres zonas (Figura 4.5 A, C y E, y Figura 4.6). En cambio, para las células microgliales de tipo II-III, los animales VPA mostraron una densidad celular elevada en la capa molecular a P21 ($F_{(1, 6)}$ = 6.25; p = 0.047), y en el hilus a P21 y P28 ($F_{(1, 6)}$ = 6.79; p = 0.040 y $F_{(1, 8)}$ = 5.23; p = 0.051, respectivamente), pero no en la capa granular (Figura 4.5 B, D y F).

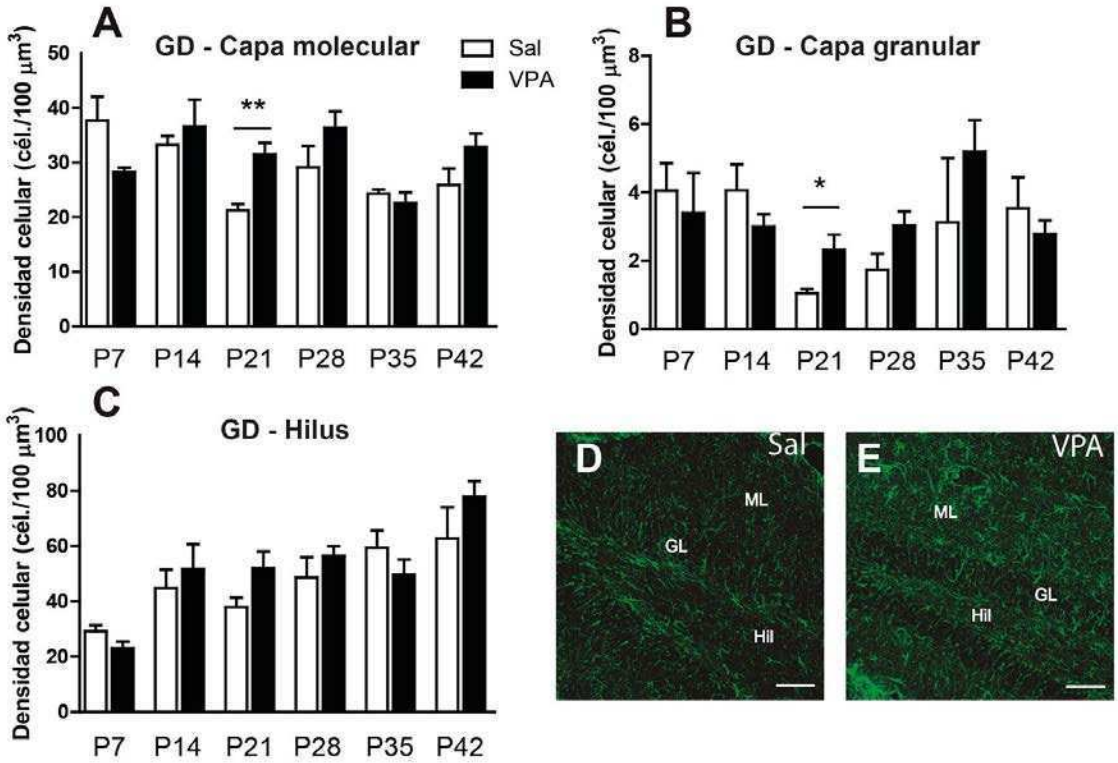

Figura 4.4 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad astroglial en el giro dentado en animales hembras durante el período postnatal. A P21 las hembras VPA presentan mayor densidad de células GFAP+ en las capas molecular (A) y granular (B), aunque no en el hilus (C). Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-GFAP realizadas en ratones Sal (D) y VPA (E) a P21. ANOVA de un factor: * p < 0.05, ** p < 0.01. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. GD, giro dentado; ML, capa molecular; GL, capa granular; Hil, hilus.

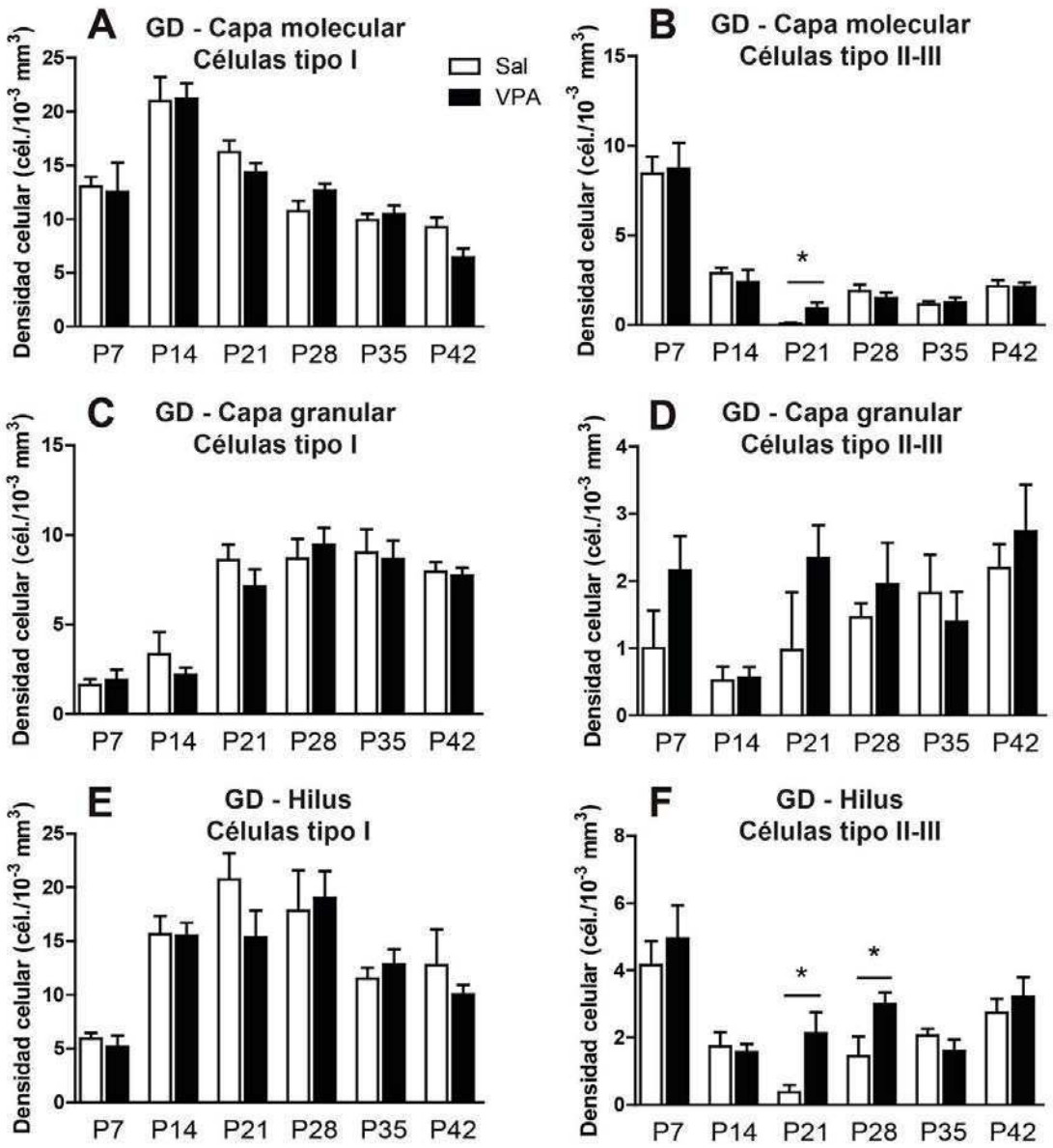

Figura 4.5 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad de células microgliales de tipo I y tipo II-III en el giro dentado de animales hembras durante el período postnatal. La densidad de las células microgliales de tipo I no presenta diferencias entre los grupos a ninguna de las edades estudiadas (A, C, E), aunque sí fue hallada una mayor densidad celular microglial de tipo II-III a P21 en la capa molecular (B), y a P21 y P28 en el hilus (F). ANOVA de un factor: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM. GD, giro dentado.

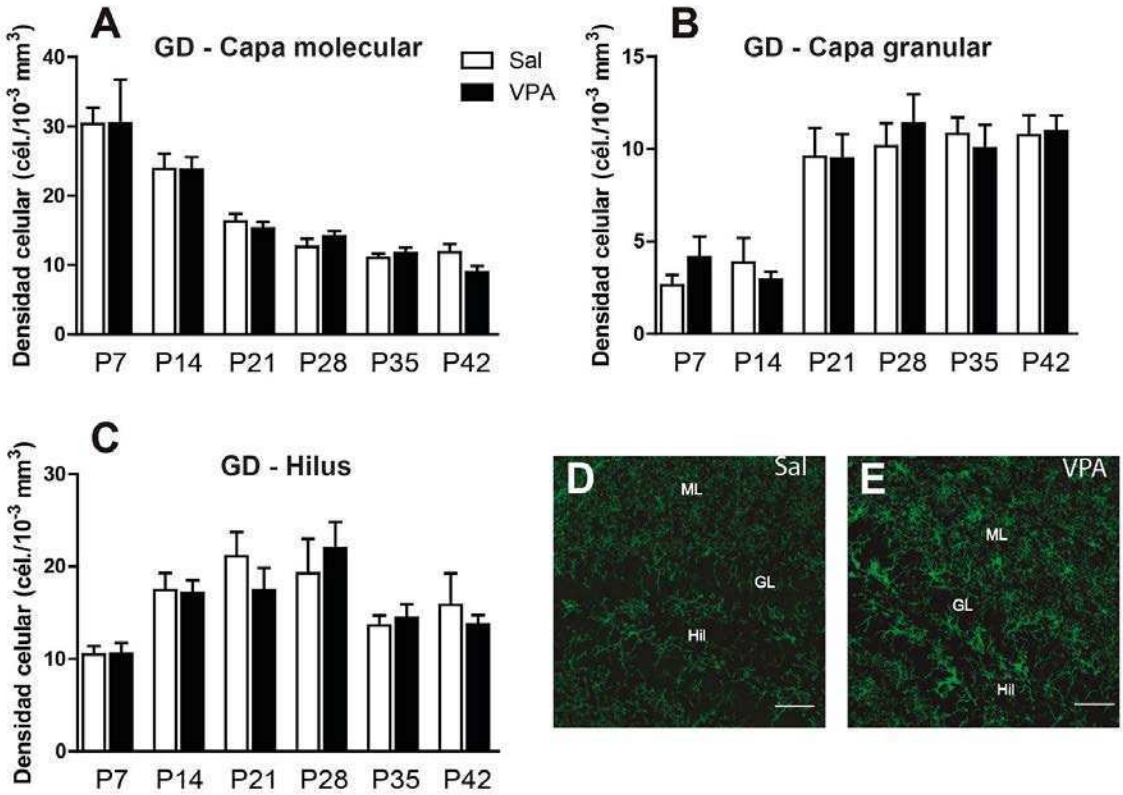

Figura 4.6 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad de células microgliales totales en el giro dentado de animales hembras durante el período postnatal. No fueron halladas diferencias en la densidad de células microgliales totales en ninguna de las regiones del giro dentado (A, B, C). Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-IBA1 realizadas en ratones Sal (D) y VPA (E) a P21. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. GD, giro dentado; ML, capa molecular; GL, capa granular; Hil, hilus.

Al analizar la región CA1 encontramos que el tratamiento prenatal con VPA generó un aumento de la densidad celular GFAP positiva en el *stratum oriens* ($F_{(1, 8)}$ = 10.88; p = 0.011) y en la capa piramidal a P21 ($F_{(1, 8)}$ = 33.82; p < 0.001), además de un efecto similar en el *stratum radiatum* a P21, P28 y P42 ($F_{(1, 8)}$ = 12.92; p = 0.007; $F_{(1, 8)}$ = 5.55; p = 0.046 y $F_{(1, 8)}$ = 7.06; p = 0.029, respectivamente) (Figura 4.7). Los

animales VPA también presentan alteraciones en la microglía, ya que se observó un aumento en la densidad celular total en el *stratum oriens* ($F_{(1, 8)} = 5.50$; $p = 0.048$) y la capa piramidal ($F_{(1, 8)} = 5.19$; $p = 0.052$) a P35 (Fig. 4.9). Además, la densidad celular de microglía de tipo I se halló particularmente aumentada a P35 ($F_{(1, 8)} = 6.14$; $p = 0.038$) (Figura 4.8 C).

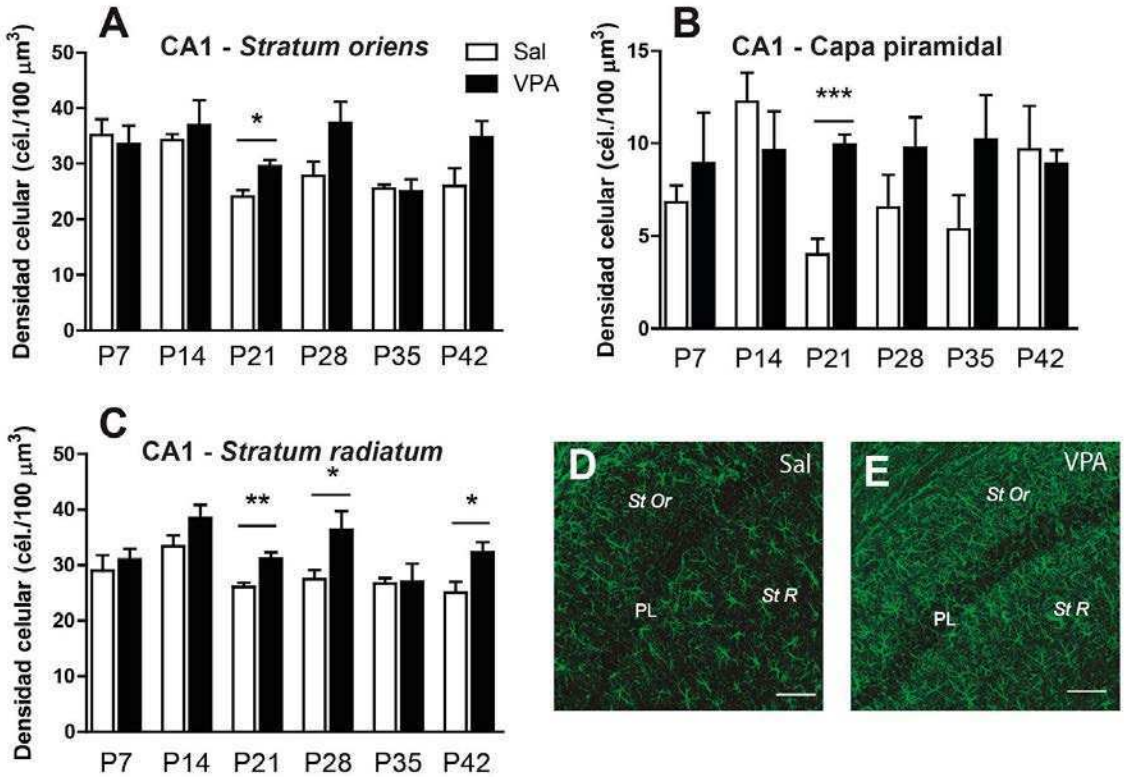

Figura 4.7 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad astroglial en la región CA1 en animales hembra durante el período postnatal. Se observó un aumento en la densidad de células GFAP+ en el *stratum oriens* (A) y la capa piramidal (B) a P21, y en el *stratum radiatum* (C) a P21, P28 y P42. Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-GFAP realizadas en ratones Sal (D) y VPA (E) a P21. ANOVA de un factor: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. *St Or*, *stratum oriens; St R, stratum radiatum*; PL, capa piramidal.

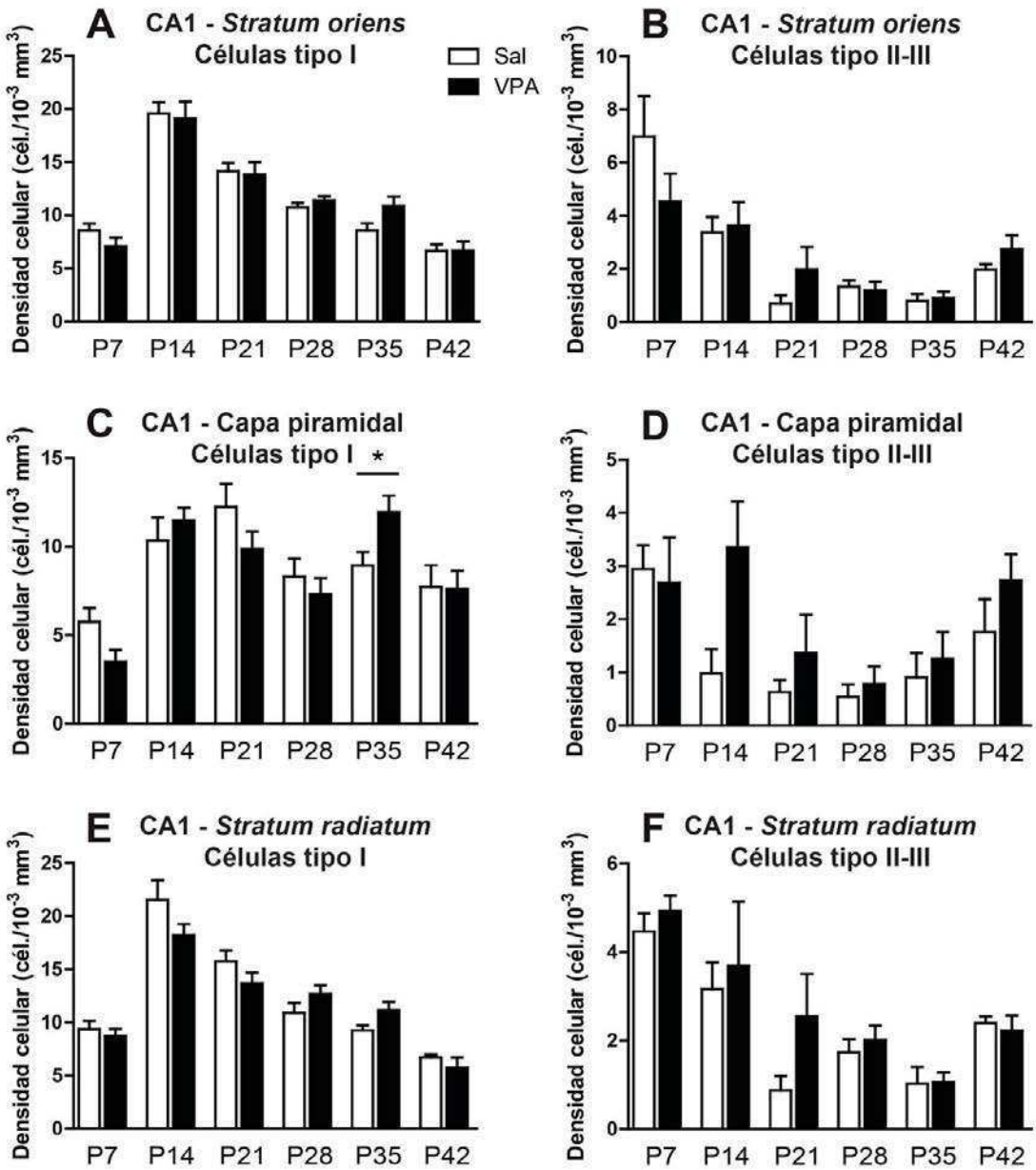

Figura 4.8 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad de células microgliales de tipo I y tipo II-III en la región CA1 de animales hembras durante el período postnatal. Los animales VPA muestran alteraciones en la densidad de células microgliales de tipo I en la capa piramidal (C) a P35, pero no en el *stratum oriens* (A) ni en el *stratum radiatum* (E), ni tampoco en la densidad de células de tipo II-III en ninguna de las regiones (B, D, F). ANOVA de un factor: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM.

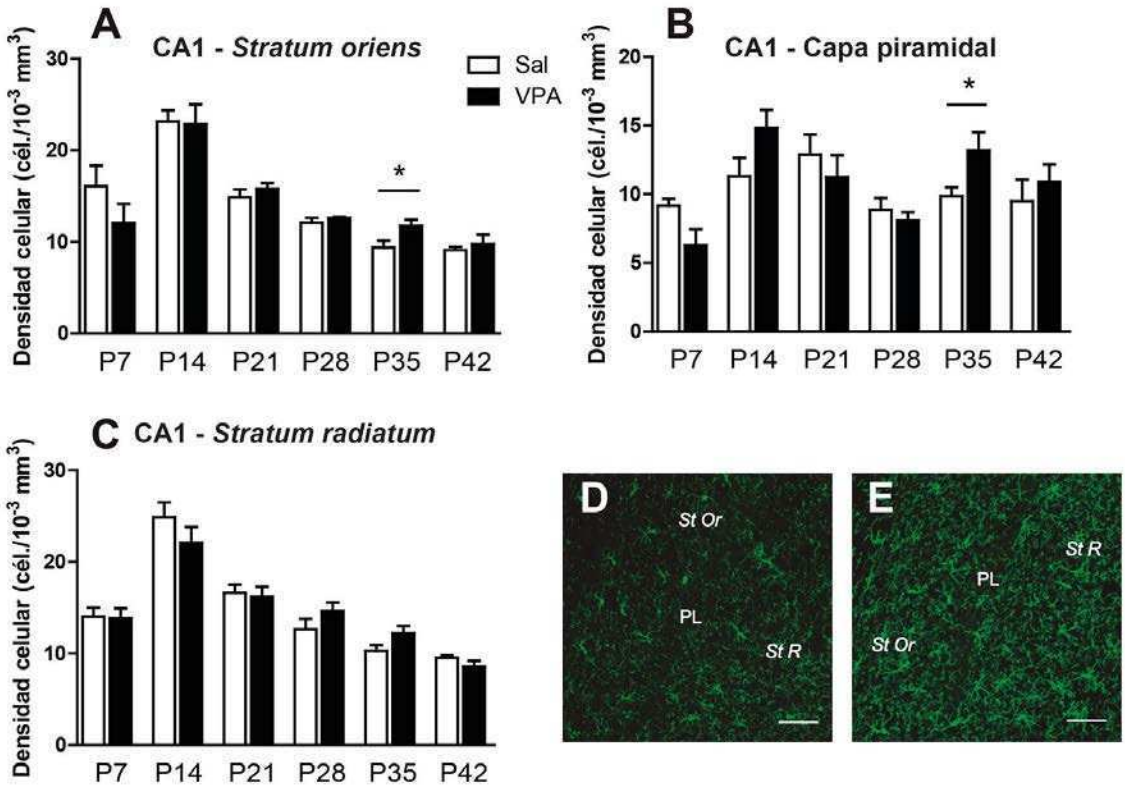

Figura 4.9 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad de células microgliales totales en la región CA1 de animales hembras durante el período postnatal. Se encontró un aumento en la densidad de células microgliales totales en el *stratum oriens* (A) y en la capa piramidal (B) a P35, pero no en el *stratum radiatum* (C). Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-IBA1 realizadas en ratones Sal (D) y VPA (E) a P35. ANOVA de un factor: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. *St Or*, *stratum oriens; St R, stratum radiatum*; PL, capa piramidal.

En resumen, las crías VPA muestran signos de activación glial en el destete tanto en el giro dentado como en la región CA1, persistiendo hasta edades más tardías en algunas zonas pero no en otras. Dejando de lado estas diferencias locales,

puede concluirse que P21 parecería ser el momento más crítico para la neuroinflamación hipocampal.

4.2.3 Cerebelo

Al cuantificar el área GFAP positiva en las capas molecular y granular del lóbulo VII del cerebelo encontramos en los animales VPA una disminución en el porcentaje de área marcada en ambas capas a P35 ($F_{(1, 8)}$ = 12.70; p = 0.007 para la capa molecular; y $F_{(1, 8)}$ = 6.96; p = 0.030 para la granular), seguido de un aumento a P42 ($F_{(1, 8)}$ = 5.46; p = 0.048 para la capa molecular; y $F_{(1, 8)}$ = 11.30; p = 0.010 para la granular), también en ambas capas (Figura 4.10).

Con respecto al análisis microglial, los resultados fueron similares a los obtenidos en el giro dentado para la densidad celular total y de células de tipo I, donde no se hallaron diferencias entre los grupos (Figura 4.11 A y C, y 4.12). Sin embargo, las crías VPA mostraron una disminución en la densidad de células de tipo II-III en la capa granular a P28 ($F_{(1, 8)}$ = 13.23; p = 0.007) y P35 ($F_{(1, 7)}$ = 7.78; p = 0.027), que no fue observada en la capa molecular (Figura 4.11 B y D).

Estos resultados muestran que las alteraciones gliales en el lóbulo VII del cerebelo de hembras VPA comienzan en un período particular durante el desarrollo. A pesar de que la astro y microgliosis parecieran seguir distintas líneas temporales, ambas mantienen el mismo perfil: una reducción inicial seguida de un aumento en la densidad celular y el área positiva.

Dado este fenómeno, el estado de activación glial observado en el cerebelo de hembras adultas podría ser explicado como consecuencia de un mecanismo compensatorio.

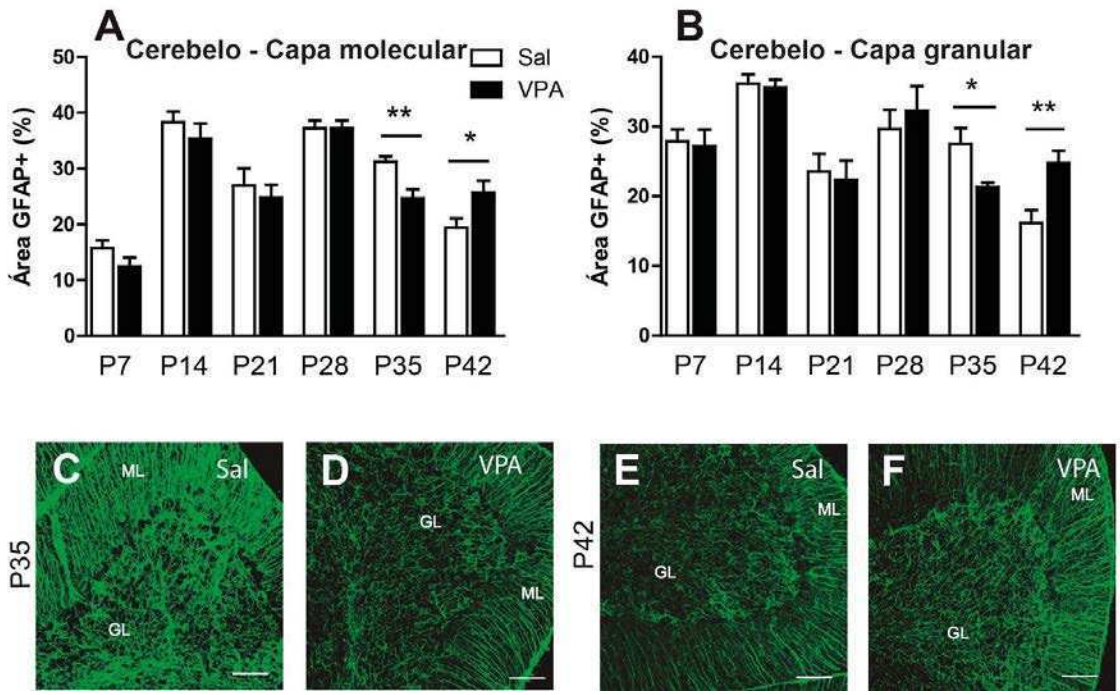

Figura 4.10 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad astroglial en el lóbulo VII del cerebelo en animales hembras durante el período postnatal. Los animales VPA presentan un menor porcentaje de área de células GFAP+ en las capas molecular (A) y granular (B) a P35, aunque un mayor porcentaje a P42 en ambas capas. Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-GFAP realizadas en ratones Sal (C) y VPA (D) a P35, y Sal (E) y VPA (F) a P42. ANOVA de un factor: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. ML, capa molecular; GL, capa granular.

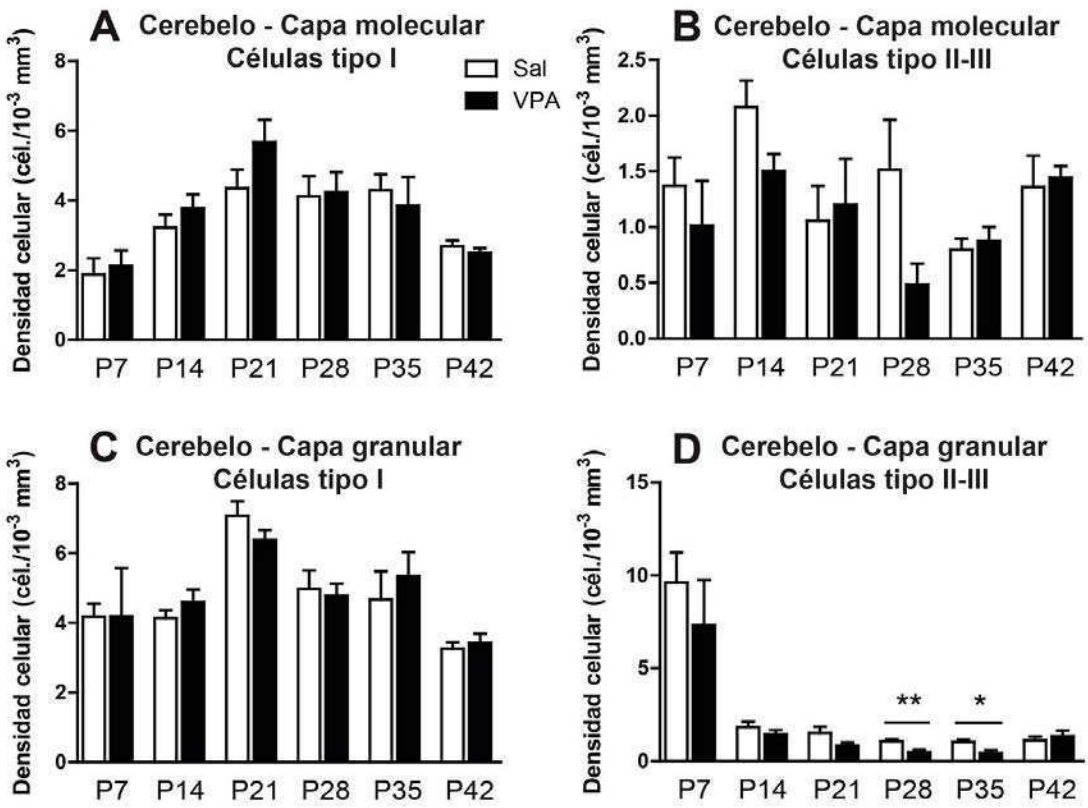

Figura 4.11 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad de células microgliales de tipo I y tipo II-III en el lóbulo VII del cerebelo de animales hembra durante el período postnatal. No fueron halladas diferencias en la densidad de células microgliales de tipo I en ninguna de las dos capas (A, C), aunque sí se encontró una menor densidad microglial de células de tipo II-III a P28 y P35 en la capa granular (D) de los animales VPA. ANOVA de un factor: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Se grafica la media + SEM.

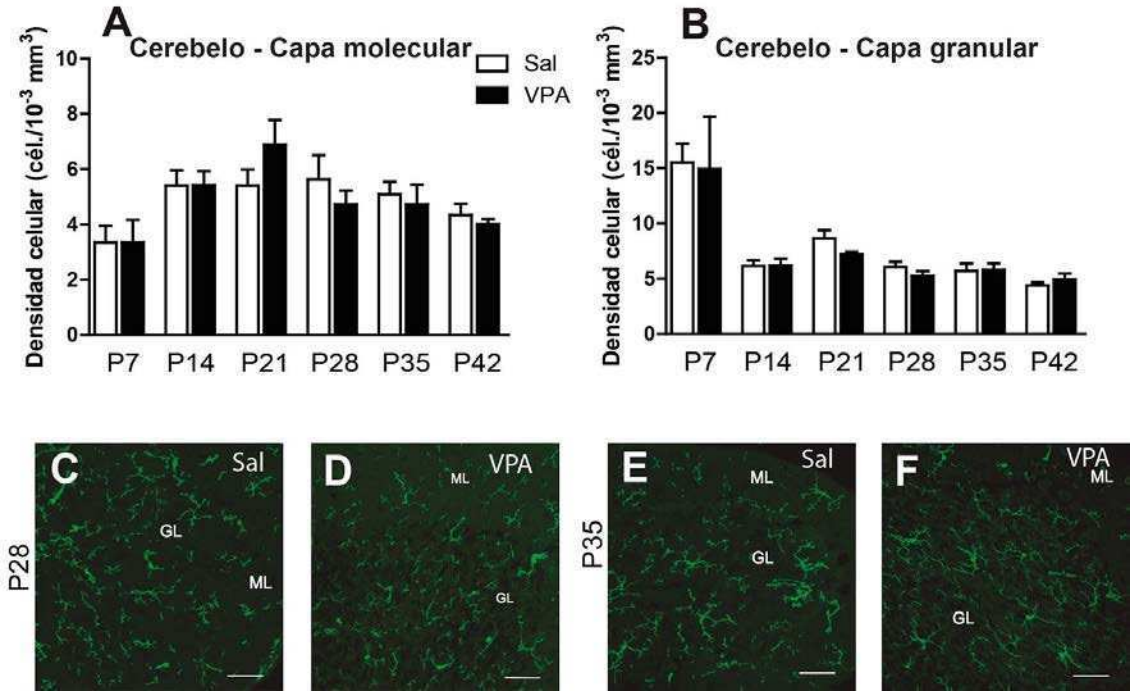

Figura 4.12 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad de células microgliales totales en el lóbulo VII del cerebelo de animales hembras durante el período postnatal. La administración de VPA no afecta los niveles de densidad de células microgliales totales en las capas molecular (A) ni granular (B). Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-IBA1 realizadas realizadas en ratones Sal (C) y VPA (D) a P28, y Sal (E) y VPA (F) a P35. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. ML, capa molecular; GL, capa granular.

4.3 Período crítico en animales macho

Hemos visto que las hembras adultas presentan activación glial únicamente en el cerebelo, mientras que las crías lo hacen también en el hipocampo. Esto significa que en algunas regiones del cerebro de los animales VPA la gliosis es transitoria, pudiendo sus consecuencias afectar el comportamiento a largo plazo. Considerando esto, y dado que los machos VPA adultos no presentan un estado inflamatorio alterado, hipotetizamos que podría existir un período durante el desarrollo postnatal en las crías macho donde sí se presenten alteraciones inflamatorias.

Para poner a prueba esta hipótesis evaluamos la respuesta inflamatoria periférica y la activación glial en animales machos y hembras a P21. Esta edad fue elegida teniendo en cuenta que es el momento en el que se encontraron la mayor cantidad de alteraciones en los animales hembras.

4.3.1 Respuesta inflamatoria periférica

Hemos mencionado previamente que ante la administración de un estímulo inflamatorio tal como el LPS, las hembras VPA adultas muestran una respuesta inflamatoria periférica exacerbada. Esto significa que sus niveles de corticosterona en plasma son mayores que aquellos de los animales Sal-LPS. Sin embargo, esta exacerbación debe surgir luego de P42, ya que entre P7 y P42 las crías VPA muestran una respuesta normal al LPS.

Para evaluar la respuesta del eje HPA en ratones machos a P21 procedimos de manera análoga a los experimentos anteriores, inyectando LPS intraperitonealmente y realizando la extracción del plasma 2 hs post inyección. Al mismo tiempo, este experimento también fue llevado a cabo en las hermanas de estos animales a manera de control, para poder realizar las comparaciones de manera más directa.

El análisis estadístico reveló un efecto del tratamiento postnatal tanto en los animales machos ($F_{(1, 16)} = 9.18$; $p = 0.008$) como en hembras ($F_{(1, 16)} = 28.54$; $p < 0.001$) (Figura 4.13). La falta de significancia en el análisis posthoc para los animales machos VPA podría sugerir una hipoactivación del eje ante la administración de LPS. Sin embargo, consideramos que este fenómeno se debe a la variabilidad y el reducido número de animales utilizado, y que aumentando el n podrían alcanzarse diferencias significativas. Teniendo esto en cuenta, y considerandola ausencia de una interacción entre los tratamientos pre y postnatales, podemos concluir que estos animales presentan una respuesta inflamatoria periférica normal a P21.

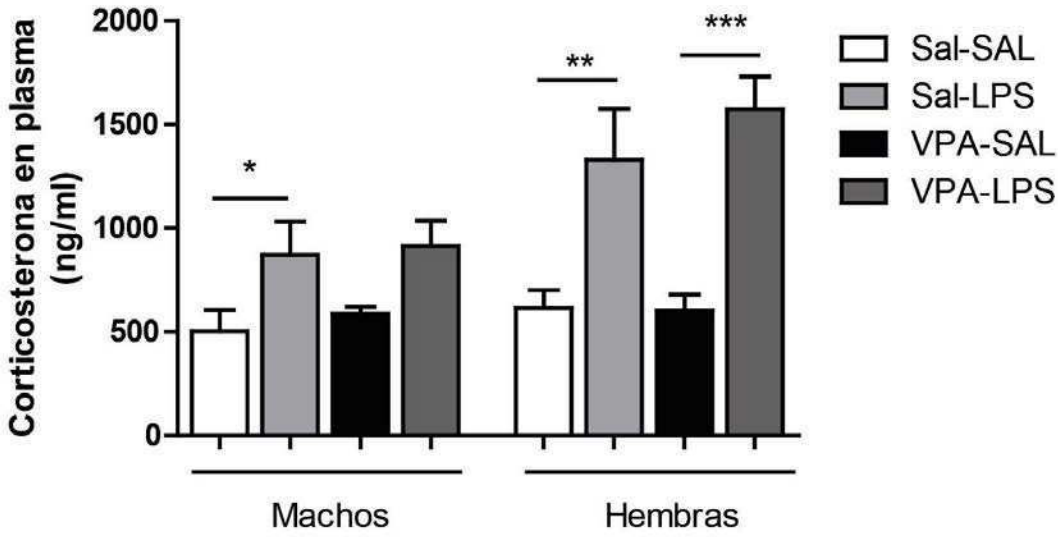

Figura 4.13 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la respuesta inflamatoria periférica ante un estímulo inflamatorio en animales machos y hembras a P21. La respuesta de los animales machos VPA al LPS no alcanza la significancia, pero sus niveles de corticosterona son muy similares a los de los animales Sal. Consideramos que los niveles de corticosterona en plasma no se ven afectados por el tratamiento con VPA en ninguno de los sexos. Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Se grafica la media + SEM.

4.3.2 Neuroinflamación

Con el objetivo de estudiar el estado neuroinflamatorio de los animales machos a P21, se realizaron análisis de inmunofluorescencia donde se cuantificó la densidad astro y microglial. Se estudiaron el hipocampo y el cerebelo, debido a que éstas fueron áreas donde se observaron alteraciones en los animales hembras durante el período postnatal.

De la misma manera que en los animales machos adultos, a P21 no se hallaron diferencias en la densidad celular astrocitaria en las regiones CA1 y giro dentado del hipocampo, ni tampoco en el porcentaje de área GFAP+ en el cerebelo (Figura 4.14 A, B, C). Sin embargo, por más que la densidad microglial de células de tipo I y de tipo II-III presenta niveles similares en los animales VPA y los Sal tanto en el hipocampo (Figura 4.14 D, E, G, H) como en el cerebelo (Figura 4.14 F, I), la densidad microglial total se encuentra aumentada en el hilus del giro dentado en los animales VPA ($F_{(1, 7)} = 6.29$; $p = 0.040$) (Figura 4.14 K).

De esta manera, vemos que los machos presentan signos de neuroinflamación más sutiles que las hembras a P21, ya que ésta se observa en una única zona de una región del hipocampo. Sin embargo, no podemos descartar que la activación glial siga otra línea temporal en los animales macho y se presente a edades diferentes que en las hembras.

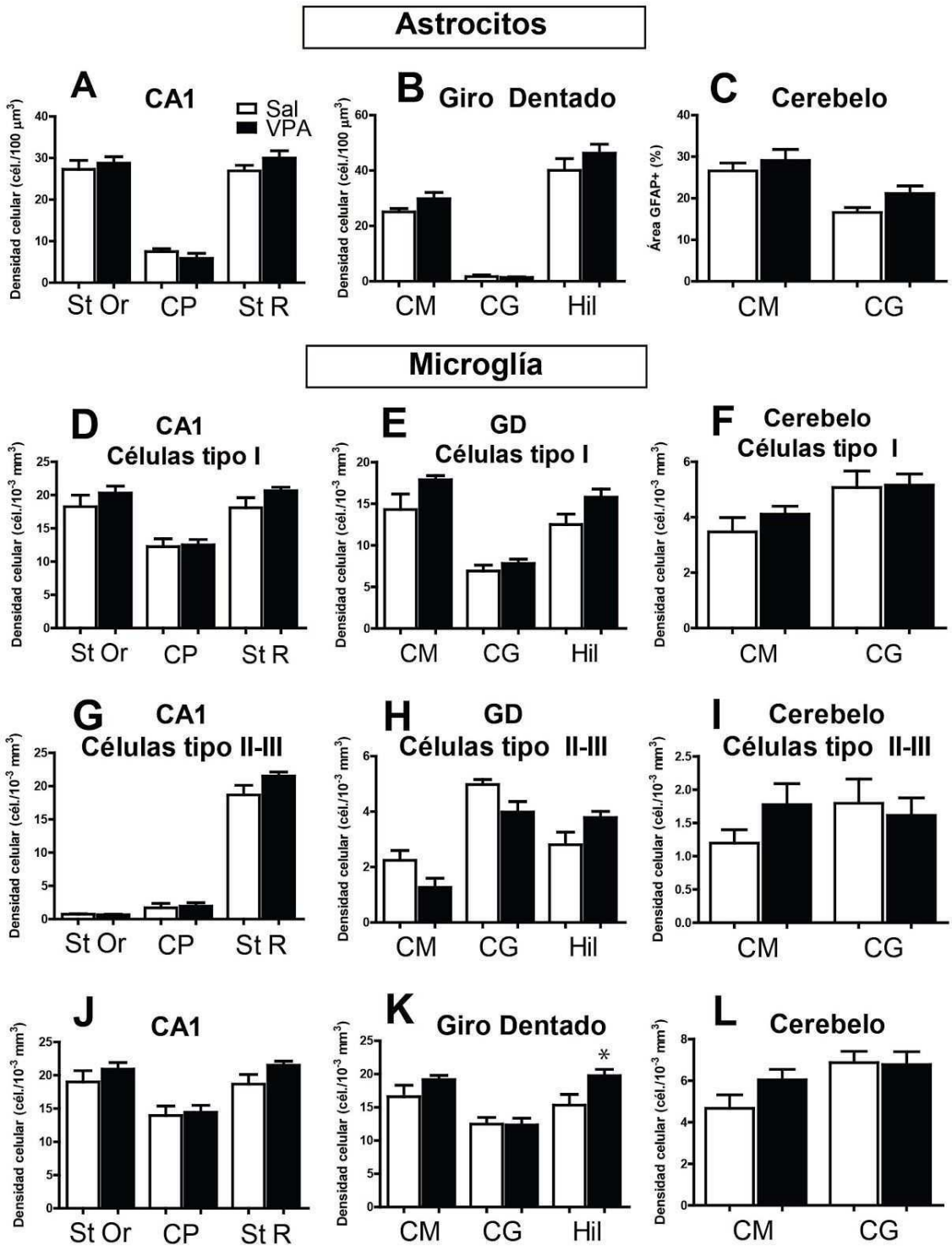

Figura 4.14 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre la densidad astro y microglial en el hipocampo y cerebelo en animales macho a P21. No fueron halladas diferencias en la densidad astroglial en las regiones CA1 (A) y giro dentado (B) del hipocampo, como así tampoco en el porcentaje de área GFAP+ en el lóbulo VII del cerebelo (C). La exposición a VPA no parece afectar la densidad microglial de células de tipo I y de tipo II-III en CA1 (D, G), giro dentado (E, H) y cerebelo (F, I). Tampoco influye en la densidad de células microgliales totales en CA1 (J) y cerebelo (L), pero sí provoca un aumento de la densidad de estas células en el giro dentado (K). ANOVA de un factor: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM. GD, giro dentado; St Or, *stratum oriens*; CP, capa piramidal; St R, *stratum radiatum*; CM, capa molecular; CG, capa granular; Hil, hilus.

4.4 Discusión y conclusiones

A lo largo de esta sección hemos estudiado la respuesta inflamatoria periférica y el estado de activación glial durante el período postnatal. Hemos evidenciado alteraciones gliales en los animales expuestos a VPA durante la gestación, aunque no hemos observado anormalidades en la respuesta del eje HPA ante un estímulo inflamatorio.

A pesar de que las hembras adultas presentan una exacerbación en los niveles de corticosterona como respuesta a un estímulo inflamatorio, esta respuesta se desencadena con normalidad durante el período comprendido entre P7 y P42. Estos resultados sugieren que dicho fenotipo requiere de maduración durante la adolescencia, y sólo es observado en animales adultos. De hecho, la respuesta del eje HPA sufre cambios a lo largo del período postnatal y es altamente influenciada por el sexo del animal, el nivel de madurez sexual y los niveles de hormonas sexuales circulantes, alcanzando su máxima respuesta en las hembras que han atravesado la pubertad, luego de P45 (Gaillard y Spinedi, 1998) (ver sección 7.4.1).

También se ha observado que las hembras VPA muestran activación astro y microglial en etapas tempranas del desarrollo, lo que sugiere que las alteraciones gliales que se observan en los animales adultos son determinadas de manera temprana y perduran durante toda la vida del animal. Aunque en el período postnatal las señales de neuroinflamación aparecen a distintas edades dependiendo de la región en cuestión, y en algunas permanecen por más tiempo que en otras, en líneas generales podemos concluir que la activación glial se presenta dentro del período crítico P21-P35 en las hembras VPA. Los cambios en la presencia de células gliales a cada edad podrían tener distintas consecuencias en el desarrollo y funcionamiento de las células neuronales; la neuroglía podría influir sobre distintas poblaciones de neuronas y afectar así el comportamiento.

Es importante mencionar que no todas las regiones cerebrales estudiadas se encuentran afectadas a las mismas edades, por ejemplo, los cambios en la densidad astroglial en el hipocampo se manifiestan de manera más temprana (P21) que en el

cerebelo (P35). Dadas las distintas dinámicas de desarrollo neuronal de estas regiones, dichas alteraciones podrían tener distintos efectos en la migración, maduración y conectividad neuronal. Ha sido demostrado que el podado sináptico en la región CA1 se encuentra mediado por la microglía y puede afectar la sociabilidad (Paolicelliet al., 2011; Zhan et al., 2014), además, ésta parece ser esencial entre P14 y P28, cuando el *pruning* es necesario. Estas dinámicas podrían ser distintas en otras regiones cerebrales.

Además, estas dinámicas podrían también variar entre sexos, ya que ha sido demostrada la existencia de diferencias sexuales en la morfología astrocítica y su correlación con diferencias en la morfología neuronal (Mong et al., 1996; Mong et al., 1999; Amateau y McCarthy, 2002), así como un dimorfismo sexual en la colonización microglial del cerebro durante el desarrollo (Milner et al., 2005; Gottfried-Blackmore et al., 2008; Gottfried-Blackmore et al., 2010). Esto podría indicar que aunque no se hayan observado signos de activación glial en los machos en la misma magnitud que en los animales hembras a P21, el proceso neuroinflamatorio podría estar siguiendo otra línea temporal y presentarse de manera más temprana o más tardía en los machos VPA. Para elucidar esta cuestión es necesario estudiar también otras edades en los animales macho.

Por otro lado, al analizar el cerebelo hemos hallado una reducción en la densidad celular de astrocitos a P35, seguida de un aumento a P42; y también una menor densidad de células microgliales de tipo II-III en la capa granular a P28 y P35. Estos resultados discrepan con las observaciones realizadas en el cerebelo de hembras adultas, donde se ve un incremento en la densidad celular de astrocitos y microglía. Detrás de este fenómeno podría encontrarse una respuesta homeostática compensatoria del organismo, donde el número de células gliales se vea aumentado en los animales adultos ante una disminución de estas células en el cerebelo en desarrollo.

En esta sección hemos mostrado una caracterización de la activación glial y la respuesta inflamatoria durante el período postnatal en animales hembras, delimitando el período crítico en el que aparecen las señales de activación glial entre P21 y P35. Estos resultados complementan caracterizaciones previas realizadas únicamente en

machos (Schneider y Przewlocki, 2005; Schneider et al., 2006); y además, las diferencias sexuales en el estado neuroinflamatorio halladas a P21 se suman a otras evidencias de dimorfismos sexuales en el desarrollo postnatal en el modelo VPA (Wagner et al., 2006). Estas diferencias en los efectos postnatales de la administración prenatal de VPA podrían subyacer las diferencias en el comportamiento social observadas en la adultez, donde la reducción en la sociabilidad se encuentra presente en machos pero no en hembras (Kataoka et al., 2013; Kim et al., 2013).

5

Efectos de un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre el estado inflamatorio y los comportamientos relacionados con el autismo

5. Efectos de un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre el estado inflamatorio y los comportamientos relacionados con el autismo

Los resultados expuestos en la sección 3 muestran diferencias sexo-específicas tanto en el comportamiento social como en la respuesta inflamatoria y la activación glial de los animales VPA adultos. Las hembras presentan niveles normales de sociabilidad, una respuesta exacerbada del eje HPA, y activación micro y astroglial en el cerebelo. Sin embargo, los animales machos no presentan ninguna de estas alteraciones, en tanto que sí muestran una reducción en la interacción social.

Además, a lo largo de la sección 4 hemos mostrado que las alteraciones gliales aparecen de manera temprana en el período postnatal en los animales hembras, comenzando a P21 y extendiéndose hasta P35. En machos, contrariamente a lo que ocurre en hembras, prácticamente no existen señales de activación glial en dicho período.

De manera de evaluar de manera más directa el efecto de la inflamación sobre los comportamientos sociales en ambos sexos, nos propusimos modular los niveles de inflamación durante este período. El objetivo de esta sección es evaluar el efecto de un estímulo inflamatorio postnatal sobre el desarrollo de comportamientos relacionados con el autismo en la adultez.

5.1 Exposición a un único evento inflamatorio

Como ha sido observado en la sección 4, las señales de activación glial en las hembras comienzan a P21 y en algunas áreas llegan a prolongarse hasta P35.

Podríamos considerar entonces, a P21 como un momento crítico, y P21-P35 como el período crítico extendido.

Como primera aproximación, decidimos evaluar la capacidad de un único evento inflamatorio para ocasionar efectos sobre el comportamiento social en la adultez.

Observamos en la sección 4 que los animales machos prácticamente no poseen señales de activación glial a P21, por lo que un único evento inflamatorio podría ser demasiado sutil como para observar un cambio significativo en la adultez, dado que estos animales ya presentan menores niveles de sociabilidad. En cambio, dado que los animales hembras sí presentan un estado de activación glial preexistente, el aumento de estos niveles mediante un único evento durante el período crítico podría provocar un efecto aditivo. De esta manera, se generaría un cambio mayor que podría llevar a la aparición del fenotipo de sociabilidad reducida en la adultez observado en los machos.

Por estos motivos realizamos el experimento en ratones hembras, a quienes se les administró una única dosis de LPS en la mitad del período crítico extendido (Figura 5.1).

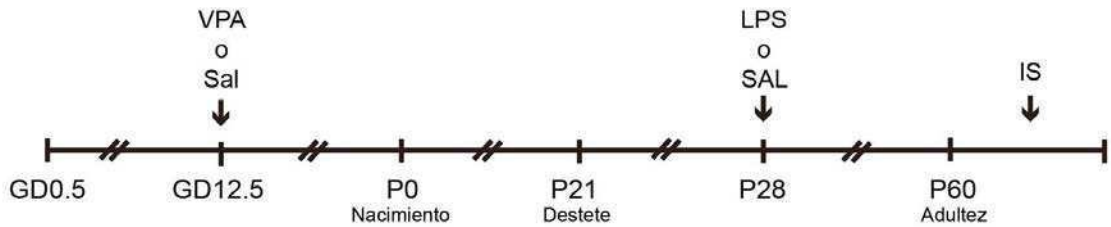

Figura 5.1 - Esquema experimental de exposición a un único evento inflamatorio a P28. Se administró una inyección de LPS o SAL a P28. En la adultez se realizó el ensayo de interacción social (IS).

Realizamos un ensayo de interacción social con un número de animales reducido, a manera de experimento preliminar. Tras realizar un ANOVA anidado de

dos factores, fuimos incapaces de hallar efectos del tratamiento prenatal, postnatal o una interacción entre ambos factores (Figura 5.2). Al analizar el tiempo que los animales pasaron explorando el lado social y el lado no social del aparato, podemos ver que todos los grupos muestran una preferencia por olfatear el lado que corresponde a la presencia del ratón (Figura 5.2 B), aunque dicha preferencia sólo resulta significativa para el grupo VPA-LPS ($F_{(1, 11)} = 15.22$; $p = 0.003$), probablemente debido al bajo número de animales del experimento.

Este estudio preliminar no mostró ningún tipo de tendencia que pudiera llegar a afianzarse mediante un aumento del número de animales experimentales, por lo que no fue repetido. Sin embargo, estos resultados sugieren que un único evento de inflamación durante el período crítico no es suficiente para provocar cambios en el comportamiento social a largo plazo en ratones hembra.

5.2 Exposición prolongada al estímulo inflamatorio

Dado que una única exposición al LPS en medio del período crítico extendido no fue capaz de generar efectos en el comportamiento de las hembras adultas, decidimos aumentar la exposición al estímulo inflamatorio.

El diseño experimental (Figura 5.3 A) se elaboró con el objetivo de cubrir todo el período crítico extendido, de P21 a P35. En estudios previos del laboratorio hemos podido observar cómo disminuyen los niveles de locomoción en un test de Campo Abierto (*Open Field*) 2 hs luego de la administración de LPS. A su vez, hemos observado que este comportamiento desaparece cuando los animales son testeados 24 hs post inyección. Teniendo esto en consideración, decidimos administrar el LPS cada 48 hs, permitiéndole así a los animales recuperarse de los efectos fisiológicos y conductuales del inflamógeno, conocidos como comportamiento relacionado con la enfermedad o *sickness behavior*, antes de recibir la siguiente dosis. Durante este período se controló la ganancia de peso de los animales, que resultó similar en todos los grupos (Figura 5.3 B y C).

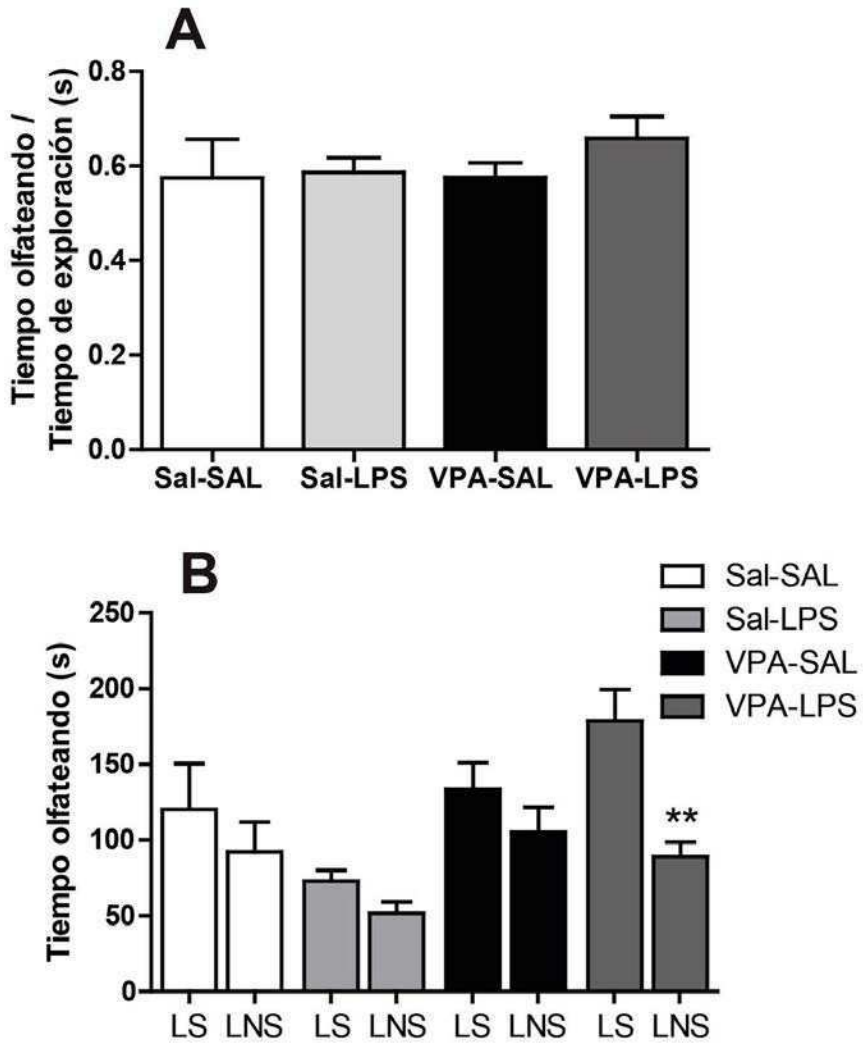

Figura 5.2 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio a P28 sobre la interacción social en animales hembras durante la adultez. Se cuantificó la proporción del tiempo que los animales pasaron olfateando al ratón estímulo sobre el tiempo total de exploración. Todos los animales mostraron niveles similares de exploración social (A). Se observa una tendencia a la preferencia por el lado social en todos los grupos (B). N: Sal-SAL = 6, Sal-LPS = 5, VPA-SAL = 6, VPA-LPS = 6. ANOVA de un factor: ** $p < 0.01$. Se grafica la media + SEM. LS, lado social; LNS, lado no social.

Además, dado que en este caso los niveles de inflamación serían elevados repetidamente a lo largo del período crítico, decidimos analizar los efectos en la adultez tanto en animales machos como en hembras.

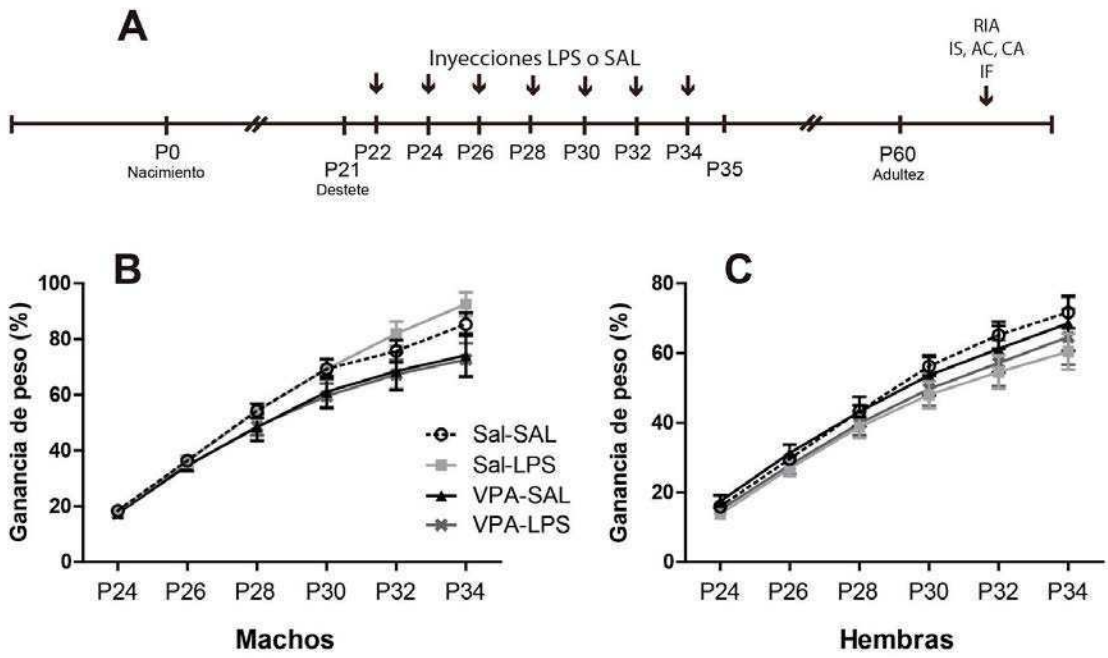

Figura 5.3 - Esquema experimental y ganancia de peso durante la exposición prolongada al estímulo inflamatorio. Se administraron 7 inyecciones de LPS o SAL, día por medio entre P21 y P35. En la adultez se realizaron los ensayos de interacción social (IS), autoacicalamiento (AC), locomoción en campo abierto (CA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunofluorescencia (IF) (A). Ganancia de peso durante el período de exposición al LPS en animales machos (B) y hembras (C).

5.2.1 Interacción social

Con el objetivo de analizar los niveles de sociabilidad de los ratones adultos, realizamos un ensayo de interacción social, como fue explicado previamente.

En el caso de los animales hembras, el ANOVA anidado de dos factores reveló la existencia de un efecto del tratamiento postnatal ($F_{(1, 27)} = 6.73$; $p = 0.0152$). Mientras que ambos grupos de ratones Sal, así como los animales VPA tratados con salina presentan niveles normales de exploración social como era esperado, aquellos animales VPA tratados con LPS durante el período crítico presentan menores niveles de sociabilidad (Figura 5.4 A). Este mismo fenómeno se hace evidente al observar el tiempo de exploración de los lados social y no social del aparato: si bien los animales Sal y los VPA-SAL pasan significativamente más tiempo olfateando el lado en que se encuentra el ratón, frente al lado donde se halla el objeto ($F_{(1, 24)} = 31.99$; $p < 0.001$ para Sal-SAL, $F_{(1, 22)} = 20.67$; $p < 0.001$ para Sal-LPS y $F_{(1, 18)} = 38.98$; $p < 0.001$ para VPA-SAL), los ratones pertenecientes al grupo VPA-LPS no distinguen entre ambos compartimentos ($F_{(1, 20)} = 2.69$; $p = 0.117$) (Figura 5.4 B).

Estos resultados muestran que al aumentar los niveles de inflamación durante el período crítico mediante la administración periférica de LPS, los ratones VPA hembras muestran un fenotipo de sociabilidad reducida durante la adultez.

En el caso de los ratones macho, en cambio, no se halló interacción ni efectos de ninguno de los tratamientos; es decir, todos los grupos presentan los mismos niveles de sociabilidad (Figura 5.5).

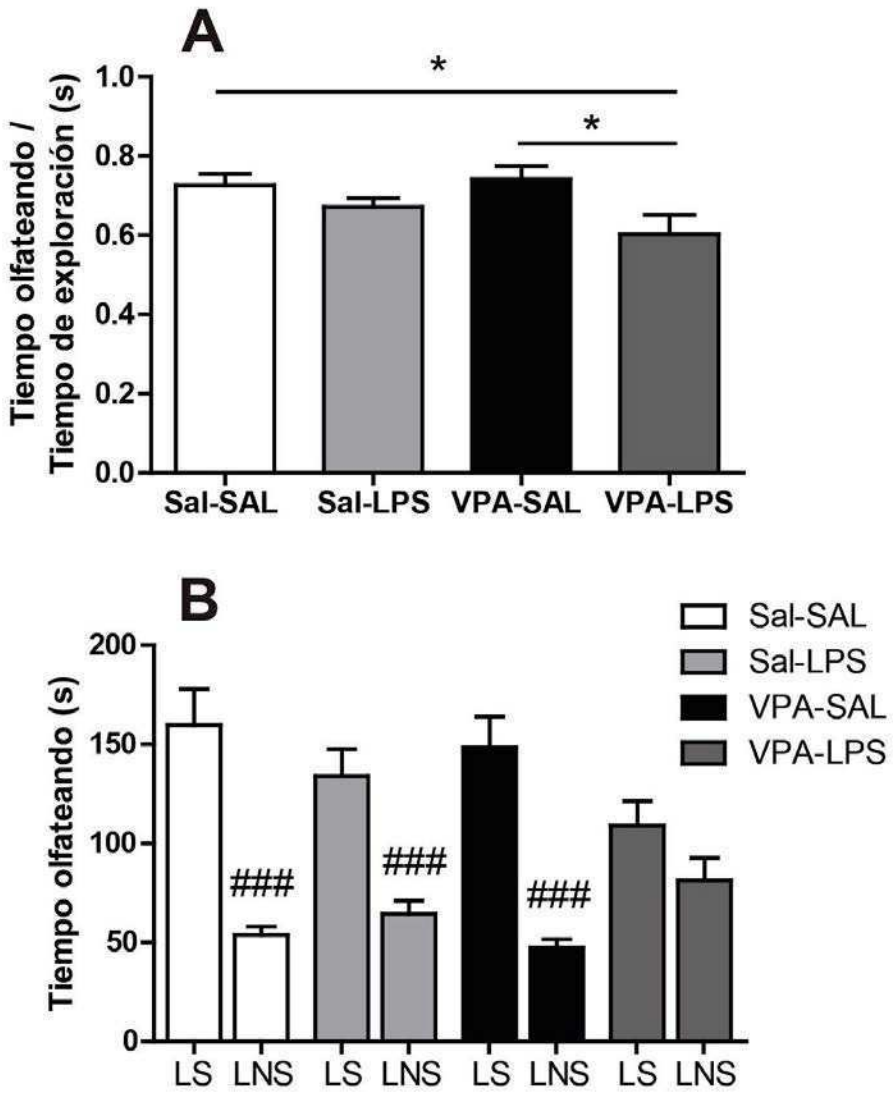

Figura 5.4 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la interacción social en animales hembras durante la adultez. Se cuantificó la proporción del tiempo que los animales pasaron olfateando al ratón estímulo sobre el tiempo total de exploración. Mientras que los animales VPA-LPS hembra muestran menores niveles de exploración social, el resto de los grupos presenta niveles normales (A). Al mismo tiempo, estos ratones son los únicos que no presentan una preferencia por el lado social (B). N: Sal-SAL = 13, Sal-LPS = 12, VPA-SAL = 10, VPA-LPS = 12. Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$. ANOVA de un factor: ### $p < 0.001$. Se grafica la media + SEM. LS, lado social; LNS, lado no social.

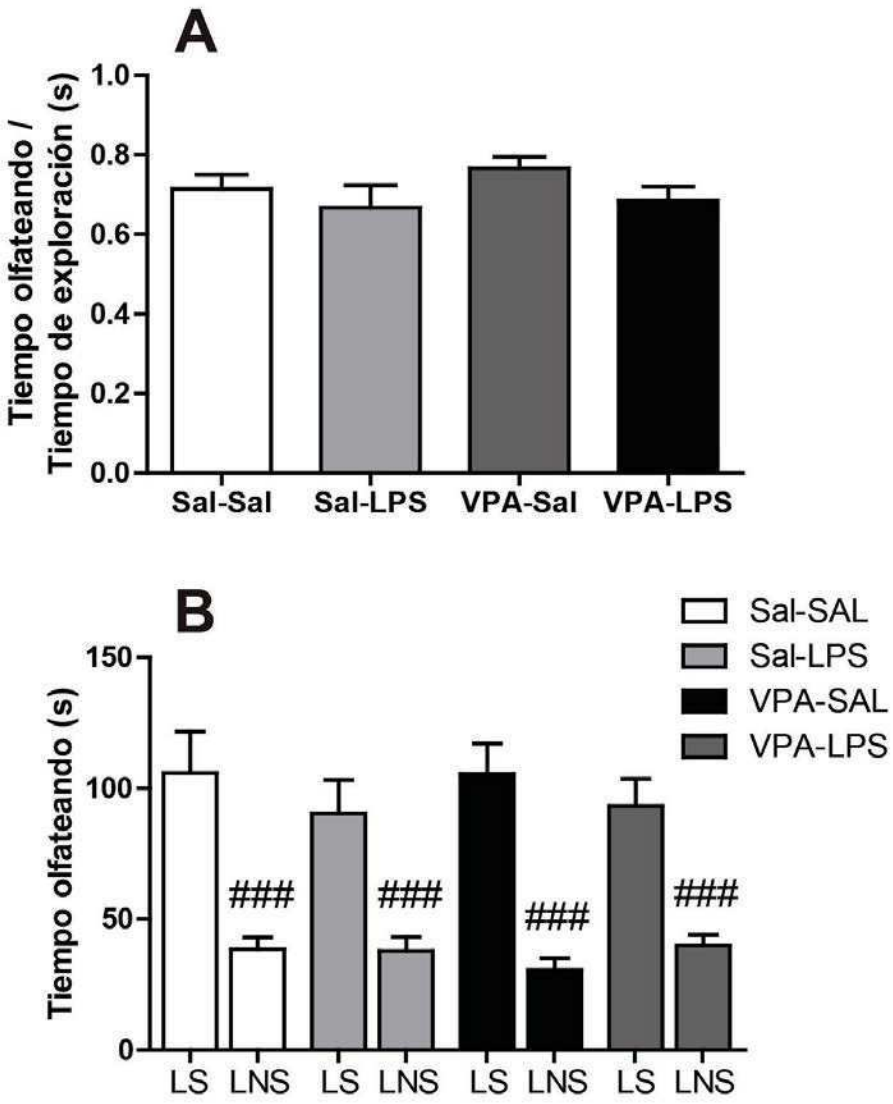

Figura 5.5 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la interacción social en animales machos durante la adultez. Se cuantificó la proporción del tiempo que los animales pasaron olfateando al ratón estímulo sobre el tiempo total de exploración. Todos los grupos de animales macho muestran niveles similares de exploración social (A), así como preferencia por el lado social (B). N: Sal-SAL = 11, Sal-LPS = 12, VPA-SAL = 12, VPA-LPS = 11. ANOVA de un factor: ### $p < 0.001$. Se grafica la media + SEM. LS, lado social; LNS, lado no social.

Considerando que los ratones machos VPA muestran niveles reducidos de exploración social en la adultez, como se ha mostrado en la sección 3, esperábamos que la administración de LPS entre P21 y P35 produjera una exacerbación del fenotipo conductual. Sorprendentemente, los resultados obtenidos muestran que la administración repetida tanto de solución salina como de LPS, revierte el fenotipo conductual observado en los animales VPA. Esta afirmación recibe sustento al analizar el tiempo que los animales pasan olfateando el lado social y el lado no social del aparato. Previamente, en la sección 3, mostramos que mientras los animales Sal pasaban más tiempo explorando el lado social, los animales VPA machos pasaban la misma cantidad de tiempo en ambos compartimentos. Sin embargo, estas diferencias desaparecen luego del tratamiento postnatal, ya que en la Figura 5.5 B podemos observar que todos los grupos pasan significativamente más tiempo explorando al ratón frente al objeto.

5.2.2 Autoacicalamiento

Acicalarse a sí mismos es un comportamiento natural de los roedores, aunque también se ha demostrado que puede desencadenarse frente a situaciones de estrés (Crawley, 2012). Este hecho puede ser aprovechado para estudiar comportamientos estereotipados o repetitivos, como parte de los comportamientos relacionados con el autismo. El ensayo fue realizado como se explica en la sección 2.4.2, cuantificando el tiempo que los animales pasaron acicalándose.

No se hallaron efectos de los tratamientos pre y postnatales, así como tampoco interacciones entre los mismos para ninguno de los sexos (Figura 5.6). Todos los grupos muestran niveles similares de acicalamiento, por lo que no se observa la presencia de los comportamientos estereotipados o repetitivos que pueden ser evaluados mediante este ensayo.

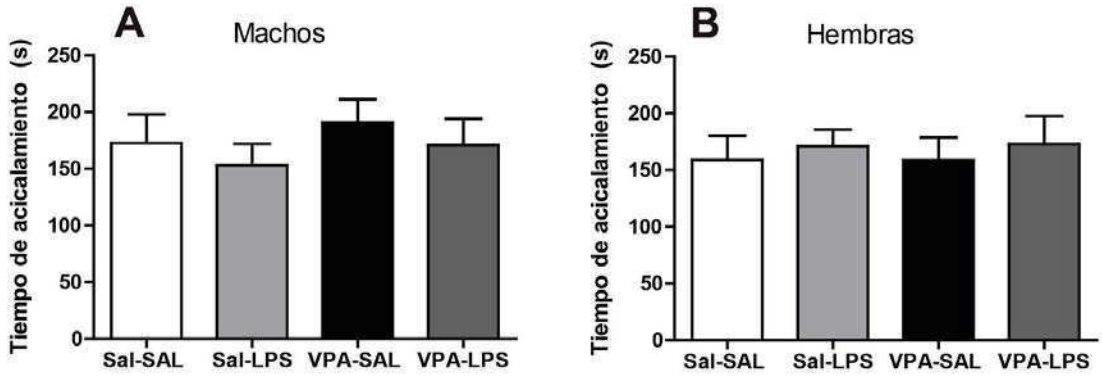

Figura 5.6 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre el comportamiento de autoacicalamiento en animales machos y hembras durante la adultez. Se cuantificó el tiempo que los animales pasaron acicalándose. No se observó la presencia de comportamientos estereotipados o repetitivos dado que todos los grupos presentan niveles similares de acicalamiento. N machos: Sal-SAL = 11, Sal-LPS = 11, VPA-SAL = 11, VPA-LPS = 11; N hembras: Sal-SAL = 13, Sal-LPS = 12, VPA-SAL = 10, VPA-LPS = 12. Se grafica la media + SEM.

5.2.3 Ensayo de campo abierto, locomoción en un medio novedoso

La ansiedad es un síntoma que suele presentarse junto con los comportamientos relacionados con el autismo, es decir que tiene alta comorbilidad con el desorden. Dado que tanto una disminución en los niveles de exploración como un aumento en los niveles de ansiedad podría afectar los resultados obtenidos en el ensayo de interacción social, decidimos evaluarlos. Para evaluar los comportamientos relacionados con la ansiedad suele utilizarse el ensayo de campo abierto (*Open Field*), donde el animal se debate entre explorar el medio novedoso y evitar el centro del aparato, iluminado y altamente ansiogénico. Este ensayo también permite evaluar los niveles de exploración.

En el caso de las hembras, al realizar el ensayo no encontramos diferencias en la distancia total recorrida, como así tampoco en el porcentaje de distancia recorrida o el tiempo en el centro del aparato. Todos los grupos de animales hembra presentan niveles similares de locomoción en el campo abierto (Figura 5.7).

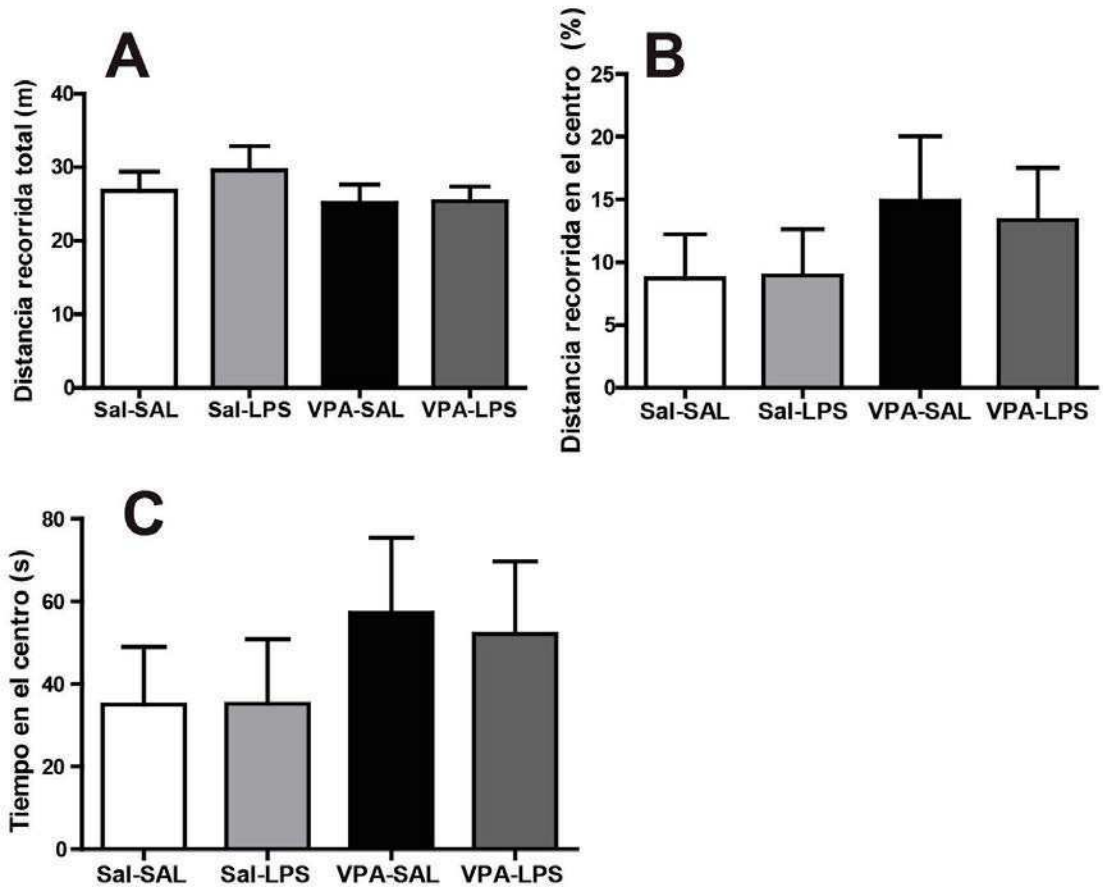

Figura 5.7 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la locomoción en un medio novedoso en animales hembras durante la adultez. Se cuantificó la distancia total recorrida dentro de la arena experimental (A), así como el porcentaje de la distancia recorrida en el centro (B) y el tiempo en el centro del aparato. Los tratamientos no provocaron efectos sobre la locomoción en los animales hembras. N: Sal-SAL = 13, Sal-LPS = 12, VPA-SAL = 9, VPA-LPS = 12. Se grafica la media + SEM.

En el caso de los machos, se halló un efecto del tratamiento prenatal al analizar la distancia total recorrida por los animales ($F_{(1, 26)} = 5.46$; $p = 0.033$) y del tratamiento postnatal sobre el tiempo en el centro ($F_{(1, 26)} = 5.57$; $p = 0.023$) (Figura 5.8 A). Los animales VPA recorren una menor distancia que los animales Sal, por lo que puede decirse que éstos poseen menores niveles de exploración.

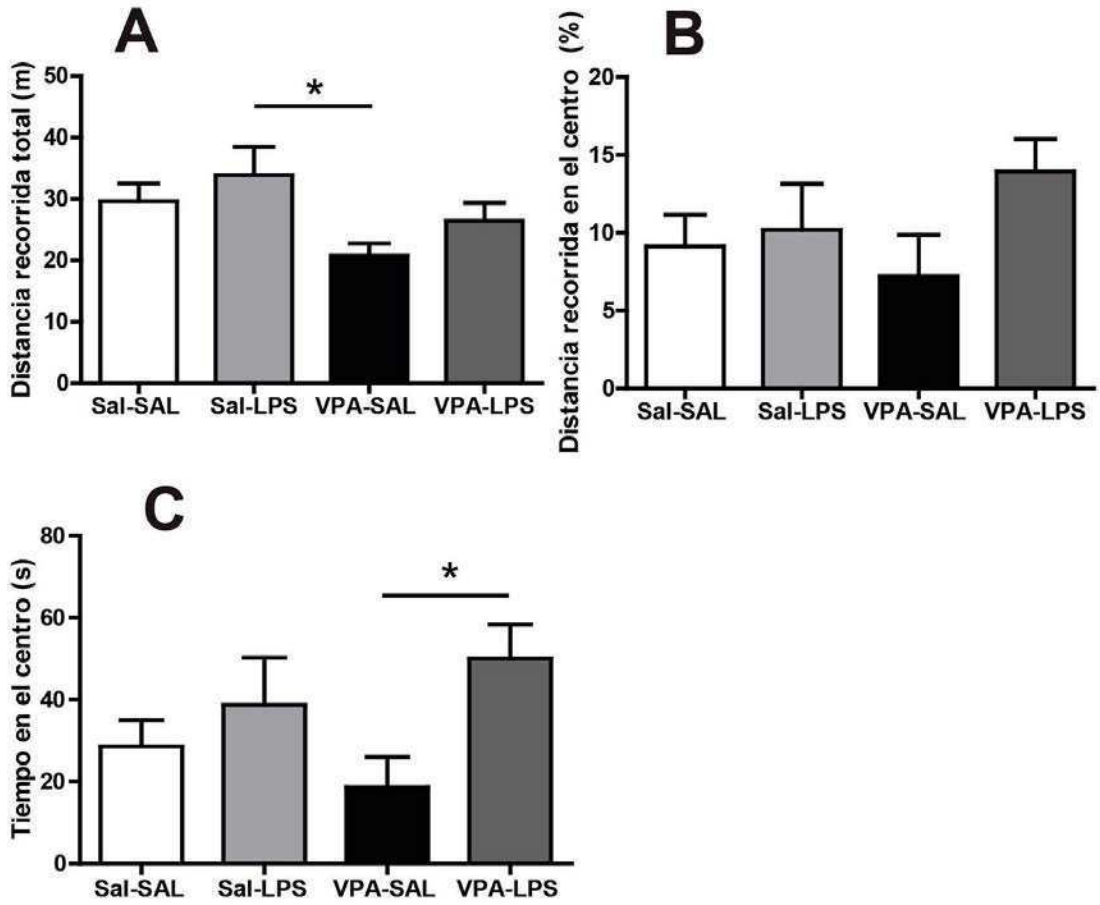

Figura 5.8 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la locomoción en un medio novedoso en animales macho durante la adultez. Se cuantificó la distancia total recorrida dentro de la arena experimental (A), así como el porcentaje de la distancia recorrida en el centro (B) y el tiempo en el centro del aparato (C). Los animales VPA presentan menores niveles de exploración que los Sal (A. Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$. N: Sal-SAL = 11, Sal-LPS = 12, VPA-SAL = 11, VPA-LPS = 12. Se grafica la media + SEM.

5.2.4 Respuesta inflamatoria periférica

En las secciones 3 y 4 mostramos que, ante un estímulo inflamatorio, todos los animales desencadenan una respuesta inflamatoria periférica, activando el eje HPA y aumentando la liberación de corticosterona. Sin embargo, hemos observado que mientras los machos VPA adultos poseen una respuesta inflamatoria periférica normal, las hembras VPA presentan una respuesta exacerbada ante el estímulo, evidenciada por mayores niveles de corticosterona en plasma que aquellos presentes en las hembras Sal.

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar los efectos de la exposición prolongada al LPS durante el período crítico sobre la respuesta del eje HPA en la adultez. Dado que nos es de particular interés comparar la respuesta ante el estímulo inflamatorio de los distintos grupos, es decir, la presencia de una respuesta normal o una respuesta exacerbada, todos los animales fueron inyectados con LPS. De manera análoga a los experimentos previos, 2 hs post inyección se extrajo el plasma que fue posteriormente analizado a través de un radioinmunoensayo (Figura 5.9).

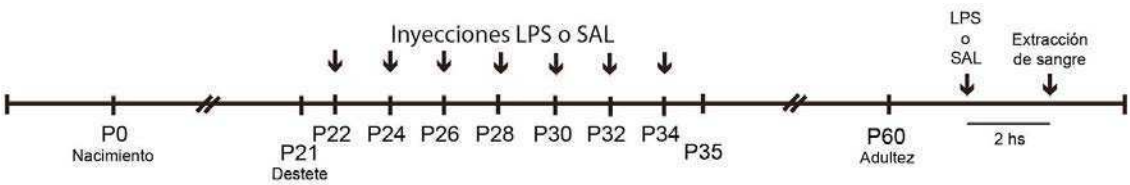

Figura 5.9 - Esquema experimental del estudio de la respuesta inflamatoria periférica en la adultez en animales expuestos a un estímulo inflamatorio durante el período crítico.

Al analizar los animales hembras mediante un ANOVA de dos factores, encontramos únicamente un efecto del tratamiento prenatal ($F_{(1, 20)} = 16.24$; $p < 0.001$), por lo que el tratamiento con LPS durante el período crítico no afectó la respuesta inflamatoria periférica en la adultez (Figura 5.10).

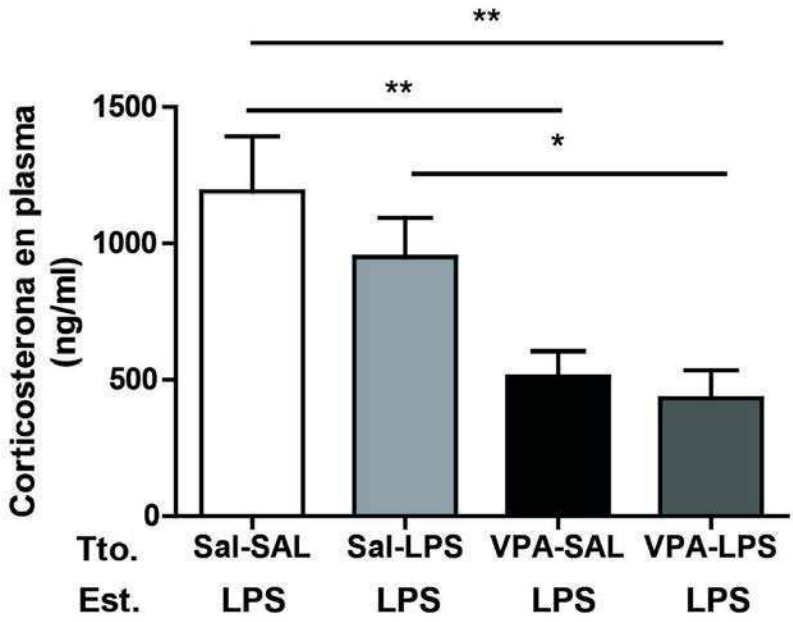

Figura 5.10 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la respuesta inflamatoria periférica en animales hembras durante la adultez. Se midieron los niveles de corticosterona en plasma 2 hs luego de la administración de LPS intraperitoneal, por medio de radioinmunoensayo. Los animales tratados prenatalmente con VPA muestran una respuesta del eje HPA atenuada frente a un estímulo inflamatorio, independientemente del tratamiento postnatal. N: Sal-SAL = 6, Sal-LPS = 7, VPA-SAL = 5, VPA-LPS = 6. Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Se grafica la media + SEM. Tto, tratamiento; Est, estímulo.

Sin embargo, en la sección 3 mostramos que los animales VPA inyectados con LPS presentaban mayores niveles de corticosterona que los animales Sal inyectados

con LPS, por lo que hablamos de una exacerbación de la respuesta inflamatoria. En este caso, no sólo se perdió dicha exacerbación, sino que además los niveles de corticosterona de los animales VPA son significativamente menores que los de los animales Sal, por lo que la respuesta se ve atenuada.

En el caso de los animales machos, no se hallaron diferencias entre ninguno de los grupos. El tratamiento con LPS durante el período crítico no provocó cambios en la respuesta inflamatoria periférica (Figura 5.11).

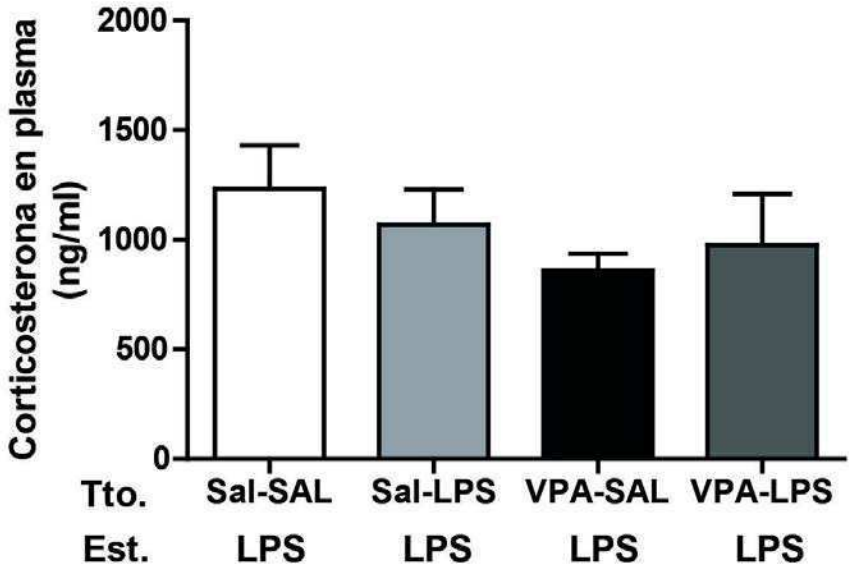

Figura 5.11 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la respuesta inflamatoria periférica en animales machos durante la adultez. Se midieron los niveles de corticosterona en plasma 2 hs luego de la administración de LPS intraperitoneal, por medio de radioinmunoensayo. No fueron halladas diferencias entre los grupos de animales macho. N: Sal-SAL = 5, Sal-LPS = 6, VPA-SAL = 6, VPA-LPS = 5. Se grafica la media + SEM. Tto, tratamiento; Est, estímulo.

Contrariamente a lo ocurrido con los animales hembras, la repetida exposición a inyecciones de SAL o LPS durante el período crítico no generó ningún cambio en la respuesta del eje HPA ante un estímulo inflamatorio.

Estos resultados muestran que la exposición prolongada a un tratamiento inflamatorio durante el período crítico P21-P35 genera efectos sexo-específicos sobre la respuesta inflamatoria periférica en la adultez. Mientras que este tratamiento no provoca cambios en los animales machos, en los animales VPA hembra elimina la exacerbación observada previamente hasta llegar a una respuesta atenuada del eje HPA ante un estímulo inflamatorio.

5.2.5 Neuroinflamación

Con el fin de analizar los efectos de la exposición prolongada al LPS durante el período crítico sobre el estado neuroinflamatorio, caracterizamos los niveles de activación glial mediante inmunofluorescencia de la misma manera que en la sección 3. Esto fue realizado en animales hembras, ya que queríamos estudiar si diferencias en el estado neuroinflamatorio podían mediar las diferencias observadas en la conducta.

5.2.5.1 Hipocampo

El giro dentado fue dividido en tres zonas. Al analizar la densidad celular de astrocitos encontramos una interacción entre los tratamientos pre y postnatales en la capa molecular ($F_{(1, 15)} = 10.87$; $p = 0.005$). Realizando un análisis posthoc de Fisher hallamos que mientras el grupo VPA-SAL presenta una mayor densidad celular que el grupo Sal-SAL, los animales VPA-LPS presentan niveles de astrocitos similares a los de los animales Sal-SAL (Figura 5.12). Ningún efecto fue hallado en las otras zonas

del giro dentado, la capa granular y el hilus, como así tampoco se encontraron diferencias para la densidad microglial en ninguna zona (Figuras 5.13 y 5.14).

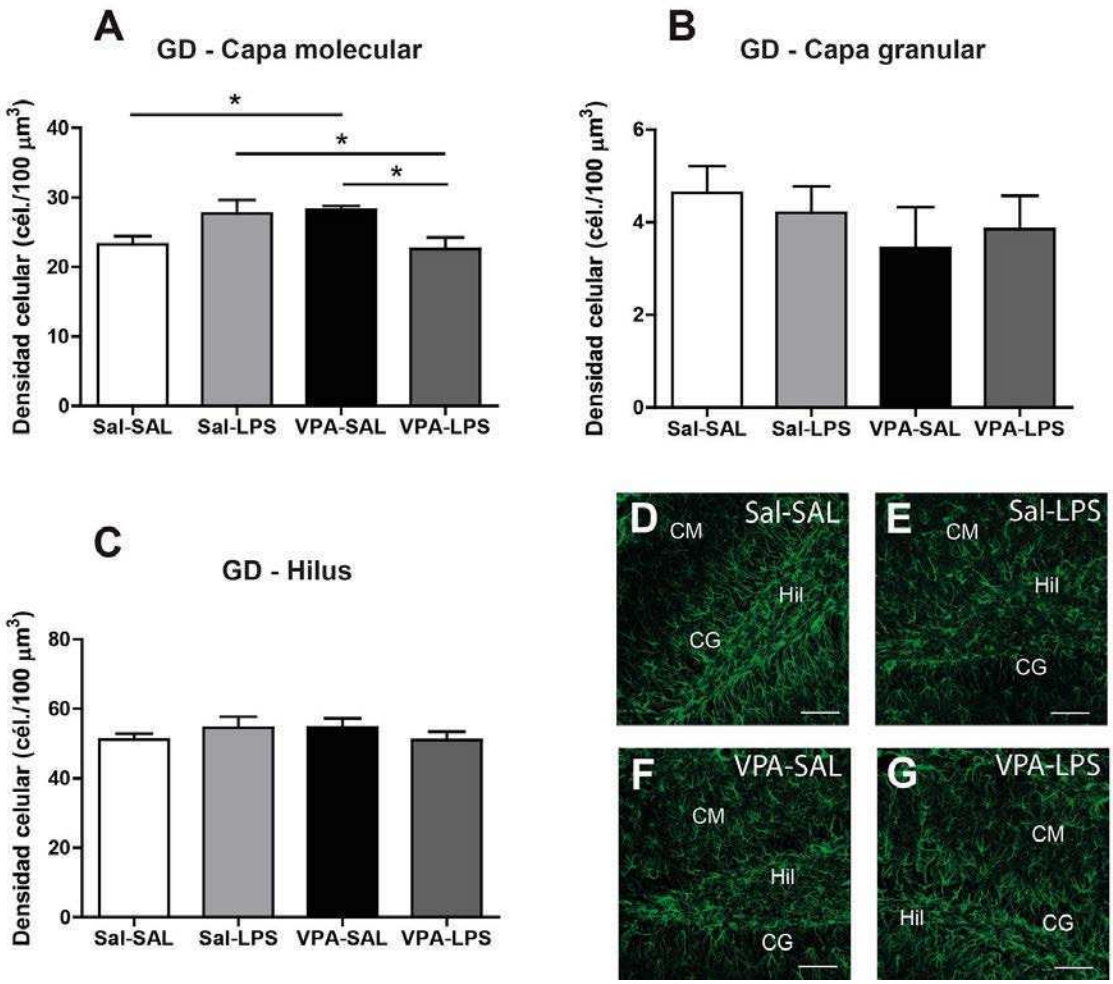

Figura 5.12 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la densidad astroglial en el giro dentado en animales hembras durante la adultez. El tratamiento con LPS durante el período postnatal provoca una disminución en la densidad astrocitaria en los animales VPA, presentando niveles similares a los animales Sal-SAL en la capa molecular (A). No se observaron efectos de los tratamientos en la capa granular (B) o el hilus (C). Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-GFAP realizadas en ratones Sal-SAL (D), Sal-LPS (E), VPA-SAL (F) y VPA-LPS (G). Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. GD, giro dentado; ML, capa molecular; GL, capa granular; Hil, hilus.

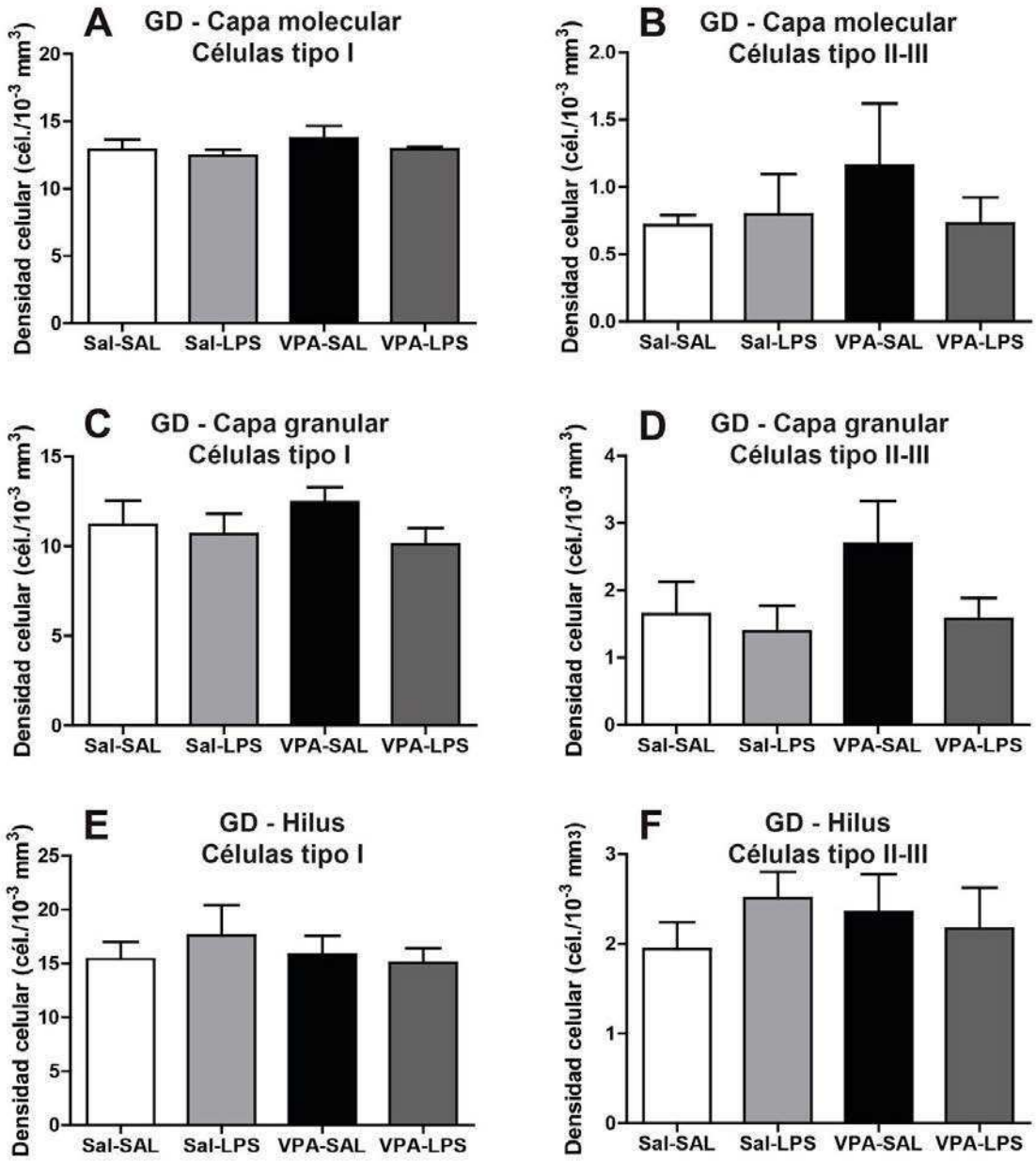

Figura 5.13 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la densidad de células microgliales de tipo I y tipo II-III en el giro dentado en animales hembras durante la adultez. Los tratamientos no provocaron efectos sobre la densidad microglial de células de tipo I y de tipo II-III en las capas molecular (A, B) y granular (C, D), ni tampoco en el hilus (E, F). Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. GD, giro dentado; ML, capa molecular; GL, capa granular; Hil, hilus.

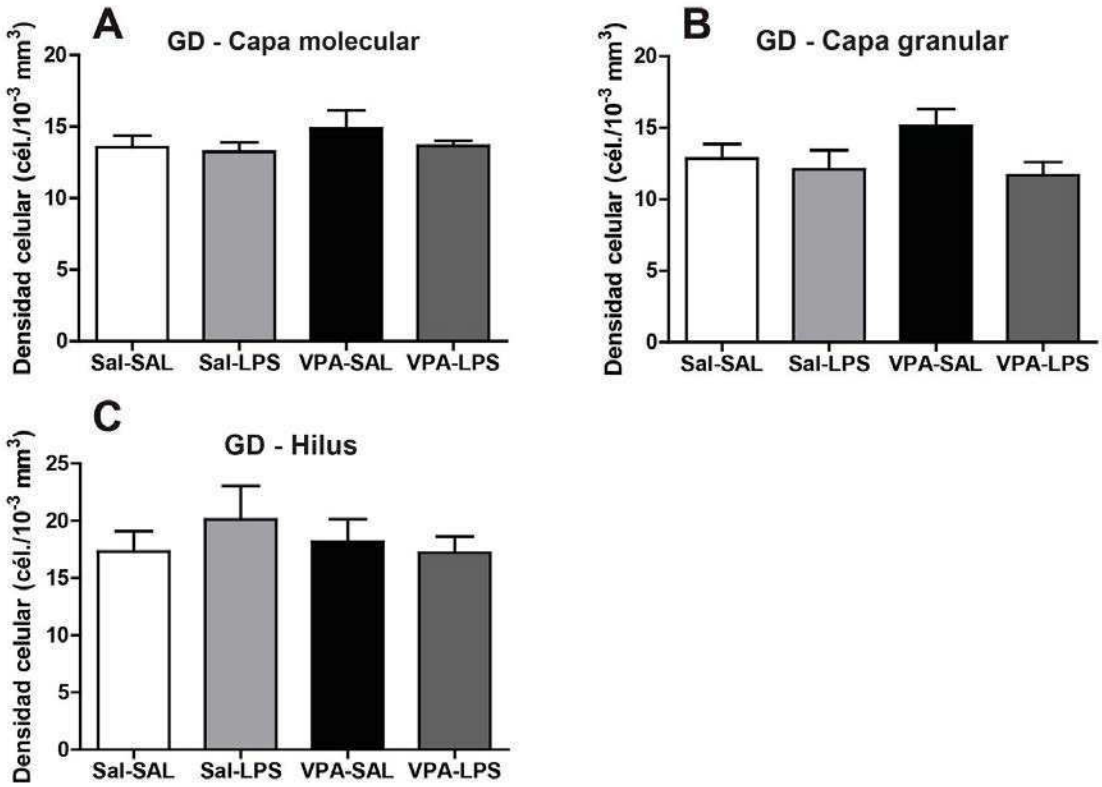

Figura 5.14 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la densidad de células microgliales totales en el giro dentado en animales hembras durante la adultez. No se hallaron diferencias entre los grupos sobre la densidad microglial total en las capas molecular (A) y granular (B), ni en el hilus (C). Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. GD, giro dentado; ML, capa molecular; GL, capa granular; Hil, hilus.

Con respecto a la región CA1, el análisis de la densidad microglial no reveló efectos de los tratamientos en ninguna de las zonas (Figura 5.16 y 5.17). Además, tampoco se hallaron cambios en la densidad celular astrocitaria en el *stratum oriens* y *stratum radiatum* (Figura 5.15 A, C). En cambio, al estudiar la capa piramidal hallamos un efecto del tratamiento prenatal ($F_{(1,\ 15)}$ = 12.62; p = 0.003), pero ningún efecto del tratamiento prolongado con LPS sobre los astrocitos (Figura 5.15 B).

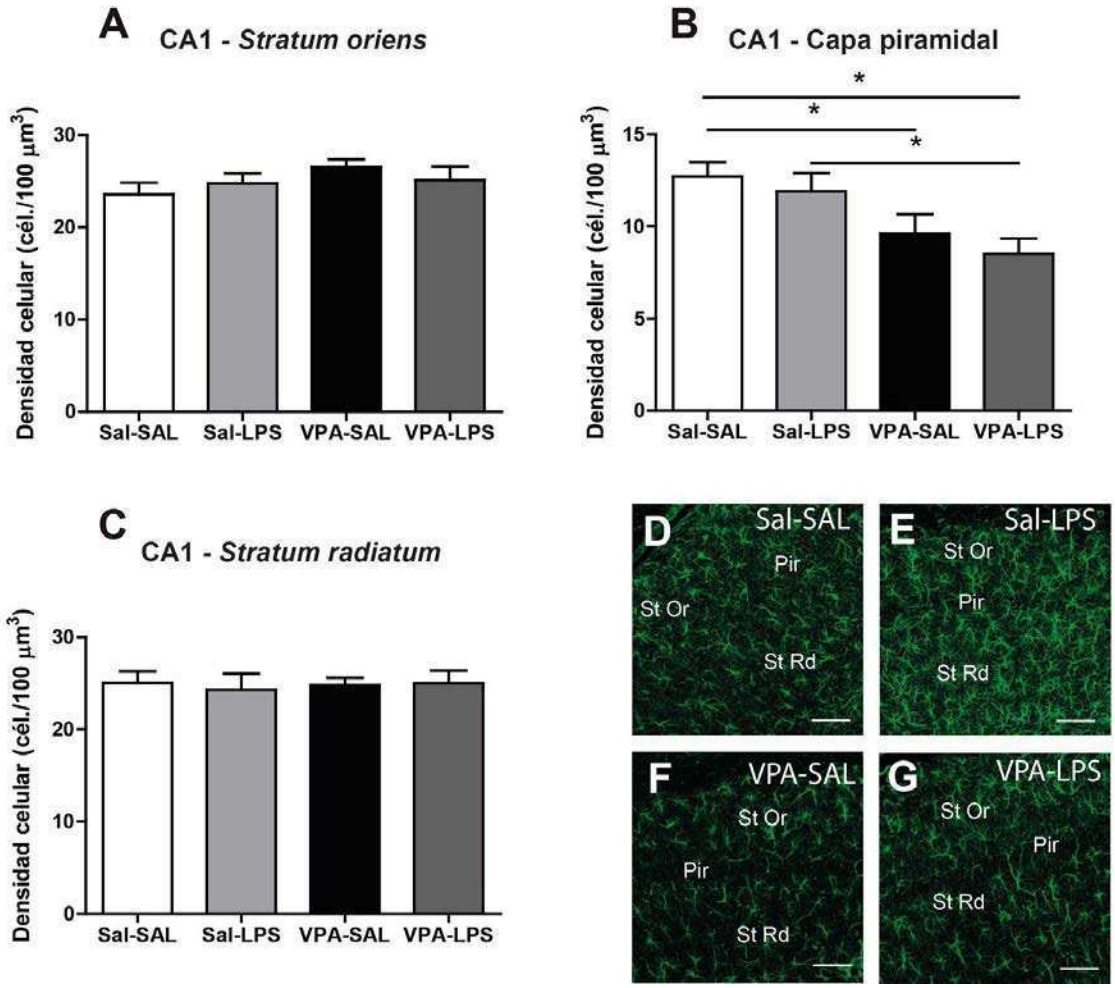

Figura 5.15 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la densidad astroglial en la región CA1 en animales hembras durante la adultez. Los animales expuestos prenatalmente a VPA presentan menores niveles de densidad celular astrocitaria en la capa piramidal (B), independientemente del tratamiento postnatal. No se hallaron efectos de los tratamientos sobre los *stratum oriens* (A) o *radiatum* (C). Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-GFAP realizadas en ratones Sal-SAL (D), Sal-LPS (E), VPA-SAL (F) y VPA-LPS (G). Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. *St Or*, *stratum oriens; St R, stratum radiatum*; PL, capa piramidal.

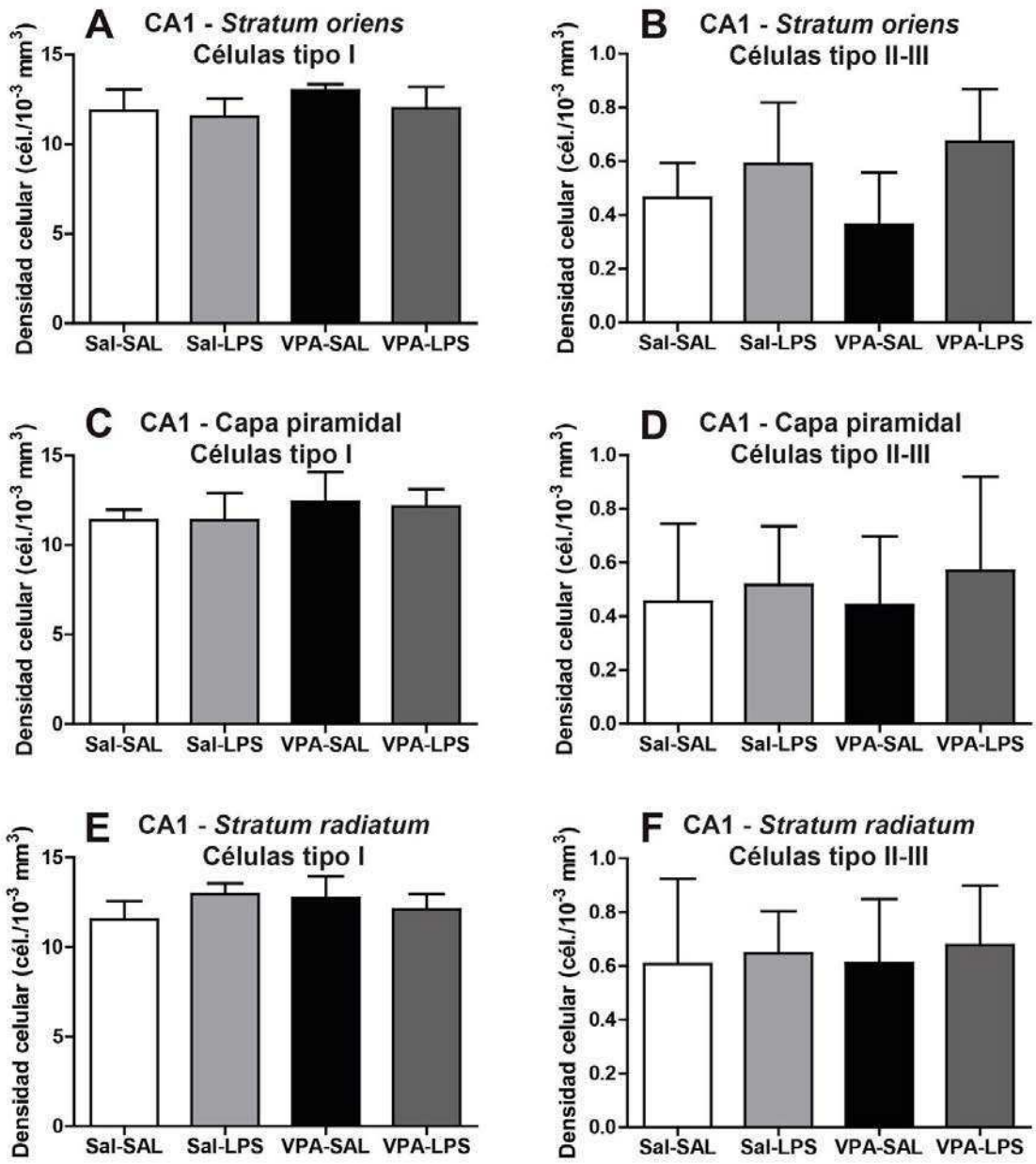

Figura 5.16 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la densidad de células microgliales de tipo I y tipo II-III en la región CA1 en animales hembras durante la adultez. No se encontraron efectos de los tratamientos sobre la densidad microglial de células de tipo I y de tipo II-III en las capas molecular (A, B) y granular (C, D) ni tampoco en el hilus (E, F). Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. *St Or*, *stratum oriens; St R, stratum radiatum*; PL, capa piramidal.

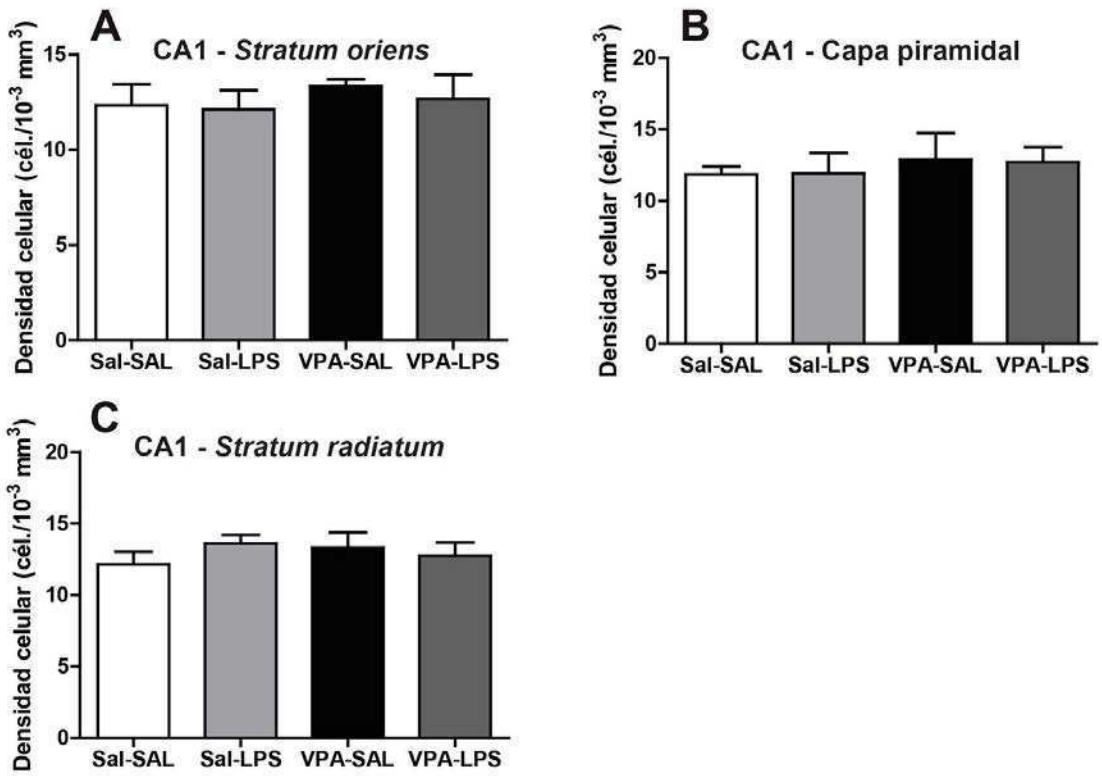

Figura 5.17 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la densidad de células microgliales totales en la región CA1 en animales hembras durante la adultez. No se observaron alteraciones en la densidad microglial total en las capas molecular (A) y granular (B) ni en el hilus (C). Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. *St Or*, *stratum oriens; St R, stratum radiatum*; PL, capa piramidal.

Este resultado difiere de lo hallado en la sección 3, donde no se encontraron diferencias en ninguna zona de CA1. En este caso vemos que ambos grupos de animales VPA presentan una menor densidad celular que los animales Sal, por lo que consideramos que se debe a la exposición a las sucesivas inyecciones. De manera similar a lo que ocurre con la respuesta inflamatoria periférica, podría tratarse de un fenómeno de compensación.

En líneas generales, vemos que el tratamiento con LPS durante el período crítico no genera cambios en la activación glial del hipocampo, a excepción de la capa

molecular del giro dentado. En esta zona vemos que la exposición al LPS entre P21 y P35 en los ratones VPA evita el aumento en la densidad celular de astrocitos observado en los animales VPA-SAL.

5.2.5.2 Cerebelo

Al analizar el área GFAP+ hallamos un efecto del tratamiento prenatal ($F_{(1, 14)}$ = 5.43; p = 0.035) y una interacción significativa entre ambos factores ($F_{(1, 14)}$ = 9.41; p = 0.008) en la capa granular. Los resultados fueron similares para la capa molecular, dado que se encontró un efecto del tratamiento con VPA ($F_{(1, 14)}$ = 6.01; p = 0.028) y una fuerte tendencia en la interacción entre ambos tratamientos ($F_{(1, 14)}$ = 4.18; p = 0.060) (Figura 5.18).

La densidad microglial en la capa granular no se vió afectada por ninguno de los tratamientos. En cambio, en la capa molecular se halló una interacción significativa entre ambos tratamientos para la densidad celular total ($F_{(1, 14)}$ = 5.11; p = 0.040) y para la densidad de células de tipo I ($F_{(1, 14)}$ = 20.33; p < 0.001) (Figura 5.20 y 5.19).

En los casos en los que se observaron diferencias, vemos que el tratamiento prenatal con VPA produce un aumento de la activación glial, pero al ser combinado con el tratamiento postnatal de LPS la densidad glial no se diferencia de aquella presente en los ratones Sal-SAL. Como se ha mencionado previamente, esto podría ser explicado por un mecanismo de compensación, es decir que el aumento en los niveles de inflamación durante el período crítico podría provocar que el sistema disminuya sus niveles celulares para compensar el aumento provocado por el inflamógeno.

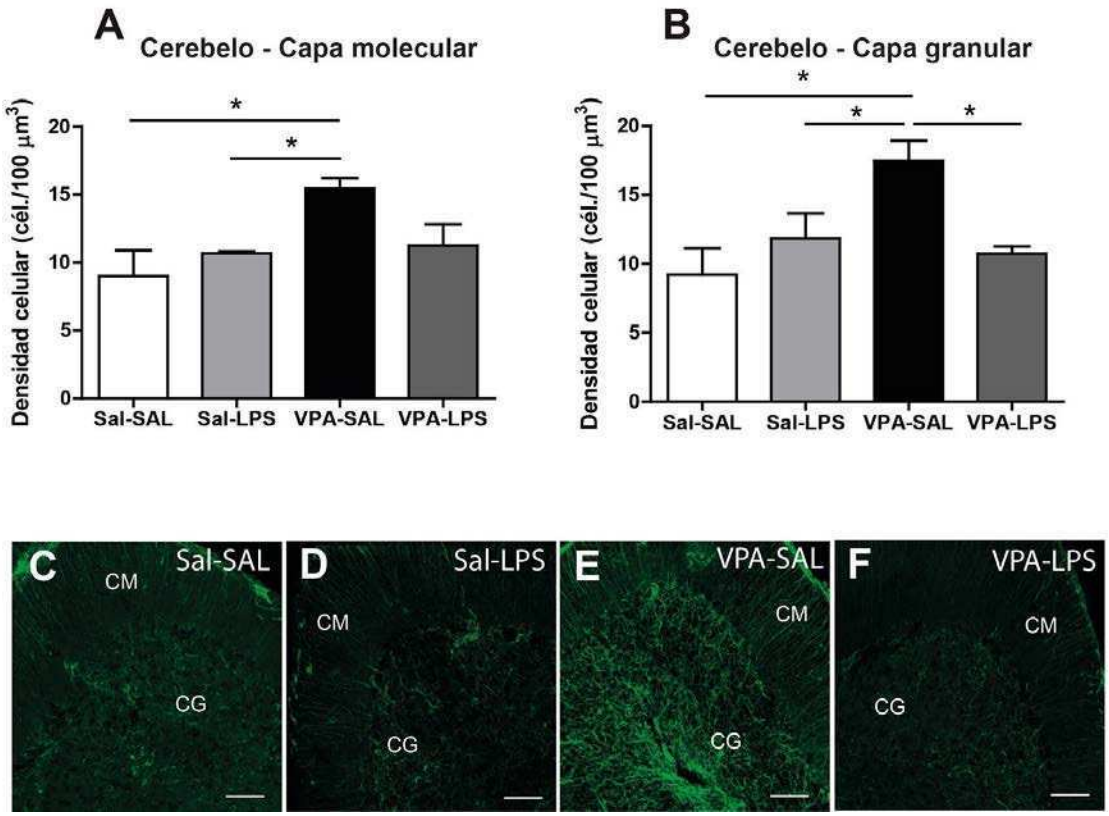

Figura 5.18 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la densidad astroglial en el lóbulo VII del cerebelo en animales hembras durante la adultez. El tratamiento prenatal con VPA provoca un aumento en la densidad celular astrocitaria en ambas capas del cerebelo. Sin embargo, el tratamiento con LPS durante el período postnatal provoca una disminución en la densidad de estas células en la capa granular (B), presentando niveles similares a los animales Sal-SAL. Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-GFAP realizadas en ratones Sal-SAL (C), Sal-LPS (D), VPA-SAL (E) y VPA-LPS (F). Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. ML, capa molecular; GL, capa granular.

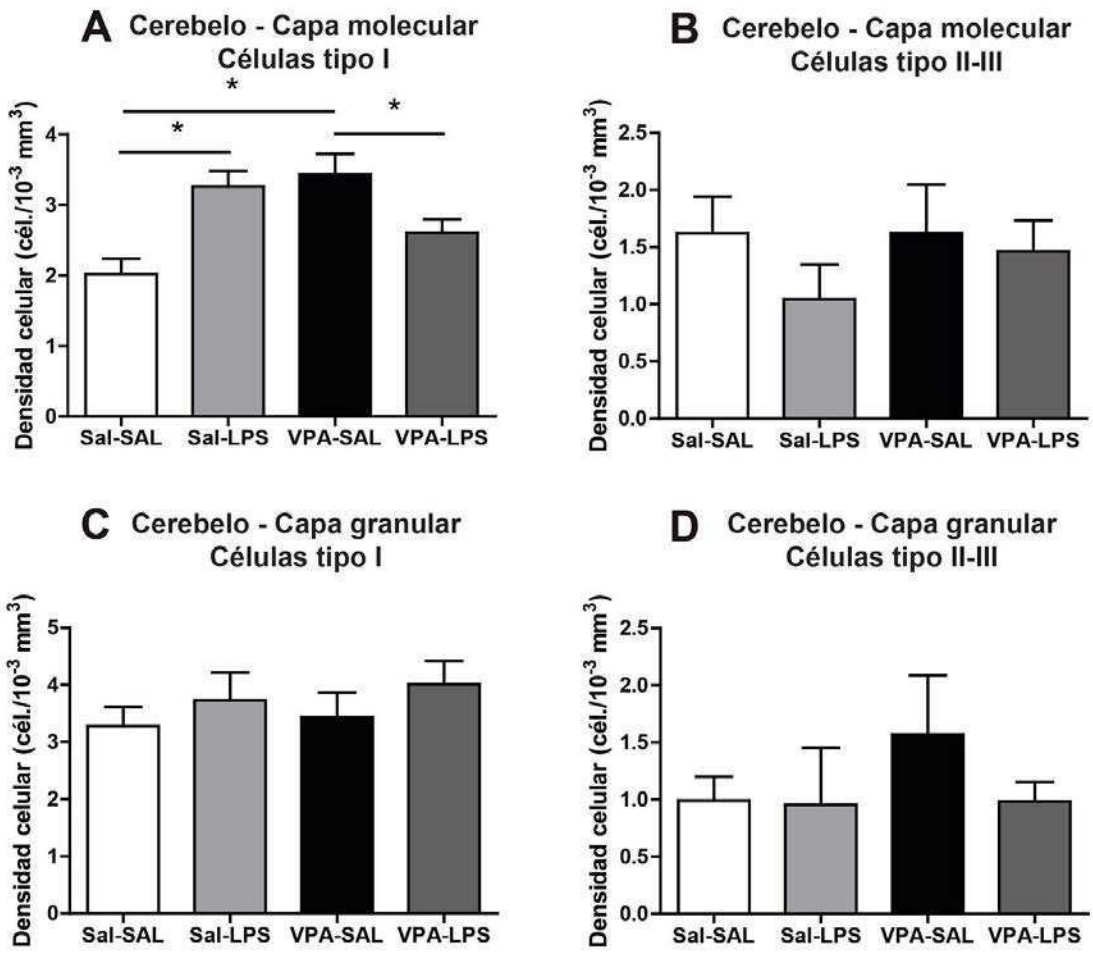

Figura 5.19 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la densidad de células microgliales de tipo I y tipo II-III en el lóbulo VII del cerebelo en animales hembras durante la adultez. Se observó un aumento de la densidad microglial de células de tipo I en la capa molecular debido al tratamiento prenatal con VPA, aunque la exposición al LPS postnatal revierte este fenómeno. Además, los ratones Sal-LPS muestran también un aumento en la densidad celular (A). Por el contrario, no se observaron cambios en la capa granular para las células de tipo I (C), ni en las células de tipo II-III en ambas capas (B, D). Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. ML, capa molecular; GL, capa granular.

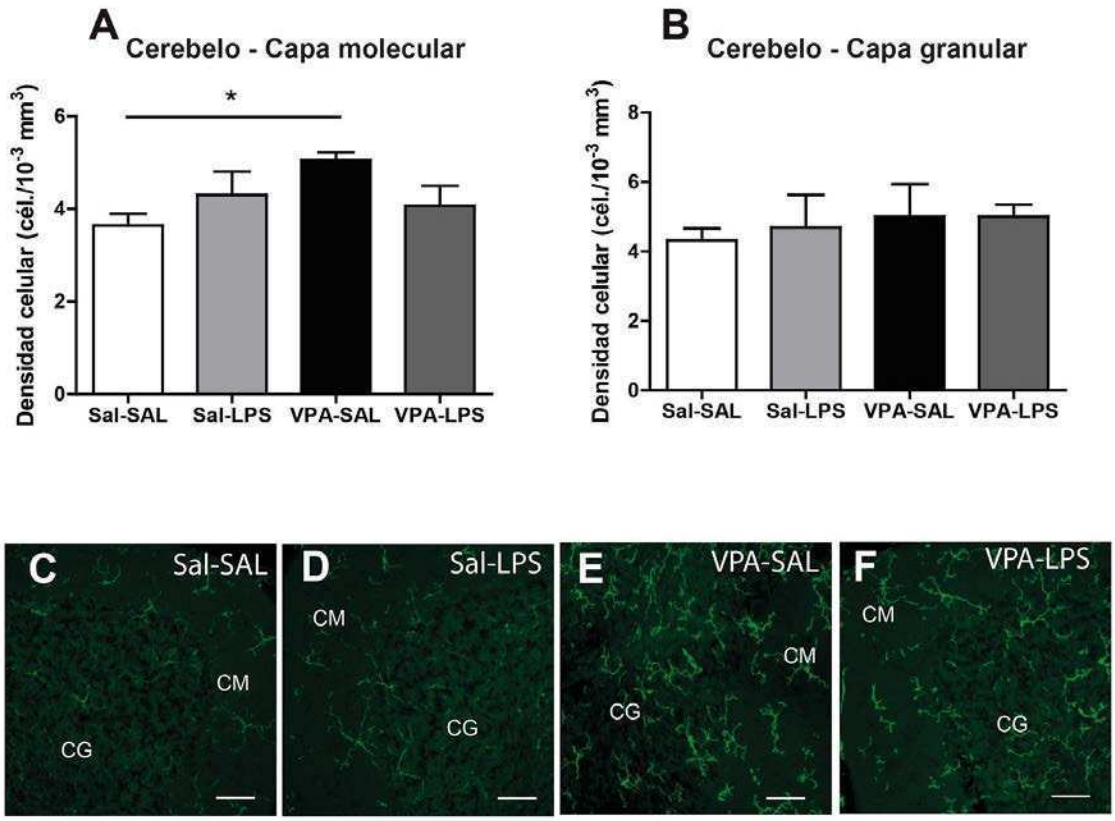

Figura 5.20 - Efecto de la exposición a un estímulo inflamatorio durante el período crítico sobre la densidad de células microgliales totales en el lóbulo VII del cerebelo en animales hembras durante la adultez. Únicamente los animales VPA tratados con SAL durante el período postnatal presentan un incremento en la densidad celular microglial total en la capa molecular (A), el tratamiento postnatal con LPS muestra una tendencia a regularizar los niveles celulares a aquellos de los ratones Sal-SAL. Fotografías representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia anti-IBA1 realizadas en ratones Sal-SAL (C), Sal-LPS (D), VPA-SAL (E) y VPA-LPS (F). Test LSD de Fisher: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM. Barra de escala, 50 µm. ML, capa molecular; GL, capa granular.

5.3 Discusión y conclusiones

Dadas las alteraciones sexo-específicas encontradas en los animales VPA adultos, y una vez delimitado el período crítico en el que las señales de neuroinflamación se hacen evidentes durante el período postnatal, nos dispusimos a evaluar el efecto de un estímulo inflamatorio postnatal sobre el desarrollo de los comportamientos relacionados con el autismo.

En primer lugar, observamos que un único evento inflamatorio administrado en la mitad del período crítico no produce efectos en el comportamiento social de los animales hembras en la adultez. Sin embargo, la administración prolongada de un inflamógeno a lo largo del período comprendido entre P21 y P35 es capaz de provocar efectos sexo-específicos a largo plazo.

Hallamos que los animales VPA hembras expuestos a LPS durante el período postnatal muestran menores niveles de interacción social, y la ausencia de preferencia social. Dado que las hembras VPA-SAL no muestran dichas alteraciones, podemos concluir que la exposición a la inflamación postnatal produce la aparición del fenotipo de sociabilidad reducida.

Los animales VPA-LPS macho, por el contrario, muestran niveles de exploración social similares a los de los ratones Sal-SAL, y a su vez también presentan preferencia social por sobre un objeto. Estas observaciones se contraponen con los resultados esperados, ya que teniendo en cuenta que aquellos ratones machos que reciben un tratamiento prenatal con VPA muestran niveles reducidos de sociabilidad, esperábamos que la administración de LPS entre P21 y P35 produjera una exacerbación del fenotipo conductual. Otra posibilidad, dado que el período crítico fue mayormente caracterizado en hembras, era que el LPS no tuviera efecto alguno sobre los machos. Curiosamente, esta reversión del fenotipo conductual ocurre tanto en los animales expuestos a LPS como en los expuestos a SAL durante el período postnatal, por lo que no pareciera ser un efecto específico del LPS, sino un efecto de

la administración repetida de un tratamiento o de la manipulación reiterada durante el período crítico.

Un fenómeno similar ocurre con la respuesta inflamatoria periférica. En la sección 3 mostramos que los animales VPA machos presentan una respuesta normal del eje HPA ante un estímulo inflamatorio y en cambio las hembras muestran una respuesta exacerbada. Sin embargo, al administrar un tratamiento postnatal esta exacerbación de la respuesta desaparece, llegando incluso a atenuarse. Curiosamente, esto ocurre tanto si el tratamiento postnatal es realizado con SAL como con LPS, pero únicamente en los animales hembras, ya que los machos no se ven afectados.

Los efectos de la manipulación de los animales y la administración repetida de un tratamiento parecieran ser distintos según el sexo del animal, ya que en los machos se ve afectado el comportamiento social y en las hembras la respuesta inflamatoria periférica. Esto posiblemente pueda ser explicado por dimorfismos sexuales naturales presentes en los sistemas responsables de ambos fenómenos (ver sección 7.4), aunque la respuesta al estrés podría jugar un rol en ambos casos.

La inflamación generada por la propia inyección suele ser leve y despreciable frente a la inflamación desencadenada por el LPS ante una única exposición. Sin embargo, la inflamación debida a sucesivas inyecciones podría no serlo. Además, los niveles de corticosterona no sólo se elevan como una respuesta ante un estímulo inflamatorio, sino también ante eventos de estrés. La exposición repetida al estrés generado por la manipulación del animal, además del provocado por la inyección en sí misma durante un período crítico para el desarrollo, puede haber afectado la homeostasis del sistema, generando una respuesta compensatoria. En los machos, podría haberse establecido un umbral más alto, generando una mayor tolerancia al estrés social en la adultez y permitiendo que tanto los animales VPA-LPS como los VPA-SAL presenten niveles normales de sociabilidad. En el caso de los animales hembras, la exposición prolongada al estímulo inflamatorio durante el período crítico P21-P35 puede haber provocado un aumento de los niveles de corticosterona postnatales, provocando una menor activación del eje HPA ante un único estímulo inflamatorio en la adultez, manifestándose así la respuesta atenuada que observamos

en las hembras VPA-SAL y VPA-LPS. Este fenómeno de hiporrespuesta al LPS tras repetidas administraciones del inflamógeno es comúnmente conocido como tolerancia a endotoxina (Cavaillon y Adib-Conquy, 2006; Schaafsma et al., 2015) y es considerada como una respuesta protectora mediada por la regulación positiva de citoquinas proinflamatorias.

Con respecto al análisis sobre el estado neuroinflamatorio realizado en animales hembras, en líneas generales no hemos encontrado cambios en la activación glial del hipocampo, a excepción de la capa molecular del giro dentado; y en las capas molecular y granular del cerebelo. En los casos en los que se hallaron diferencias, observamos que el tratamiento prenatal con VPA produce un aumento de la activación glial, pero al ser combinado con el tratamiento postnatal de LPS la densidad celular no se diferencia de aquella presente en los ratones Sal-SAL. Como se ha mencionado previamente, esto podría ser explicado por un mecanismo de compensación, es decir que el aumento en los niveles de inflamación durante el período crítico podría provocar que el sistema disminuya sus niveles celulares para compensar el aumento provocado por el inflamógeno.

Por otro lado, mostramos que los tratamientos pre y postnatales no afectan los niveles de autoacicalamiento en ninguno de los sexos, por lo que no se observa la presencia de los comportamientos estereotipados o repetitivos que pueden ser evaluados mediante este ensayo. Sin embargo, dado que en estudios previos del laboratorio fue hallado un incremento en el tiempo de autoacicalamiento de los machos VPA, podríamos estar en presencia de un fenómeno similar al observado en la interacción social, donde la exposición a repetidas inyecciones durante el período postnatal resultan en la reversión de un fenotipo previamente observado. La locomoción en un medio novedoso, en un ensayo de campo abierto, presentó también un dimorfismo sexual, ya que todos los grupos de animales hembras recorren distancias similares en la arena experimental; aunque los animales VPA-SAL macho recorren una menor distancia. Este efecto del tratamiento prenatal desaparece al administrar LPS durante el período crítico, por lo que este tratamiento revierte el fenotipo de menor exploración.

Podemos concluir que la administración repetida de un estímulo inflamatorio durante el período crítico postnatal presenta efectos en los comportamientos relacionados con el autismo, la respuesta inflamatoria periférica y los niveles de activación glial, que se desarrollan además de manera sexo-específica. Éstos parecen estar guiados por algún tipo de mecanismo de compensación homeostática, ya que la exposición al LPS y su consiguiente aumento de la inflamación durante el período postnatal reduce las señales de inflamación en la adultez.

Sin embargo, también observamos efectos de la administración del vehículo en los animales VPA, que dificultan separar el efecto específico de la inflamación inducida por el LPS de los efectos de la manipulación y exposición a numerosas inyecciones a la hora de extraer conclusiones. Esto resulta importante para tener en cuenta al momento de diseñar futuros experimentos intentando minimizar estas variables, ya que los animales VPA parecen ser más susceptibles a desarrollar alteraciones debidas a los distintos procedimientos experimentales.

6

Mecanismo de acción del VPA

6. Mecanismo de acción del VPA

A pesar de que en nuestro modelo de estudio la administración de VPA es un evento único durante el período gestacional, hemos demostrado que sus efectos pueden ser detectados a lo largo del desarrollo postnatal, y permanecen hasta la adultez. Además, resulta interesante que por más que el VPA no es un estímulo inflamatorio en sí mismo, provoca alteraciones inflamatorias centrales y periféricas. Cabe preguntarnos entonces, cómo el VPA genera las alteraciones inmunológicas, y además cómo éstas son mantenidas en el tiempo. El objetivo de esta sección es elucidar los procesos moleculares que subyacen las alteraciones observadas en el modelo VPA.

Dado que, entre otros efectos, VPA funciona como un inhibidor de la actividad deacetilasa de histonas (HDAC) (Gottlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001; Mitchell et al., 2005), los mecanismos epigenéticos son candidatos a encontrarse mediando la acción del VPA. Ha sido demostrado que la administración de VPA produce un aumento transiente en los niveles de acetilación de histonas en el cerebro de los embriones (Kataoka et al., 2011), y a su vez, se ha observado que la exposición prenatal a otro inhibidor de HDAC provoca disminución en la sociabilidad y USVs, y la aparición de comportamientos repetitivos en ratones, al mismo tiempo que incrementa la acetilación en las histonas H3 y H4 en el tejido embrionario (Randal et al., 2013). Estas evidencias sugieren que la ola de hiperacetilación inducida por la administración prenatal de VPA juega un rol clave en la generación del fenotipo en este modelo animal.

Previamente hemos hipotetizado la existencia de un período crítico durante el desarrollo postnatal en el que maduran y se consolidan los sistemas neurales responsables de los síntomas relacionados con el autismo. Cambios y alteraciones durante este período podrían tener consecuencias a largo plazo, generando el fenotipo que observamos en la adultez. Teniendo esto en cuenta, decidimos estudiar la existencia de cambios epigenéticos durante el período postnatal.

6.1 Acetilación de histonas

Dado que VPA es inhibidor de la deacetilasa de histonas (HDAC), decidimos comenzar el estudio epigenético analizando los niveles de acetilación de la histona H3 a través de Western Blot. Decidimos utilizar el sistema de detección infrarroja Odissey, ya que éste es capaz de medir dos señales distintas en una misma membrana, lo que nos permitió determinar la relación entre los niveles de histona H3 acetilada e histona H3 total en una misma calle.

Para testear la sensibilidad del sistema de detección y poner a punto la técnica decidimos utilizar un control positivo. Un estudio de Kataoka et al. muestra que luego de la administración de VPA a GD12.5 se produce un aumento transiente de los niveles de acetilación en las histonas H3 y H4 en el cerebro de los embriones. Esta hiperacetilación puede hallarse a las 2 y 6 hs posteriores a la inyección (Kataoka et al., 2013).

Se administró una inyección intraperitoneal de solución salina o VPA a ratones adultos y 2 hs después se extrajeron hipocampo y cerebelo. Como puede observarse en la Figura 6.1, tanto en el hipocampo ($F_{(1, 4)} = 11.39$; $p = 0.028$) como en el cerebelo ($F_{(1, 4)} = 26.82$; $p = 0.007$), la inyección de VPA provocó un aumento en los niveles de acetilación de la histona H3 2 hs post inyección.

6.2 Acetilación durante el período postnatal

Como se ha explicado anteriormente, nos propusimos caracterizar los niveles de acetilación durante el período postnatal en ratones hembras, tanto en hipocampo como en cerebelo, dos regiones donde hemos observado alteraciones gliales en dicho período.

Al analizar el hipocampo, no observamos efecto del tratamiento prenatal con VPA, ya que ambos grupos muestran niveles similares de acetilación en la histona H3 desde P7 a P42 (Figura 6.2 A). Sin embargo, al estudiar el cerebelo, encontramos que los ratones VPA presentan menores niveles de acetilación que los ratones Sal a P14 ($F_{(1, 7)} = 10.55$; $p = 0.014$) (Figura 6.2 B).

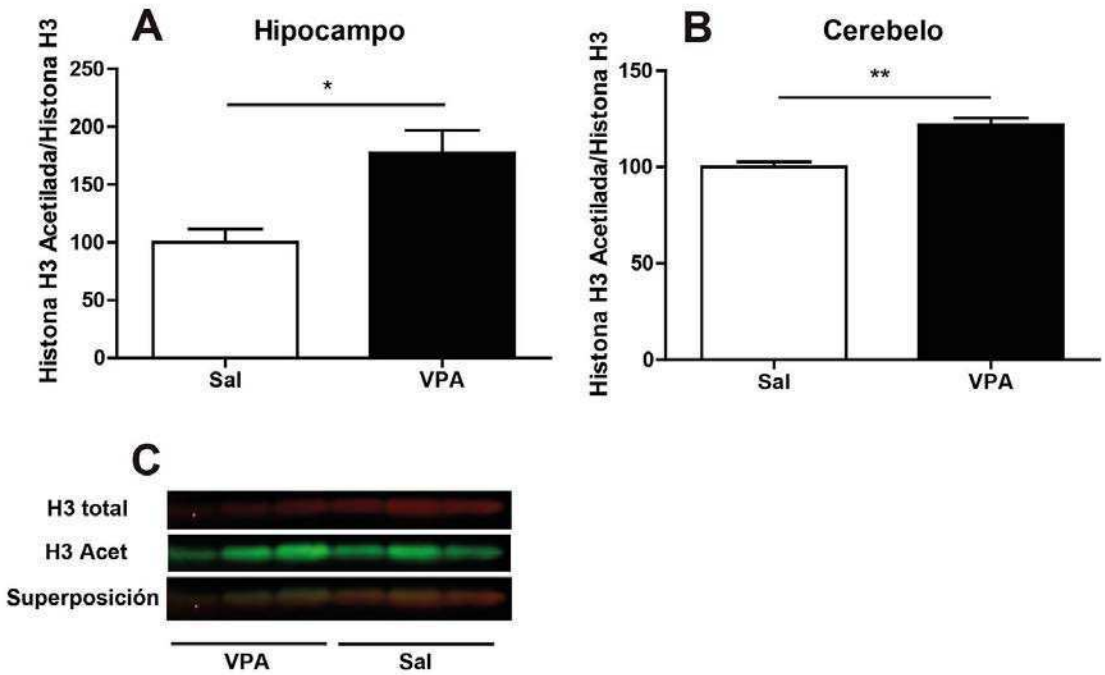

Figura 6.1 - Efecto de la administración de VPA durante la adultez en los niveles de acetilación de histona H3 en hipocampo y cerebelo. Se observó una hiperacetilación 2 hs después de la administración de VPA en el hipocampo (A) y cerebelo (B). Se muestran fotografías de las membranas reveladas obtenidas mediante el sistema de detección Odissey del hipocampo (C) y cerebelo (D) para la histona H3 acetilada (canal 700), histona H3 total (canal 800) y la superposición de ambos. N: Sal = 3, VPA = 3. ANOVA de un factor: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Se grafica la media + SEM.

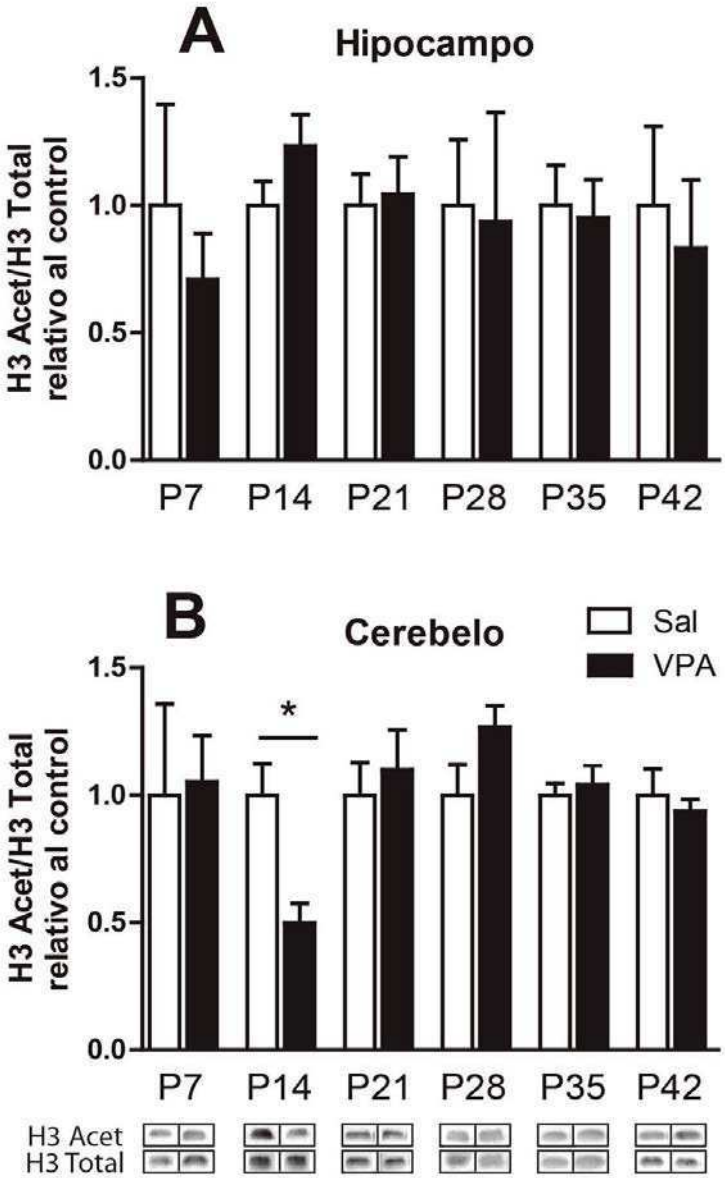

Figura 6.2 - Efecto del tratamiento prenatal con VPA sobre los niveles de acetilación de la histona H3 en hipocampo y cerebelo de animales hembras durante el período postnatal. Los ratones VPA no muestran diferencias en los niveles de acetilación de la histona H3 en el hipocampo a ninguna de las edades evaluadas (A), pero presentan menores niveles de acetilación de histona H3 en el cerebelo a P14 (B). Se muestran resultados representativos de la histona H3 acetilada (H3 Acet, canal 700) e histona H3 total (canal 800) en el cerebelo a las diferentes edades postnatales evaluadas. N: 4-5 por grupo. ANOVA de un factor: * $p < 0.05$. Se grafica la media + SEM.

Esto resulta inesperado dado que VPA es un inhibidor de la deacetilasa de histonas, por lo que esperaríamos un aumento en los niveles de acetilación. La hiperacetilación generada por la inyección prenatal de VPA podría llevar a una posterior hipoacetilación, como un intento del sistema de compensar dicho desequilibrio mediante algún mecanismo homeostático.

6.3 Discusión y conclusiones

A lo largo de esta sección hemos trabajado con el objetivo de desentrañar el mecanismo molecular detrás de los efectos de la administración prenatal de VPA sobre la respuesta inflamatoria central y periférica y los comportamientos relacionados con el autismo. Nuestra hipótesis supone que, dada la actividad inhibitoria de HDAC del VPA, un mecanismo epigenético podría subyacer sus consecuencias a largo plazo.

Hemos observado una disminución en los niveles de acetilación de la histona H3 en el cerebelo de los animales VPA hembras a P14. Un trabajo previo ha mostrado un incremento rápido en la acetilación de histonas en el cerebro de embriones de ratón, 2 y 4 hs después de la administración del VPA (Kataoka et al., 2013). Sin embargo, este mismo grupo mostró que los niveles de acetilación regresan a la normalidad 12 hs luego de la exposición. Nuestros resultados añaden evidencias a estos antecedentes, mostrando que la acetilación de histonas puede ser afectada posteriormente, probablemente debido a alteraciones en el desarrollo, sugiriendo un rol para la actividad HDAC en los cambios observados posteriormente en la vida de los animales.

Dado que las alteraciones en los niveles de acetilación de histonas preceden a las alteraciones neuroinflamatorias observadas en los animales hembra, los cambios en la densidad glial podrían estar siendo guiados por un mecanismo epigenético. Aún más, dadas las características de dichas marcas, este mecanismo podría ser capaz de explicar también el mantenimiento del fenotipo durante toda la vida del animal.

Creemos que estos resultados sientan un precedente interesante para el estudio de las alteraciones epigenéticas en el modelo VPA. Sin embargo, son necesarios más estudios de manera de poder elucidar si efectivamente la disminución en los niveles de acetilación de la histona H3 a P14 es responsable de los cambios en la densidad glial poco después, y así como también de la protección ante los efectos del VPA sobre el comportamiento social en las hembras.

7

Discusión general

7. Discusión general

7.1 Recapitulación de los resultados obtenidos en esta tesis

Con el objetivo general de estudiar el rol de la neuroinflamación en el desarrollo de los comportamientos relacionados con el autismo, analizamos la activación glial y los niveles de sociabilidad en ratones utilizando el modelo de administración prenatal de VPA.

En primer lugar, hallamos que la reducción en la sociabilidad clásicamente observada en los modelos de autismo se encuentra presente en los ratones VPA machos adultos, aunque no en los ratones hembras. Curiosamente, son éstas quienes muestran señales de micro y astrogliosis en el cerebelo, además de una respuesta inflamatoria periférica exacerbada ante un estímulo inflamatorio; los machos no presentan estas anormalidades.

Nuestro siguiente paso fue caracterizar el estado inflamatorio periférico y central durante el período postnatal en los ratones hembras, de manera de hallar la ventana temporal en la que se hacen evidentes las alteraciones. Evidenciamos signos de alteraciones gliales tempranas en cerebelo e hipocampo entre P21 y P35, nuevamente dimórficas, ya que los ratones machos no presentan activación glial a P21.

Con el fin de evaluar el efecto directo de la inflamación postnatal en los niveles de sociabilidad de los animales VPA, administramos un estímulo inflamatorio a lo largo del período crítico. Observamos efectos diferenciales de la inflamación postnatal sobre la interacción social dependiendo del sexo del animal: mientras que las hembras ven reducidos sus niveles de sociabilidad, los machos restauran sus niveles normales, aunque ésto no pareciera ser un efecto específico del LPS. Interesantemente, no encontramos señales de activación glial en el cerebelo de estas hembras, lo que sugiere una correlación inversa entre el aumento de la densidad glial y la reducción en la sociabilidad.

Por último, con el fin de estudiar los mecanismos moleculares de acción del VPA, caracterizamos los niveles de acetilación de histonas en el hipocampo y el cerebelo a lo largo del período postnatal. De esta manera evidenciamos una disminución en la acetilación de histonas en el cerebelo de animales a P14. Dado que este fenómeno precede al período postnatal crítico en el que se evidencian las señales de neuroinflamación, sugerimos que éstas podrían estar siendo guiadas por un mecanismo epigenético.

Los experimentos realizados en esta tesis han sido diseñados de manera de estudiar efectos sexo-específicos fisiológicos y conductuales en el modelo VPA. Hemos hallado la presencia de dimorfismos sexuales en la sociabilidad y el estado inflamatorio central y periférico de los animales, durante el período postnatal y en la adultez. También encontramos efectos diferenciales de la inflamación postnatal sobre el comportamiento social. Dentro de nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se ha realizado una caracterización del estado inflamatorio y su correlación con los cambios en la conducta en el modelo VPA, en ratones de ambos sexos. En las siguientes secciones discutiremos las implicancias de estos resultados.

7.2 ¿Por qué estudiar hembras?

La baja representación de los sujetos femeninos es una problemática presente tanto en la investigación realizada en humanos como en la investigación básica en modelos animales. Sin embargo, recién desde finales del año 2015 el National Institute of Health (NIH) ha requerido que los proyectos presentados para su financiamiento incluyan planes para utilizar animales de ambos sexos o de lo contrario justifiquen por qué es necesario trabajar específicamente con uno solo. Políticas similares han sido adoptadas por distintos organismos europeos de financiamiento.

Varios trabajos han encontrado un fuerte sesgo sexual en los estudios de distintas disciplinas (Berkley, 1992; Blanchard et al., 1995; Sechzer et al., 1994), dirigidos hacia animales macho. En un trabajo de Beery y Zucker (2011) se realizó un

análisis sobre distintos campos y encontraron un sesgo masculino en el 80% de las disciplinas, incluyendo neurociencia, fisiología, farmacología, endocrinología y comportamiento. Curiosamente, el mayor sesgo en la relación entre artículos reportando análisis sólo en machos o sólo en hembras se encuentra en neurociencia (5.5:1).

Este fenómeno resulta insólito a la luz de que las diferencias sexuales en la prevalencia de distintas enfermedades son comunes, y aún más sabiendo que algunos desórdenes afectan en mayor medida a las mujeres, como por ejemplo enfermedades inmunes, autoinmunes y neurológicas, como ansiedad y depresión (Gaillard y Spinedi, 1998; Bekker et al., 2007). Además, el dimorfismo sexual ha sido documentado en los niveles de transcripción de más de 23000 genes activos en ratones, con un 14% de genes relacionados con el SNC (Yang et al, 2006; Isensee et al., 2007).

Esta tendencia está basada principalmente en la creencia de que existen dificultades provenientes de evaluar animales que se encuentran en distintas fases de su ciclo estral, especialmente en los análisis comportamentales. Sin embargo, en un meta-análisis de 40 cepas de ratones endocriados, involucrando más de 8000 animales evaluados sin tener en cuenta el momento del ciclo estral, Mogil y Chanda (2005) concluyeron que no existen razones para asumir que los ratones hembras presentan respuestas más variables que los machos; por lo que los animales hembras pueden ser estudiados sin considerar el ciclo estral sin un incremento sustancial de la variabilidad de los resultados (Mogil y Chanda, 2005; Meziane et al., 2007). Estos mismos resultados fueron obtenidos en un meta-análisis de 293 artículos de neurociencias, donde se evaluó la variabilidad en características morfológicas, fisiológicas, comportamentales y moleculares en animales machos y en hembras analizadas sin tener en cuenta el momento de su ciclo estral (Prendergast et al., 2014).

Los TEA no escapan a esta problemática, donde la mayor parte de la investigación en modelos animales ha sido realizada en machos. Este sesgo es usualmente justificado por la mayor incidencia de TEA en niños que en niñas, con una relación de entre 3 y 4 a 1 (Kim et al., 2011; Zablotsky et al., 2015). No obstante, consideramos que estudiar sujetos femeninos en la investigación básica en modelos

animales puede, por un lado, ayudar en la comprensión de la particularidad de los síntomas observados en las niñas con autismo, y por el otro, otorgar evidencias sobre posibles mecanismos de resiliencia en la población femenina.

Los resultados de esta tesis se han enfocado particularmente en subrayar las diferencias fisiológicas y conductuales ocasionadas en ambos sexos por el mismo estímulo, la exposición prenatal al VPA. Aunque existen algunos estudios que han reportado distintos efectos de VPA en hembras (Kim et al., 2013; Schneider et al., 2008; Hara et al., 2012; Perez-Pouchoulen et al., 2016; Mowery et al., 2015), los trabajos suelen estar centrados en el estudio de los machos.

De acuerdo a nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se ha realizado una caracterización del estado inflamatorio central y periférico y su correlación con los cambios en la conducta en el modelo VPA en ratones; poniendo un particular énfasis en el estudio de los animales hembras.

7.3 Alteraciones sexo-específicas

Como hemos mencionado previamente, los TEA son diagnosticados con una prevalencia mucho mayor en varones que en mujeres (Kim et al., 2011; Zablotsky et al., 2015); por lo que la mayor parte de la investigación en modelos animales es realizada en machos. Sin embargo, recientemente han aparecido estudios comparativos que demuestran que el cerebro de niños y niñas es afectado diferencialmente por los TEA. De esta manera se hipotetizó que diferencias neuroanatómicas sexo-específicas naturales existentes entre ambos sexos podría llevar a la expresión dimórfica del desorden (Beacher et al., 2012; Chou et al., 2011; Gillies et al., 2014; Lombardo et al., 2012).

En este sentido, han sido reportadas diferencias sexo-específicas en humanos con TEA (Lombardo et al., 2012; Chura et al., 2010; Knickmeyer y Baron-Cohen, 2006; Verma et al., 2013; Beacher et al., 2012), así como en el modelo VPA (Kim et al., 2013; Schneider et al., 2008; Hara et al., 2012; Perez-Pouchoulen et al., 2016).

Además, en otros modelos de autismo ha sido observado que aunque la administración prenatal de LPS, ácido propiónico (PPA) y PolyI:C provoca efectos similares en ambos sexos para ciertos comportamientos (Foley et al., 2014; Howland et al., 2012), también genera efectos sexo-específicos para otros (Foley et al., 2015; Foley et al., 2014).

Junto con el análisis de las alteraciones comportamentales tempranas realizadas durante mi tesis de licenciatura y el estudio de las células de Purkinje realizado por otro miembro del laboratorio, la Lic. Cecilia Zappala (Kazlauskas et al., 2016); nuestra caracterización en esta tesis de la respuesta inflamatoria periférica, estado de activación glial y niveles de acetilación de histonas, contribuye a lograr una caracterización exhaustiva del período postnatal en hembras expuestas prenatalmente a VPA. Esto complementa resultados previos de otros grupos en ratones VPA machos (Schneider y Przewlocki, 2005; Schneider et al., 2006), y nos permite realizar un análisis comparativo que facilite la comprensión de los mecanismos de acción del VPA en la generación de los fenotipos en ambos sexos.

Brevemente, el comportamiento postnatal es afectado de manera similar en las crías VPA de ambos sexos (resultados no publicados hallados durante mi tesis de licenciatura; y Wagner et al., 2006), aunque no así la activación glial a P21 y en la adultez, la respuesta inflamatoria periférica y el comportamiento social en ratones adultos. La diferencia entonces en la densidad glial postnatal podría subyacer las diferencias comportamentales en la adultez, cuando la reducción en la sociabilidad es observada en animales machos (Kim et al., 2013; Lucchina y Depino, 2013; Schneider et al., 2008), pero no así en hembras (Kataoka et al., 2013; Kim et al., 2013; Schneider et al., 2008).

Además de las diferencias entre sexos en el comportamiento social observadas en este modelo, existen también reportes de otras alteraciones sexo-específicas en el mismo. En un estudio de Hara et al. (2012) se encontraron anormalidades comportamentales y pérdida de células Nissl-positivas en las cortezas prefrontal y somatosensorial en ratones machos. En cambio, las hembras sólo presentan pérdida celular en la corteza prefrontal, no así en la corteza somatosensorial, ni tampoco alteraciones comportamentales.

Utilizando el modelo de VPA en ratas, fueron halladas diferencias sexuales en el desarrollo postsináptico. Se encontraron anormalidades específicas para los machos en el perfil de expresión de proteínas sinápticas excitatorias glutamatérgicas, ligadas a las vías de señalización de receptores NMDA, AMPA y mGluR5 en la corteza prefrontal, durante las primeras 4 semanas de vida. Los ratones machos también mostraron una disminución en la expresión de la proteína MeCP2 en la corteza prefrontal, que explicaría el desarrollo anormal de las sinapsis glutamatérgicas (Kim et al., 2014). En otro estudio realizado en ratas, encontraron que la administración de VPA interrumpe la ontogenia del receptor de andrógenos en el cerebelo, dependiendo del sexo, la edad y la región cerebelar. Además de estos efectos, VPA genera alteraciones morfológicas independientes del sexo, aunque éstas son más pronunciadas en los machos (Perez-Pouchoulen et al., 2016).

También en ratas, Schneider et al. (2008) hallaron alteraciones endocrinas y comportamentales en animales VPA machos pero no en hembras. Curiosamente, también observaron alteraciones inmunológicas periféricas sólo en machos: menor peso del timo, esplenocitos con respuesta proliferativa disminuida ante un estímulo, y una mayor producción de óxido nítrico (NO) por parte de macrófagos peritoneales, tanto a niveles basales como ante la estimulación mediante LPS; aunque la disminución en la relación IFN-gamma/IL-10 fue común para ambos sexos.

Todos estos resultados apoyan la hipótesis que asegura que la expresión dimórfica de los comportamientos relacionados con el autismo es generada por efectos diferenciales del VPA en el desarrollo postnatal. Sin embargo, no permiten discernir entre dos posibles escenarios. Por un lado, el efecto de la exposición prenatal a VPA podría ser sexo-específico, generando consecuencias disímiles en ambos sexos; pero por otro lado, la acción del VPA podría ser la misma en ambos sexos, pero sus efectos exacerbados o compensados por dimorfismos sexuales naturales presentes en los animales.

7.4 Susceptibilidad masculina VS resiliencia femenina

De manera de intentar explicar el sesgo sexual en la incidencia de los TEA, surgen dos posibles líneas de razonamiento. Por un lado, algunos de los factores de riesgo para el desarrollo del autismo podrían afectar sólo a la población masculina. Sin embargo, por más que existen ejemplos de factores genéticos específicamente masculinos, su contribución es incapaz de explicar la gran diferencia en la incidencia del desorden en ambos sexos. Por otro lado, los factores de riesgo podrían afectar a ambos sexos por igual, pero la población femenina se encontraría de alguna manera protegida contra ellos.

En los últimos años ha sido acumulada numerosa evidencia genómica en favor de esta última teoría. Se ha hallado una mayor carga mutacional en la población femenina, por ejemplo, tanto en la forma de un exceso de mutaciones *de novo* en niñas afectadas por autismo en comparación con niños, así como mayores disrupciones genómicas (Jacquemont et al., 2014). Esto ha sido observado para variaciones en el número de copias, mutaciones con pérdida de función y pérdida de sentido (Iossifov et al., 2014; Sanders et al., 2015; Sanders et al., 2011). De esta manera, las hembras se encontrarían protegidas contra el desorden, ya que se requiere una mayor carga mutacional, o una mayor cantidad de mutaciones severas para desencadenar el desorden en mujeres que las que son necesarias en los hombres.

Sin embargo, una estrategia alternativa para explicar este fenómeno es enfocarse en las características naturalmente dimórficas entre sexos. Varios estudios sugieren que durante el desarrollo, los roedores machos y hembras responden de manera distinta a la exposición de sustancias tóxicas y teratogénicas, provocando tanto comportamientos (Vorhees, 1987; Roegge et al., 2000; Geller et al., 2001) como funciones inmunes discrepantes (Weinberg y Jerrells, 1991; Bunn et al., 2001). De esta manera, podemos pensar que los efectos que el VPA produce sobre ambos sexos son diferentes porque se encuentra actuando sobre sustratos cerebrales que difieren entre sí.

Existen gran variedad de diferencias entre sexos en la estructura y funcionamiento del cerebro, particularmente en regiones ligadas a la sociabilidad y cognición. De manera temprana en la embriogénesis, la composición cromosómica del embrión determina la composición hormonal del ambiente prenatal. En la mayor parte de los mamíferos, incluidos los ratones, la diferenciación sexual del cerebro se encuentra principalmente bajo el control de las hormonas sexuales esteroideas. Estas controlan los eventos de diferenciación que proveen los correlatos celulares y sustratos neurales de los dimorfismos sexuales observados en ciertos comportamientos (revisado en Wu y Shah, 2011).

En las siguientes secciones revisaremos ciertos dimorfismos sexuales de particular interés para los resultados de esta tesis.

7.4.1 Dimorfismo sexual: eje HPA

Cualquier tipo de estrés, ya sea físico, emocional o inmunológico, puede resultar en la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), produciendo la liberación de glucocorticoides. Por este motivo, los niveles en plasma de cortisol en humanos y corticosterona en roedores, son una medida importante de la reactividad biológica al estrés.

Han sido halladas evidencias de que la reactividad del eje HPA difiere entre animales machos y hembras. En condiciones de reposo, ratas hembras secretan mayores concentraciones de corticosterona que los machos (Carey et al., 1995; Critchlow et al., 1963; Figueiredo et al., 2002), y además sus ritmos circadianos contienen más y mayores pulsos de esta hormona (Seale et al., 2004). Como respuesta al estrés, los niveles de corticosterona en hembras no sólo son mayores que en machos, sino que además estos permanecen elevados por más tiempo (Figueiredo et al., 2002; Pollard et al., 1975; Le Mevel et al., 1979). También existen diferencias en la capacidad de unión y afinidad de los receptores de corticosterona en el hipocampo (Turner y Weaver, 1985), y en los niveles de receptores de glucocorticoides en la

glándula pituitaria (Turner, 1990).

Estas diferencias sexo-específicas en la respuesta del eje se deben a influencias de los esteroides sexuales, ya que los estrógenos promueven la producción de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) (Vamvakopoulos y Chrousos, 1993) y los andrógenos la inhiben (Bingaman et al., 1994), afectando los niveles de corticosterona en plasma. En la misma línea, este patrón de respuesta sexo-específico se encuentra ausente en animales sexualmente inmaduros, y sólo surge cuando éstos han alcanzado la pubertad (Romeo 2003; Romeo et al., 2006).

Durante las primeras dos semanas de vida los ratones muestran una hiporrespuesta al estrés, un conocido fenómeno que no se encuentra relacionado con la testosterona (Levine, 2001). Luego, a P30, la etapa previa a la pubertad, los niveles de testosterona son bajos y se produce la máxima respuesta. A partir de P45 los ratones machos ya han atravesado la pubertad y los niveles de testosterona son los correspondientes a la etapa adulta, momento en el cual la respuesta de liberación de corticosterona disminuye. Sin embargo, a P45 las hembras muestran una mayor respuesta que los machos (revisado en Gaillard y Spinedi, 1998). De esta manera, la respuesta del eje HPA es influenciada por el sexo, el nivel de madurez sexual y los esteroides sexuales circulantes.

En esta tesis hemos estudiado la respuesta del eje HPA ante un estímulo inflamatorio de LPS en machos y hembras a lo largo del período postnatal y en la adultez, obteniendo resultados que concuerdan con lo reportado en la bibliografía. A lo largo del período postnatal, entre P7 y P42, tanto las hembras Sal como las VPA presentan una respuesta normal de liberación de corticosterona ante la inyección de LPS. Esto mismo ocurre con los machos a P21, donde no se observan diferencias con hembras de la misma edad.

Sin embargo, ante el mismo estímulo de LPS las hembras VPA adultas responden con niveles de corticosterona más elevados que las hembras Sal, fenómeno que no se observa en los machos adultos. Una posibilidad es que los efectos del VPA actúen sobre el dimorfismo sexual natural presente en la respuesta del eje HPA, dado que las hembras adultas muestran una mayor respuesta del eje que los machos. De esta manera, la administración del VPA estaría acentuando diferencias

normales entre los sexos, provocando la exacerbación de la respuesta periférica ante un estímulo inflamatorio únicamente en las hembras.

7.4.2 Dimorfismo sexual: respuesta inmune periférica

Como hemos mencionado previamente, las mujeres presentan una mayor incidencia de ciertas enfermedades autoinmunes, fenómeno que se repite también en la investigación con modelos animales. Los esteroides sexuales poseen importantes roles en la regulación del sistema inmune (revisado en Chrousos, 2010; Muñoz-Cruz et al., 2011; Pittman, 2011). En líneas generales, puede decirse que los estrógenos magnifican la respuesta inmune (Grossman, 1994; Foo et al., 2016) y los andrógenos la inhiben (Spinedi et al., Foo et al., 2016).

Dado que estos esteroides afectan los procesos inmunes en direcciones opuestas, se considera que son los responsables del dimorfismo sexual inmunológico, generando respuestas inmunes más pronunciadas en hembras que en machos. En comparación con los machos, las hembras presentan mayores niveles de anticuerpos y células T CD4+ circulantes y una mayor producción de citoquinas en respuesta a infecciones (Tan et al., 2015). Además, generalmente presentan una respuesta inmune humoral y celular más vigorosa, lo que conlleva a una menor tasa de infecciones microbianas (Nalbandian y Kovats, 2005). En los últimos años han sido halladas diferencias sexo-específicas en macrófagos (Mantovani et al., 2005), mastocitos (Lindsberg et al., 2010; Strbian et al., 2006), células dendríticas, células T (Felger et al., 2010; Wan, 2010) y células NK (Yilmaz y Granger, 2010).

Estas diferencias en las células de la inmunidad innata y adaptativa podrían significar también diferencias en la expresión de citoquinas. Como se ha desarrollado en la sección 1.5, la respuesta inmune central y la periférica se hallan íntimamente relacionadas a través de estas moléculas. Aunque en esta tesis no hemos analizado ninguno de estos parámetros de la respuesta inflamatoria periférica, estas evidencias resultan valiosas a la hora de analizar el resto de los resultados.

Las citoquinas liberadas por las células de la respuesta inmune innata y adaptativa en la periferia pueden ingresar en el cerebro a través de regiones permeables en la BHE (Konsman et al., 2002). Además, presentan la capacidad de estimular al nervio vago (Johnston y Webster, 2009) e inducir la expresión de citoquinas en las células endoteliales, que pueden ser liberadas luego al parénquima cerebral (Kerschensteiner et al., 2009). De esta manera, las citoquinas pueden iniciar modificaciones en el SNC que posteriormente darán lugar a respuestas comportamentales.

Considerando además el fenómeno observado con respecto a la activación del eje HPA (sección 7.4.1), donde el VPA parecería estar actuando sobre un dimorfismo sexual natural exacerbando las diferencias, el dimorfismo en la respuesta inflamatoria periférica resulta de interés a la hora de planear futuros experimentos. En particular, sería valioso medir los niveles de citoquinas en plasma y en cerebro, ya que estas moléculas son las candidatas a estar mediando la comunicación entre una respuesta inflamatoria periférica alterada y el estado neuroinflamatorio del SNC, con sus consecuentes efectos sobre el comportamiento.

7.4.3 Dimorfismo sexual: neuroglía en el desarrollo

Las células gliales, en particular la microglía y los astrocitos, son las células inmunes principales dentro del SNC. A lo largo de la sección 1.4.1, hemos mencionado sus roles tanto en los procesos inflamatorios, como en el funcionamiento neuronal y mantenimiento de la homeostasis extracelular, a través de la regulación de la concentración de iones, aminoácidos excitatorios, neurotransmisores y metabolitos (Parpura et al., 2012; Nedergaard et al., 2003; Alvarez-Buylla y Lim, 2004).

Además, a lo largo del desarrollo, las células gliales asisten en numerosos procesos esenciales para la formación del SNC tales como neurogénesis, migración celular, organización cortical, guiado neuroaxonal, sinaptogénesis, podado sináptico (*pruning*) y muerte celular programada (Fields y Stevens-Graham, 2002; Araque y

Navarrete, 2010; Pfrieger, 2010; Sharif y Prevot, 2010; Stipursky et al., 2011). Los astrocitos participan en el control de la conectividad de los circuitos neuronales: la astroglia regula la formación, maduración, mantenimiento y estabilidad de las sinapsis. La mayor parte de la sinaptogénesis ocurre luego del nacimiento y depende significativamente de los astrocitos, ya sea por la liberación de factores o producción de proteínas de la matriz extracelular (Kettenmann y Verkhratsky, 2013; Eroglu y Barres, 2010). Durante el desarrollo temprano, las células microgliales participan en mecanismos de plasticidad sináptica, poseen roles en el remodelado de las espinas dendríticas y eliminación de sinapsis, así como en el *pruning* en el cerebro postnatal (Tremblay et al., 2010; Tremblay y Majewska, 2011; Tremblay et al., 2011)

A pesar de cumplir roles funcionales similares, y estar involucrados en los mismos procesos, los astrocitos y la microglía presentan distintos orígenes embrionarios y ontogenias dentro del cerebro en desarrollo. Las células microgliales se originan de manera temprana en el desarrollo embrionario, los progenitores microgliales surgen de tejido mieloide periférico, de origen mesodérmico, desde donde migran y colonizan el cerebro alrededor de GD9-10 en roedores (Chan et al., 2007; Ginhoux et al., 2010). Inicialmente se localizan alrededor de regiones subcorticales como el hipocampo, y alrededor del cuerpo calloso (Cuadros y Navascués, 1998; Wang et al., 2002), desde donde migran a sus destinos finales donde continúa la proliferación y diferenciación. En cambio, los astrocitos derivan de células progenitoras neurales de origen neuroectodérmico, y se diferencian cerca del final del desarrollo embrionario. Durante la gestación, estos progenitores neurales generan neuronas en primer lugar y astrocitos en segundo, mediante un proceso que requiere encendido y apagado de genes específicos a través de mecanismos epigenéticos (Takizawa et al., 2001.

En este punto es importante destacar que la administración de VPA a GD12.5 se encuentra cercana al momento en que las células microgliales invaden el SNC, migran y se diferencian. Además, dado que éstas influyen posteriormente en la diferenciación de los astrocitos hacia el final del proceso gestacional, cambios epigenéticos inducidos por el efecto inhibidor de la deacetilasa de histonas del VPA, con su consecuente ola de hiperacetilación 2 hs luego de la administración (Kataoka et

al., 2011), podrían estar actuando sobre las células microgliales embrionarias, afectando su migración, morfología y función. Teniendo esto en cuenta, y considerando también el sesgo sexual en la prevalencia de los TEA, es de particular interés que hayan sido encontradas diferencias sexo-específicas en el número y morfología de la glía durante el desarrollo.

La primera evidencia de diferencias sexuales en la morfología astrocítica y su correlación con diferencias en la morfología neuronal fue hallada en el núcleo arcuato de ratas, una región crítica para el control de la secreción de gonadotrofinas. Aquí, machos neonatales presentan menor cantidad de espinas dendríticas que las hembras, así como astrocitos con mayor cantidad de procesos y ramificaciones. Además, esta diferencia depende de los niveles de testosterona neonatal durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro (Mong et al., 1996; Mong et al., 1999). Resultados similares fueron hallados en el área preóptica, una región involucrada en la expresión del comportamiento sexual masculino en la adultez, donde la morfología neuronal también es dependiente de la morfología de los astrocitos y de la síntesis de protaglandina E2. Los machos poseen más espinas dendríticas que las hembras, diferencia que se establece a través de la acción del estradiol durante el período crítico de diferenciación sexual y se mantiene hasta la adultez (Amateau y McCarthy, 2002).

En un trabajo realizado en ratas ha sido demostrado que varias regiones involucradas en procesos cognitivos, incluyendo la corteza parietal, el hipocampo y la amígdala, presentan una diferencia sexo-específica, que varía a lo largo del desarrollo. En las primeras etapas del desarrollo postnatal, alrededor de P4, los machos presentan una mayor cantidad de células microgliales redondeadas y con procesos gruesos que las hembras en la corteza parietal, CA1, CA3, giro dentado y amígdala. En etapas más avanzadas del desarrollo, a P30, y también en la adultez, a P60, esta tendencia cambia y son las hembras quienes exhiben un fenotipo activado en mayor medida que los machos, en estas mismas regiones (Schwarz et al., 2012). Dado que a GD17, etapa previa al comienzo de producción de hormonas sexuales, no se observan diferencias entre ambos sexos, y dado que las células microgliales expresan receptores para hormonas sexuales (Milner et al., 2005) y enzimas de conversión de

esteroides (Gottfried-Blackmore et al., 2008; Gottfried-Blackmore et al., 2010), es probable que las diferencias en la colonización microglial durante el desarrollo se encuentren guiadas por la exposición diferencial a hormonas sexuales. El estrógeno es importante en las respuestas basales y pro-inflamatorias de las células microgliales adultas, en tanto que la testosterona inhibe la activación glial (Barreto et al., 2007; Habib y Beyer, 2015; Sierra et al., 2008). Un fenómeno similar se observa en el cerebro de ratones, el hipocampo de las hembras presenta más cantidad de células microgliales y astrocitos que el de los machos, diferencia que va consolidándose a lo largo del desarrollo (Mouton, 2002).

Esta diferencia en la cantidad de células microgliales, y su consecuente diferencia en la expresión de moléculas inmunes, podría tener grandes efectos sexo-específicos en el funcionamiento del sistema neuroinmune ante lesiones o desafíos inmunológicos en el período temprano de desarrollo, con consecuencias disímiles a largo plazo. Por ejemplo, ante una infección a P4, ratas machos presentan cambios duraderos en el funcionamiento de la microglía, afectando el aprendizaje y la memoria en la adultez (Bilbo et al., 2005; Bilbo et al., 2008; Williamson et al., 2011), aunque esto no sucede si la infección es a P30 (Bilbo et al., 2006) o en animales hembras (Bilbo et al., 2011). Además, los machos son también más sensibles a otras alteraciones tempranas: exhiben mayor muerte neuronal hipocampal y reactividad astrocitaria que las hembras como consecuencia de un protocolo de separación materna (Llorente et al., 2009) y presentan mayor muerte celular en el hipocampo en un modelo de isquemia neonatal (Hilton et al., 2003; Nunez et al., 2003).

Si consideramos que las hembras adultas presentan mayor cantidad de células microgliales, que además poseen una morfología más activada en comparación a los machos adultos; y teniendo en cuenta la relación cercana existente entre la morfología microglial y su función (revisado en Ransohoff y Perry, 2009), las acciones de la microglía presente en el cerebro femenino podrían tener consecuencias funcionales muy diferentes que aquellas observadas en el cerebro de los machos adultos.

7.5 Posible rol protector de la neuroinflamación

La neuroinflamación es un fenómeno dual, ya que es responsable de efectos tanto dañinos como beneficiosos (Sierra et al., 2013; Benraiss et al., 2016). Sus propiedades funcionales son cruciales en la respuesta inmune, aunque sus consecuencias pueden ser igualmente destructivas para las células neurales sanas. En la mayoría de los casos resulta conveniente para el SNC, ya que tiende a minimizar la lesión y reparar el tejido dañado (Czlonkowska y Kurkowska-Jastrzebska 2011).

Las propiedades fagocíticas y citotóxicas de la microglía activada fueron caracterizadas en el laboratorio de Kreutzberg (Banati et al., 1993; Kreutzberg, 1996). La visión clásica considera que tras una lesión o daño al SNC, las células microgliales sufren transformaciones morfológicas y se convierten en microglía reactiva. Este estado activado, caracterizado por una morfología ameboide y la expresión de factores pro-inflamatorios, es considerado perjudicial para el funcionamiento neuronal, y en caso de persistir en el tiempo puede llevar a neurodegeneración (Perry y Teeling, 2013).

Sin embargo, recientemente, varias analogías entre macrófagos y células microgliales llevaron a postular la hipótesis de la existencia de fenotipos similares en ambos tipos celulares, donde la microglía también podría presentar un estado de activación alternativo beneficioso para la población neuronal.

Tanto los linfocitos Th1 como los Th2 colaboran con los linfocitos B en la expansión clonal y producción de anticuerpos (Smith et al., 2000). La respuesta de los linfocitos Th1 produce factores pro-inflamatorios, IFN-γ y TNF-α, entre otros; mientras que la respuesta de los linfocitos Th2 produce factores antiinflamatorios, principalmente IL-4 e IL-10 (Chhor et al., 2013). Estas respuestas suelen ser asociadas a la polarización en la activación de macrófagos, células fagocíticas que en estado de reposo remueven patógenos y células muertas. Los macrófagos pueden atravesar la vía de activación clásica M1 que correlaciona con la respuesta Th1 y contribuye a la inflamación; aunque también pueden seguir la vía alternativa M2, que correlaciona con la respuesta Th2 (Schebesch et al., 1997).

Dependiendo del patógeno o del estímulo en cuestión, las células microgliales pueden ser clasificadas dentro de dos fenotipos principales, según sus funciones efectoras. El fenotipo de polarización M1 es estimulado por LPS, IFN-γ e hipoxia; y produce especies reactivas de oxígeno (ROS), proteasas y citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β e IL-18 a través de la activación del inflamasoma (Habib et al., 2014; Fumagalli et al., 2015; Orihuela et al., 2015). El fenotipo de activación alternativo, denominado M2, fue originalmente descrito tras la exposición a la citoquina IL-4 de la respuesta Th2 (Veremeyko et al., 2013; Zanier et al., 2014); sus propiedades antiinflamatorias son mediadas por la producción de IL-4 e IL-13, y la sobreexpresión de factores neurotróficos que promueven el remodelamiento y reparación de tejidos y angiogénesis (Starossom et al., 2012; Chen y Trapp, 2015). La polarización en la respuesta tanto de macrófagos como de células microgliales no sólo se encuentra modulada por las respuestas Th1 y Th2, sino que también pueden ser inducidas por la interacción con otros tipos celulares como las células NK (Lapaque et al., 2009).

El descubrimiento de los distintos subtipos de macrófagos y microglias ha sido acompañado con la identificación de varios marcadores fenotípicos para detectar el estado activado clásico y alternativo, entre los que se encuentran citoquinas, quimioquinas, proteínas receptoras de superficie y numerosas proteínas involucradas en las funciones y adquisición de los distintos fenotipos (revisado en Franco y Fernández-Suárez, 2015). Esta expresión diferencial de genes es la responsable de los efectos pro y antiinflamatorios de los fenotipos M1 y M2.

Más allá de que estas categorías resultan las más comunes para representar la polarización microglial, se propone la existencia de varios subtipos fenotípicos, cuya acción produciría un efecto neto perjudicial o protector (Belarbi y Rosi, 2013). En un trabajo de Chhor et al. (2013) se postula que las células M1 son citotóxicas y exhiben marcadores proinflamatorios; las células M2a contribuyen a la reparación y regeneración a través de la expresión de moléculas antiinflamatorias e inmunoreguladoras; y las células M2b/c constituyen el fenotipo desactivante y expresan también marcadores antiinflamatorios.

En el análisis de densidad microglial realizado en esta tesis utilizamos la clasificación de Kreutzberg (1996) de estadios de activación (ver sección 2.5.3).

Teniendo en cuenta sólo la morfología celular podemos realizar una correspondencia entre microglía en reposo, o tipo I, con el fenotipo M0, M2a y M2c: cuerpo celular pequeño, procesos largos y ramificados. La microglía en estado de activación II-III de Kreutzberg resulta similar al fenotipo M2b, con un cuerpo celular más voluminoso y la presencia de menor cantidad de procesos, más cortos y menos ramificados. Por último, la microglía en estadio IV podría corresponderse con un fenotipo de activación M1, caracterizado por la presencia de un cuerpo celular ameboide y procesos muy pequeños o ausentes.

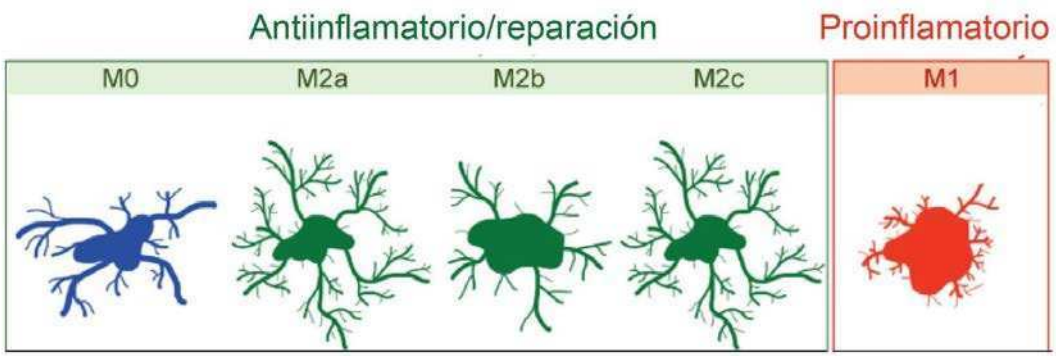

Figura 7.1 - Estados de activación de las células microgliales. Se esquematizan los fenotipos de activación clásico (M1) y alternativo (M2). El fenotipo en reposo (M0) puede ser incluido dentro del grupo M2 como un fenotipo protector atenuado (Adaptado de De Franco and Fernández-Suárez, 2015).

Este último tipo celular se encontró prácticamente ausente en el cerebro de los animales estudiados. Tanto en el desarrollo postnatal como en la adultez, en las regiones analizadas en ambos sexos casi no se observaron células microgliales en estadio IV. La gran mayoría de las células microgliales cuantificadas resultaron ser las tipo I, con una mucho menor presencia de células tipo II-III, con diferencias de un orden de magnitud dependiendo de la región cerebral en cuestión.

La ausencia entonces de células microgliales tipo IV o M1, sumada al hecho de que no se observa en el tejido cerebral otras señales de neuroinflamación severa o neurodegeneración como las que suelen estar presentes en modelos de isquemia, lesión cerebral traumática o enfermedades neurodegenerativas crónicas (revisado en Perry y Teeling, 2013), nos lleva a pensar que las células microgliales presentes en el cerebro VPA se corresponden a un fenotipo de activación M2.

De esta manera, la mayor presencia de estas células en los cerebros VPA femeninos podría estar ejerciendo un rol protector, manteniendo la homeostasis extracelular y el funcionamiento neuronal, evitando la aparición del fenotipo de sociabilidad reducida en las hembras. El mecanismo mediante el cual el fenotipo de activación microglial estaría afectando el comportamiento social es aún desconocido. Estas células podrían estar actuando de manera indirecta, a través de la producción de citoquinas y quimioquinas, o de manera directa sobre los circuitos neuronales, a través de sus funciones de mantenimiento de la plasticidad sináptica tales como el remodelado de las espinas dendríticas y la eliminación de sinapsis.

El concepto de fenotipos de activación microgliales múltiples es relativamente nuevo, por lo que las evidencias sobre sus funciones particulares y los procesos en los que participan es aún escasa (Cherry et al., 2014). A pesar de esto, creemos que es suficiente para plantear una hipótesis interesante, dando lugar a futuros experimentos a realizar en el laboratorio. Como puntapié inicial en la caracterización del fenotipo microglial específico en las hembras VPA podría realizarse un análisis más detallado de la morfología celular, así como de la expresión de marcadores específicos de polarización fenotípica y expresión de citoquinas y quimioquinas. Con esta información podrían diseñarse experimentos de manipulación de factores polarizadores de manera de evaluar hipótesis específicas.

7.6 Modelo propuesto

Basándonos en las evidencias presentadas a lo largo de esta sección, creemos que el VPA produce efectos diferenciales en el comportamiento y respuesta inflamatoria de machos y hembras debido a que se encuentra actuando sobre sustratos disímiles. Los dimorfismos sexuales presentes de manera natural en los animales generan reacciones distintas ante un mismo estímulo durante el desarrollo prenatal, provocando consecuencias dispares a largo plazo.

Proponemos que los efectos epigenéticos tempranos del VPA alteran el normal desarrollo de los progenitores microgliales. La ola de hiperacetilación posterior a la administración de VPA (Kataoka et al., 2011) podría generar una disrupción en la migración y colonización del SNC, afectando también su morfología y función. Debido al importante rol que cumple la microglía durante el desarrollo del cerebro, esto podría afectar su correcto desarrollo.

Estos efectos podrían ser sexo-específicos debido al dimorfismo sexual en la colonización microglial del cerebro durante el desarrollo (Schwarz et al., 2012), y perdurar a través de mecanismos epigenéticos a lo largo del período postnatal e incluso la adultez, ambas etapas en donde hemos observado una mayor densidad glial en hembras VPA y no así en machos. En la adultez, estas diferencias podrían ser exacerbadas por acción de las hormonas esteroideas sexuales, ya que en líneas generales los estrógenos fomentan la activación glial mientras que la testosterona la inhibe (Barreto et al., 2007; Habib y Beyer, 2015; Sierra et al., 2008).

Hipotetizamos también que esta diferencia en los niveles de densidad glial es la responsable de los efectos dimórficos en el comportamiento social. La microglía en el cerebro de las hembras VPA presenta indicios de encontrarse polarizada hacia un fenotipo de activación M2, ejerciendo efectos protectores sobre los circuitos neurales, manteniendo la correcta homeostasis y evitando así las alteraciones en los niveles de sociabilidad observadas en los machos VPA. Esto se ve apoyado por el hecho de que

hembras VPA expuestas a inflamación postnatal durante un período crítico del desarrollo no presentan mayor densidad glial en la adultez, pero sí exhiben un fenotipo de sociabilidad reducida al igual que los machos.

Aunque hemos encontrado evidencias que sugieren que las alteraciones gliales postnatales podrían verse guiadas por un mecanismo epigenético actuando a través de los niveles de acetilación de histonas; el hallazgo del mecanismo específico mediante el cual un estímulo prenatal afecta los niveles de neuroinflamación y sociabilidad en la adultez escapa al alcance de esta tesis. Sin embargo, consideramos que se han sentado importantes bases para el estudio de posibles mecanismos de resiliencia a los TEA en la población femenina.

8

Bibliografía

8. Bibliografía

Abrahams, Brett S., and Daniel H. Geschwind. "Advances in Autism Genetics: On the Threshold of a New Neurobiology." *Nature Reviews Genetics* 9, no. 6 (06 2008): 493. doi:10.1038/nrg2380.

Adams, James James, Stuart Freedenfeld, Tapan Audhya, and Kim Hamada. "Biochemical Effects of Ribose and NADH Therapy in Children with Autism." *Autism Insights*, 07 2011, 3. doi:10.4137/aui.s6947.

Alvarez-Buylla, Arturo, and Daniel A. Lim. "For the Long Run." *Neuron* 41, no. 5 (03 2004): 683-86. doi:10.1016/s0896-6273(04)00111-4.

Amateau, S. K., and M. M. Mccarthy. "Sexual Differentiation of Astrocyte Morphology in the Developing Rat Preoptic Area." *Journal of Neuroendocrinology* 14, no. 11 (11, 2002): 904-10. doi:10.1046/j.1365-2826.2002.00858.x.

Amir, RE., Van den Veyver, IB., Wan, M., Tran, CQ., Francke, U., Zoghbi, HY. “Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2”. *Nature Genetics.* (1999): 185-8. doi: 10.1038/13810

Amodeo, Dionisio A., Joshua H. Jones, John A. Sweeney, and Michael E. Ragozzino. "Differences in BTBR T Tf/J and C57BL/6J Mice on Probabilistic Reversal Learning and Stereotyped Behaviors." *Behavioural Brain Research* 227, no. 1 (02 2012): 64-72. doi:10.1016/j.bbr.2011.10.032.

Araque, A., and M. Navarrete. "Glial Cells in Neuronal Network Function." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, no. 1551 (07, 2010): 2375-381. doi:10.1098/rstb.2009.0313.

Ashwood, Paul, Amanda Enstrom, and Judy Water. "Autism, Gastrointestinal Disturbance, and Immune Dysfunction." *Autism*, 10, 2009, 277-98. doi:10.1201/9781420068870-c14.

Ashwood, Paul, Blythe A. Corbett, Aaron Kantor, Howard Schulman, Judy Van De Water, and David G. Amaral. "In Search of Cellular Immunophenotypes in the Blood of Children with Autism." *PLoS ONE* 6, no. 5 (05, 2011). doi:10.1371/journal.pone.0019299.

Atladottir, H. O., T. B. Henriksen, M. B. Lauritsen, D. E. Schendel, and E. T. Parner. "151 Neonatal Complications and Autism Spectrum Disorders." *Pediatric Research* 68 (11 2010): 79-80. doi:10.1203/00006450-201011001-00151.

Bailey, A., A. Le Couteur, I. Gottesman, P. Bolton, E. Simonoff, E. Yuzda, and M. Rutter. "Autism as a Strongly Genetic Disorder: Evidence from a British Twin Study." *Psychological Medicine* 25, no. 01 (01 1995): 63. doi:10.1017/s0033291700028099.

Balemans, Monique C.m., Manon M.h. Huibers, Nathalie W.d. Eikelenboom, Arthur J. Kuipers, Rik C.j. Van Summeren, Michael M.c.a. Pijpers, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, Hans Van Bokhoven, and Catharina E.e.m. Van Der Zee. "Reduced Exploration, Increased Anxiety, and Altered Social Behavior: Autistic-like Features of Euchromatin Histone

Methyltransferase 1 Heterozygous Knockout Mice." *Behavioural Brain Research* 208, no. 1 (03 2010): 47-55. doi:10.1016/j.bbr.2009.11.008.

Bambini-Junior, Victorio, Leticia Rodrigues, Guilherme Antônio Behr, José Cláudio Fonseca Moreira, Rudimar Riesgo, and Carmem Gottfried. "Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproate: Behavioral Changes and Liver Parameters." *Brain Research* 1408 (08 2011): 8-16. doi:10.1016/j.brainres.2011.06.015.

Banati, Richard B., Jochen Gehrmann, Peter Schubert, and Georg W. Kreutzberg. "Cytotoxicity of Microglia." *Glia* 7, no. 1 (01 1993): 111-18. doi:10.1002/glia.440070117.

Banks, William A., Scott R. Plotkin, and Abba J. Kastin. "Permeability of the Blood-Brain Barrier to Soluble Cytokine Receptors." *Neuroimmunomodulation* 2, no. 3 (11, 1995): 161-65. doi:10.1159/000096887.

Barbon, Alessandro, Maurizio Popoli, Luca La Via, Stefania Moraschi, Ivan Vallini, Daniela Tardito, Ettore Tiraboschi, Laura Musazzi, Roberto Giambelli, Massimo Gennarelli, Giorgio Racagni, and Sergio Barlati. "Regulation of Editing and Expression of Glutamate α-Amino-Propionic-Acid (AMPA)/Kainate Receptors by Antidepressant Drugs." *Biological Psychiatry* 59, no. 8 (04 2006): 713-20. doi:10.1016/j.biopsych.2005.10.018.

Baron-Cohen, Simon. "Does Autism Need a Cure?" *The Lancet* 373, no. 9675 (05 2009): 1595-596. doi:10.1016/s0140-6736(09)60891-6.

Barreto, George, Sergio Veiga, Iñigo Azcoitia, Luis M. Garcia-Segura, and Daniel Garcia-Ovejero. "Testosterone Decreases Reactive Astroglia and Reactive Microglia after Brain Injury in Male Rats: Role of Its Metabolites, Oestradiol and Dihydrotestosterone." *European Journal of Neuroscience* 25, no. 10 (06, 2007): 3039-046. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05563.x.

Beacher, Felix D. C. C., Eugenia Radulescu, Ludovico Minati, Simon Baron-Cohen, Michael V. Lombardo, Meng-Chuan Lai, Anne Walker, Dawn Howard, Marcus A. Gray, Neil A. Harrison, and Hugo D. Critchley. "Sex Differences and Autism: Brain Function during Verbal Fluency and Mental Rotation." *PLoS ONE* 7, no. 6 (06, 2012). doi:10.1371/journal.pone.0038355.

Becker, Kevin G. "Autism, Asthma, Inflammation, and the Hygiene Hypothesis." *Medical Hypotheses* 69, no. 4 (01 2007): 731-40. doi:10.1016/j.mehy.2007.02.019.

Beery, Annaliese K., and Irving Zucker. "Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35, no. 3 (01 2011): 565-72. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.07.002.

Bekker, Marrie H.j., and Janneke Van Mens-Verhulst. "Anxiety Disorders: Sex Differences in Prevalence, Degree, and Background, But Gender-Neutral Treatment." *Gender Medicine* 4 (01 2007). doi:10.1016/s1550-8579(07)80057-x.

Belarbi, Karim, and Susanna Rosi. "Modulation of Adult-born Neurons in the Inflamed Hippocampus." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (2013). doi:10.3389/fncel.2013.00145.

Belmonte, Matthew K., and Thomas Bourgeron. "Fragile X Syndrome and Autism at the Intersection of Genetic and Neural Networks." *Nature Neuroscience* 9, no. 10 (10 2006): 1221-225. doi:10.1038/nn1765.

Benraiss, Abdellatif, Su Wang, Stephanie Herrlinger, Xiaojie Li, Devin Chandler-Militello, Joseph Mauceri, Hayley B. Burm, Michael Toner, Mikhail Osipovitch, Qiwu Jim Xu, Fengfei Ding, Fushun Wang, Ning Kang, Jian Kang, Paul C. Curtin, Daniela Brunner, Martha S. Windrem, Ignacio Munoz-Sanjuan, Maiken Nedergaard, and Steven A. Goldman. "Human Glia Can Both Induce and Rescue Aspects of Disease Phenotype in Huntington Disease." *Nature Communications* 7 (06, 2016): 11758. doi:10.1038/ncomms11758.

Berg, R. “Autism--an environmental health issue after all?”. *Journal of Environmental Health*. (2009): 14-8.

Berkley, Karen J. "Vive La Différence!" *Trends in Neurosciences* 15, no. 9 (09 1992): 331-32. doi:10.1016/0166-2236(92)90048-d.

Besedovsky, Hugo O., and Adriana Del Rey. "Physiology of Psychoneuroimmunology: A Personal View." *Brain, Behavior, and Immunity* 21, no. 1 (01 2007): 34-44. doi:10.1016/j.bbi.2006.09.008.

Bilbo, Staci D., Nicholas J. Newsum, David B. Sprunger, Linda R. Watkins, Jerry W. Rudy, and Steven F. Maier. "Differential Effects of Neonatal Handling on Early Life Infection-induced Alterations in Cognition in Adulthood." *Brain, Behavior, and Immunity* 21, no. 3 (03 2007): 332-42. doi:10.1016/j.bbi.2006.10.005.

Bilbo, Staci D., Raz Yirmiya, Jose Amat, Evan D. Paul, Linda R. Watkins, and Steven F. Maier. "Bacterial Infection Early in Life Protects against Stressor-induced Depressive-like Symptoms in Adult Rats." *Psychoneuroendocrinology* 33, no. 3 (04 2008): 261-69. doi:10.1016/j.psyneuen.2007.11.008.

Bilbo, Staci D., Lindsay H. Levkoff, John H. Mahoney, Linda R. Watkins, Jerry W. Rudy, and Steven F. Maier. "Neonatal Infection Induces Memory Impairments Following an Immune Challenge in Adulthood." *Behavioral Neuroscience* 119, no. 1 (2005): 293-301. doi:10.1037/0735-7044.119.1.293.

Bilbo, Staci D., Jerry W. Rudy, Linda R. Watkins, and Steven F. Maier. "A Behavioural Characterization of Neonatal Infection-facilitated Memory Impairment in Adult Rats." *Behavioural Brain Research* 169, no. 1 (04 2006): 39-47. doi:10.1016/j.bbr.2005.12.002.

Bingaman, Elena W., Debra J. Magnuson, Thackery S. Gray, and Robert J. Handa. "Androgen Inhibits the Increases in Hypothalamic Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) and CRH-Immunoreactivity following Gonadectomy." *Neuroendocrinology* 59, no. 3 (04, 2008): 228-34. doi:10.1159/000126663.

Black, Joshua C., and Johnathan R. Whetstine. "Chromatin Landscape." *Epigenetics* 6, no. 1 (01 2011): 9-15. doi:10.4161/epi.6.1.13331.

Blaheta, Roman A., and Jindrich Cinatl. "Anti-tumor Mechanisms of Valproate: A Novel Role for an Old Drug." *Medicinal Research Reviews* 22, no. 5 (07, 2002): 492-511. doi:10.1002/med.10017.

Blanchard, D.caroline, Guy Griebel, and Robert J. Blanchard. "Gender Bias in the Preclinical Psychopharmacology of Anxiety: Male Models for (predominantly) Female Disorders." *Journal of Psychopharmacology* 9, no. 2 (03 1995): 79-82. doi:10.1177/026988119500900201.

Boche, D., V. H. Perry, and J. A. R. Nicoll. "Review: Activation Patterns of Microglia and Their Identification in the Human Brain." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39, no. 1 (01, 2013): 3-18. doi:10.1111/nan.12011.

Bonnet, U., T. Leniger, and M. Wiemann. "Alteration of Intracellular PH and Activity of CA3-pyramidal Cells in Guinea Pig Hippocampal Slices by Inhibition of Transmembrane Acid Extrusion." *Brain Research* 872, no. 1-2 (07 2000): 116-24. doi:10.1016/s0006-8993(00)02350-7.

Braunschweig, D., P. Ashwood, P. Krakowiak, I. Hertzpicciotto, R. Hansen, L. Croen, I. Pessah, and J. Vandewater. "Autism: Maternally Derived Antibodies Specific for Fetal Brain Proteins." *NeuroToxicology*, 11, 2007. doi:10.1016/j.neuro.2007.10.010.

Braunschweig, Daniel, and Judy Van De Water. "Maternal Autoantibodies in Autism." *Archives of Neurology* 69, no. 6 (06, 2012). doi:10.1001/archneurol.2011.2506.

Brooks, S. P., T. Pask, L. Jones, and S. B. Dunnett. "Behavioural Profiles of Inbred Mouse Strains Used as Transgenic Backgrounds. I: Motor Tests." *Genes, Brain and Behavior* 3, no. 4 (08 2004): 206-15. doi:10.1111/j.1601-183x.2004.00072.x.

Brooks, S. P., T. Pask, L. Jones, and S. B. Dunnett. "Behavioural Profiles of Inbred Mouse Strains Used as Transgenic Backgrounds. II: Cognitive Tests." *Genes, Brain and Behavior* 4, no. 5 (07 2005): 307-17. doi:10.1111/j.1601-183x.2004.00109.x.

Buie, Timothy. "Gastrointestinal Problems in Individuals with Autism Spectrum Disorders." *Autism Spectrum Disorders*, 05 2011, 420-30. doi:10.1093/med/9780195371826.003.0028.

Bunn, T. L., P. J. Parsons, E. Kao, and R. R. Dietert. "Exposure to Lead during Critical Windows of Embryonic Development: Differential Immunotoxic Outcome Based on Stage of Exposure and Gender." *Toxicological Sciences* 64, no. 1 (11, 2001): 57-66. doi:10.1093/toxsci/64.1.57.

Bush, Toby G., Narman Puvanachandra, Catherine H. Horner, Anabella Polito, Thor Ostenfeld, Clive N. Svendsen, Lennart Mucke, Martin H. Johnson, and Michael V. Sofroniew. "Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice." *Neuron* 23, no. 2 (06 1999): 297-308. doi:10.1016/s0896-6273(00)80781-3.

Buxbaum, J. D., J. M. Silverman, C. J. Smith, D. A. Greenberg, M. Kilifarski, J. Reichert, E. H Cook Jr, Y. Fang, C-Y Song, and R. Vitale. "Association between a GABRB3 Polymorphism and Autism." *Molecular Psychiatry* 7, no. 3 (03, 2002): 311-16. doi:10.1038/sj.mp.4001011.

Campbell, Daniel B., Chun Li, James S. Sutcliffe, Antonio M. Persico, and Pat Levitt. "Genetic

Evidence Implicating Multiple Genes in the MET Receptor Tyrosine Kinase Pathway in Autism Spectrum Disorder." *Autism Research* 1, no. 3 (06 2008): 159-68. doi:10.1002/aur.27.

Carey, M. P., C. H. Deterd, J. De Koning, F. Helmerhorst, and E. R De Kloet. "The Influence of Ovarian Steroids on Hypothalamic-pituitary-adrenal Regulation in the Female Rat." *Journal of Endocrinology* 144, no. 2 (02, 1995): 311-21. doi:10.1677/joe.0.1440311.

Cavaglieri, Claudia R., Anita Nishiyama, Luis Claudio Fernandes, Rui Curi, Elizabeth A. Miles, and Philip C. Calder. "Differential Effects of Short-chain Fatty Acids on Proliferation and Production of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines by Cultured Lymphocytes." *Life Sciences* 73, no. 13 (08 2003): 1683-690. doi:10.1016/s0024-3205(03)00490-9.

Cavaillon, Jean-Marc, and Minou Adib-Conquy. *Critical Care* 10, no. 5 (2006): 233. doi:10.1186/cc5055.

Chahrour, M., S. Y. Jung, C. Shaw, X. Zhou, S. T. C. Wong, J. Qin, and H. Y. Zoghbi. "MeCP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription." *Science* 320, no. 5880 (05, 2008): 1224-229. doi:10.1126/science.1153252.

Chakrabarti, Suniti, and Eric Fombonne. "Pervasive Developmental Disorders in Preschool Children: Confirmation of High Prevalence." *American Journal of Psychiatry* 162, no. 6 (06 2005): 1133-141. doi:10.1176/appi.ajp.162.6.1133.

Chan, W.y., S. Kohsaka, and P. Rezaie. "The Origin and Cell Lineage of Microglia—New Concepts." *Brain Research Reviews* 53, no. 2 (02 2007): 344-54. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.11.002.

Chapman, A., P.e. Keane, B.s. Meldrum, J. Simiand, and J.c. Vernieres. "Mechanism of Anticonvulsant Action of Valproate." *Progress in Neurobiology* 19, no. 4 (01 1982): 315-59. doi:10.1016/0301-0082(82)90010-7.

Chen, Zhihong, and Bruce D. Trapp. "Microglia and Neuroprotection." *Journal of Neurochemistry* 136 (03, 2015): 10-17. doi:10.1111/jnc.13062.

Cherry, Jonathan D., John A. Olschowka, and M. O'Banion. "Neuroinflammation and M2 Microglia: The Good, the Bad, and the Inflamed." *Journal of Neuroinflammation* 11, no. 1 (2014): 98. doi:10.1186/1742-2094-11-98.

Chhor, Vibol, Tifenn Le Charpentier, Sophie Lebon, Marie-Virgine Oré, Idoia Lara Celador, Julien Josserand, Vincent Degos, Etienne Jacotot, Henrik Hagberg, Karin Sävman, Carina Mallard, Pierre Gressens, and Bobbi Fleiss. "Characterization of Phenotype Markers and Neuronotoxic Potential of Polarised Primary Microglia in Vitro." *Brain, Behavior, and Immunity* 32 (08 2013): 70-85. doi:10.1016/j.bbi.2013.02.005.

Christensen, Jakob, Therese Koops Grønborg, Merete Juul Sørensen, Diana Schendel, Erik Thorlund Parner, Lars Henning Pedersen, and Mogens Vestergaard. "Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism." *Jama* 309, no. 16 (04, 2013): 1696. doi:10.1001/jama.2013.2270.

Chou, Kun-Hsien, Yawei Cheng, I-Yun Chen, Ching-Po Lin, and Woei-Chyn Chu. "Sex-linked

White Matter Microstructure of the Social and Analytic Brain." *NeuroImage* 54, no. 1 (01 2011): 725-33. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.07.010.

Chrousos, G. P. "Stress and Sex Versus Immunity and Inflammation." *Science Signaling* 3, no. 143 (10, 2010). doi:10.1126/scisignal.3143pe36.

Chura, Lindsay R., Michael V. Lombardo, Emma Ashwin, Bonnie Auyeung, Bhismadev Chakrabarti, Edward T. Bullmore, and Simon Baron-Cohen. "Organizational Effects of Fetal Testosterone on Human Corpus Callosum Size and Asymmetry." *Psychoneuroendocrinology* 35, no. 1 (01 2010): 122-32. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.09.009.

Ciaranello, Andrea L., and Roland D. Ciaranello. "The Neurobiology of Infantile Autism." *The Neuroscientist* 1, no. 6 (11 1995): 361-67. doi:10.1177/107385849500100608.

Claman, Henry N. "Maternal Immune Responses Affecting Pregnancy and the Fetus." *The Immunology of Human Pregnancy*, 1993, 131-69. doi:10.1007/978-1-4612-0361-2_5.

Collins, Stephen M., Michael Surette, and Premysl Bercik. "The Interplay between the Intestinal Microbiota and the Brain." *Nature Reviews Microbiology* 10, no. 11 (09, 2012): 735-42. doi:10.1038/nrmicro2876.

Connolly, Anne M., Michael G. Chez, Alan Pestronk, Susan T. Arnold, Shobhna Mehta, and Ruthmary K. Deuel. "Serum Autoantibodies to Brain in Landau-Kleffner Variant, Autism, and Other Neurologic Disorders." *The Journal of Pediatrics* 134, no. 5 (05 1999): 607-13. doi:10.1016/s0022-3476(99)70248-9.

Constantino, John N., and Richard D. Todd. "Genetic Structure of Reciprocal Social Behavior." *American Journal of Psychiatry* 157, no. 12 (12 2000): 2043-045. doi:10.1176/appi.ajp.157.12.2043.

Coury, D. L., P. Ashwood, A. Fasano, G. Fuchs, M. Geraghty, A. Kaul, G. Mawe, P. Patterson, and N. E. Jones. "Gastrointestinal Conditions in Children With Autism Spectrum Disorder: Developing a Research Agenda." *Pediatrics* 130, no. Supplement (11, 2012). doi:10.1542/peds.2012-0900n.

Crawley, Jacqueline N., and Jennifer Brielmaier. "Animal Models." *Encyclopedia of Autism Spectrum Disorders*, 2013, 160-74. doi:10.1007/978-1-4419-1698-3_546.

Crawley, Jacqueline, and Kathleen Bailey. "Anxiety-Related Behaviors in Mice." *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, Second Edition Frontiers in Neuroscience*, 10, 2008, 77-101. doi:10.1201/noe1420052343.ch5.

Crawley, Jacqueline N. "Behavioral Neuroscience." *Current Protocols in Neuroscience*, 09 2004. doi:10.1002/0471142301.ns0800s28.

Crawley, Jacqueline N., and Richard Paylor. "A Proposed Test Battery and Constellations of Specific Behavioral Paradigms to Investigate the Behavioral Phenotypes of Transgenic and Knockout Mice." *Hormones and Behavior* 31, no. 3 (06 1997): 197-211. doi:10.1006/hbeh.1997.1382.

Crawley, Jacqueline N. "What's Wrong With My Mouse?" 03, 2007. doi:10.1002/0470119055.

Critchlow, V., Liebelt, RA., Bar-Sela, M., Mountcastle, W., Lipscomb, HS. “Sex-difference in resting pituitary-adrenal function in the rat”. American Journal of Physiology. (1963): 807-15.

Croen, Lisa A., and Judith K. Grether. Journal of Autism and Developmental Disorders 33, no. 2 (2003): 227-29. doi:10.1023/a:1022964132203.

Crowley, James J., Julie A. Blendy, and Irwin Lucki. "Strain-dependent Antidepressant-like Effects of Citalopram in the Mouse Tail Suspension Test." *Psychopharmacology* 183, no. 2 (10, 2005): 257-64. doi:10.1007/s00213-005-0166-5.

Cuadros, M. "The Origin and Differentiation of Microglial Cells during Development." *Progress in Neurobiology* 56, no. 2 (10 1998): 173-89. doi:10.1016/s0301-0082(98)00035-5.

Członkowska, Anna, and Iwona Kurkowska-Jastrzębska. "Inflammation and Gliosis in Neurological Diseases – Clinical Implications." *Journal of Neuroimmunology* 231, no. 1-2 (02 2011): 78-85. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.09.020.

Dantzer, Robert. "Cytokine-Induced Sickness Behavior: Where Do We Stand?" *Brain, Behavior, and Immunity* 15, no. 1 (03 2001): 7-24. doi:10.1006/brbi.2000.0613.

Dantzer, Robert, Jason C. O'connor, Gregory G. Freund, Rodney W. Johnson, and Keith W. Kelley. "From Inflammation to Sickness and Depression: When the Immune System Subjugates the Brain." *Nature Reviews Neuroscience* 9, no. 1 (01 2008): 46-56. doi:10.1038/nrn2297.

Dantzer, Robert, Jan-Pieter Konsman, Rose-Marie Bluthé, and Keith W. Kelley. "Neural and Humoral Pathways of Communication from the Immune System to the Brain: Parallel or Convergent?" *Autonomic Neuroscience* 85, no. 1-3 (12 2000): 60-65. doi:10.1016/s1566-0702(00)00220-4.

Dantzer, Robert, and Keith W. Kelley. "Twenty Years of Research on Cytokine-induced Sickness Behavior." *Brain, Behavior, and Immunity* 21, no. 2 (02 2007): 153-60. doi:10.1016/j.bbi.2006.09.006.

Defensor, Erwin B., Michael J. Corley, Robert J. Blanchard, and D. Caroline Blanchard. "Facial Expressions of Mice in Aggressive and Fearful Contexts." *Physiology & Behavior* 107, no. 5 (12 2012): 680-85. doi:10.1016/j.physbeh.2012.03.024.

Dekker, Job, and Tom Misteli. "Long-Range Chromatin Interactions." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7, no. 10 (10 2015). doi:10.1101/cshperspect.a019356.

Delong, G. R., S. C. Bean, and F. R. Brown. "Acquired Reversible Autistic Syndrome in Acute Encephalopathic Illness in Children." *Archives of Neurology* 38, no. 3 (03, 1981): 191-94. doi:10.1001/archneur.1981.00510030085013.

Delorey, T., P. Sahbaie, E. Hashemi, G. Homanics, and J. Clark. "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, no. 2 (03, 2008): 207-20.

doi:10.1016/j.bbr.2007.09.009.

Dempster, E. L., R. Pidsley, L. C. Schalkwyk, S. Owens, A. Georgiades, F. Kane, S. Kalidindi, M. Picchioni, E. Kravariti, T. Toulopoulou, R. M. Murray, and J. Mill. "Disease-associated Epigenetic Changes in Monozygotic Twins Discordant for Schizophrenia and Bipolar Disorder." *Human Molecular Genetics* 20, no. 24 (09, 2011): 4786-796. doi:10.1093/hmg/ddr416.

Depino, Amaicha Mara, Luciana Lucchina, and Fernando Pitossi. "Early and Adult Hippocampal TGF-β1 Overexpression Have opposite Effects on Behavior." *Brain, Behavior, and Immunity* 25, no. 8 (11 2011): 1582-591. doi:10.1016/j.bbi.2011.05.007.

Depino, Amaicha M., Mariana Alonso, Carina Ferrari, Adriana Del Rey, Daniel Anthony, Hugo Besedovsky, Jorge H. Medina, and Fernando Pitossi. "Learning Modulation by Endogenous Hippocampal IL-1: Blockade of Endogenous IL-1 Facilitates Memory Formation." *Hippocampus* 14, no. 4 (2004): 526-35. doi:10.1002/hipo.10164.

Derecki, Noël C., James C. Cronk, Zhenjie Lu, Eric Xu, Stephen B. G. Abbott, Patrice G. Guyenet, and Jonathan Kipnis. "Wild-type Microglia Arrest Pathology in a Mouse Model of Rett Syndrome." *Nature* 484, no. 7392 (03, 2012): 105-09. doi:10.1038/nature10907.

Dinan, Timothy G., and John F. Cryan. "Regulation of the Stress Response by the Gut Microbiota: Implications for Psychoneuroendocrinology." *Psychoneuroendocrinology* 37, no. 9 (09 2012): 1369-378. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.03.007.

Dufour-Rainfray, Diane, Patrick Vourc'H, Sébastien Tourlet, Denis Guilloteau, Sylvie Chalon, and Christian R. Andres. "Fetal Exposure to Teratogens: Evidence of Genes Involved in Autism." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35, no. 5 (04 2011): 1254-265. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.12.013.

Engelhardt, Britta, and Lydia Sorokin. "The Blood–brain and the Blood–cerebrospinal Fluid Barriers: Function and Dysfunction." *Seminars in Immunopathology* 31, no. 4 (09, 2009): 497-511. doi:10.1007/s00281-009-0177-0.

Enstrom, Amanda M., Charity E. Onore, Judy A. Van De Water, and Paul Ashwood. "Differential Monocyte Responses to TLR Ligands in Children with Autism Spectrum Disorders." *Brain, Behavior, and Immunity* 24, no. 1 (01 2010): 64-71. doi:10.1016/j.bbi.2009.08.001.

Eroglu, Cagla, and Ben A. Barres. "Regulation of Synaptic Connectivity by Glia." *Nature* 468, no. 7321 (11, 2010): 223-31. doi:10.1038/nature09612.

Farina, Cinthia, Francesca Aloisi, and Edgar Meinl. "Astrocytes Are Active Players in Cerebral Innate Immunity." *Trends in Immunology* 28, no. 3 (03 2007): 138-45. doi:10.1016/j.it.2007.01.005.

Fatemi, S. H., E. S. Emamian, R. W. Sidwell, D. A. Kist, J. M. Stary, J. A. Earle, and P. Thuras. "Human Influenza Viral Infection in Utero Alters Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity in the Developing Brains of Neonatal Mice." *Molecular Psychiatry* 7, no. 6 (07, 2002): 633-40. doi:10.1038/sj.mp.4001046.

Faulkner, J. R. "Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury." *Journal of Neuroscience* 24, no. 9 (03, 2004): 2143-155.

doi:10.1523/jneurosci.3547-03.2004.

Faure, Alexis, Elsa Pittaras, Anne Nosjean, Jonathan Chabout, Arnaud Cressant, and Sylvie Granon. "Social Behaviors and Acoustic Vocalizations in Different Strains of Mice." *Behavioural Brain Research* 320 (03 2017): 383-90. doi:10.1016/j.bbr.2016.11.003.

Federman, N., M.s. Fustiñana, and A. Romano. "Reconsolidation Involves Histone Acetylation Depending on the Strength of the Memory." *Neuroscience* 219 (09 2012): 145-56. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.057.

Felger, Jennifer C., Takato Abe, Ulrike W. Kaunzner, Andres Gottfried-Blackmore, Judit Gal-Toth, Bruce S. Mcewen, Costantino Iadecola, and Karen Bulloch. "Brain Dendritic Cells in Ischemic Stroke: Time Course, Activation State, and Origin." *Brain, Behavior, and Immunity* 24, no. 5 (07 2010): 724-37. doi:10.1016/j.bbi.2009.11.002.

Fields, R. D. "New Insights into Neuron-Glia Communication." *Science* 298, no. 5593 (10, 2002): 556-62. doi:10.1126/science.298.5593.556.

Figueiredo, Helmer F., Charles M. Dolgas, and James P. Herman. "Stress Activation of Cortex and Hippocampus Is Modulated by Sex and Stage of Estrus." *Endocrinology* 143, no. 7 (07 2002): 2534-540. doi:10.1210/endo.143.7.8888.

Finegold, Sydney M., Denise Molitoris, Yuli Song, Chengxu Liu, Marja-Liisa Vaisanen, Ellen Bolte, Maureen Mcteague, Richard Sandler, Hannah Wexler, Elizabeth M. Marlowe, Matthew D. Collins, Paul A. Lawson, Paula Summanen, Mehmet Baysallar, Thomas J. Tomzynski, Erik Read, Eric Johnson, Rial Rolfe, Palwasha Nasir, Haroun Shah, David A. Haake, Patricia Manning, and Ajay Kaul. "Gastrointestinal Microflora Studies in Late-Onset Autism." *Clinical Infectious Diseases* 35, no. S1 (09 2002). doi:10.1086/341914.

Foley, Kelly A., Klaus-Peter Ossenkopp, Martin Kavaliers, and Derrick F. Macfabe. "Pre- and Neonatal Exposure to Lipopolysaccharide or the Enteric Metabolite, Propionic Acid, Alters Development and Behavior in Adolescent Rats in a Sexually Dimorphic Manner." *PLoS ONE* 9, no. 1 (01, 2014). doi:10.1371/journal.pone.0087072.

Foley, Kelly A., Derrick F. Macfabe, Martin Kavaliers, and Klaus-Peter Ossenkopp. "Sexually Dimorphic Effects of Prenatal Exposure to Lipopolysaccharide, and Prenatal and Postnatal Exposure to Propionic Acid, on Acoustic Startle Response and Prepulse Inhibition in Adolescent Rats: Relevance to Autism Spectrum Disorders." *Behavioural Brain Research* 278 (02 2015): 244-56. doi:10.1016/j.bbr.2014.09.032.

Fombonne, Eric. "The Changing Epidemiology of Autism." *Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities* 18, no. 4 (12 2005): 281-94. doi:10.1111/j.1468-3148.2005.00266.x.

Foo, Yong Zhi, Shinichi Nakagawa, Gillian Rhodes, and Leigh W. Simmons. "The Effects of Sex Hormones on Immune Function: A Meta-analysis." *Biological Reviews* 92, no. 1 (01, 2016): 551-71. doi:10.1111/brv.12243.

Franco, Rafael, and Diana Fernández-Suárez. "Alternatively Activated Microglia and Macrophages in the Central Nervous System." *Progress in Neurobiology* 131 (08 2015):

65-86. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.05.003.

Fukao, Taro, Masanobu Tanabe, Yasuo Terauchi, Takayuki Ota, Satoshi Matsuda, Tomoichiro Asano, Takashi Kadowaki, Tsutomu Takeuchi, and Shigeo Koyasu. "PI3K-mediated Negative Feedback Regulation of IL-12 Production in DCs." *Nature Immunology* 3, no. 9 (08, 2002): 875-81. doi:10.1038/ni825.

Fumagalli, Stefano, Carlo Perego, Francesca Pischiutta, Elisa R. Zanier, and Maria-Grazia De Simoni. "The Ischemic Environment Drives Microglia and Macrophage Function." *Frontiers in Neurology* 6 (04, 2015). doi:10.3389/fneur.2015.00081.

Gaalen, Marcel M Van, and Thomas Steckler. "Behavioural Analysis of Four Mouse Strains in an Anxiety Test Battery." *Behavioural Brain Research* 115, no. 1 (10 2000): 95-106. doi:10.1016/s0166-4328(00)00240-0.

Gaillard, R.c., and E. Spinedi. "Sex- and Stress-steroids Interactions and the Immune System: Evidence for a Neuroendocrine-immunological Sexual Dimorphism." *Domestic Animal Endocrinology* 15, no. 5 (09 1998): 345-52. doi:10.1016/s0739-7240(98)00028-9.

Garbett, Krassimira, Philip J. Ebert, Amanda Mitchell, Carla Lintas, Barbara Manzi, Károly Mirnics, and Antonio M. Persico. "Immune Transcriptome Alterations in the Temporal Cortex of Subjects with Autism." *Neurobiology of Disease* 30, no. 3 (06 2008): 303-11. doi:10.1016/j.nbd.2008.01.012.

Gardener, H., D. Spiegelman, and S. L. Buka. "Prenatal Risk Factors for Autism: Comprehensive Meta-analysis." *The British Journal of Psychiatry* 195, no. 1 (06, 2009): 7-14. doi:10.1192/bjp.bp.108.051672.

Geller, A. M. "Gender-Dependent Behavioral and Sensory Effects of a Commercial Mixture of Polychlorinated Biphenyls (Aroclor 1254) in Rats." *Toxicological Sciences* 59, no. 2 (02, 2001): 268-77. doi:10.1093/toxsci/59.2.268.

Gent, Tiejo, Cobi J. Heijnen, and Philip D. A. Treffers. "Autism and the Immune System." *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 38, no. 3 (03 1997): 337-49. doi:10.1111/j.1469-7610.1997.tb01518.x.

Ghaziuddin, Mohammad, Luke Y. Tsai, Laura Eilers, and N. Ghaziuddin. "Brief Report: Autism and Herpes Simplex Encephalitis." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 22, no. 1 (03 1992): 107-13. doi:10.1007/bf01046406.

Giaume, C., F. Kirchhoff, C. Matute, A. Reichenbach, and A. Verkhratsky. "Glia: The Fulcrum of Brain Diseases." *Cell Death and Differentiation* 14, no. 7 (04, 2007): 1324-335. doi:10.1038/sj.cdd.4402144.

Gillberg, Christopher. "Autistic Children's Hand Preferences: Results from an Epidemiological Study of Infantile Autism." *Psychiatry Research* 10, no. 1 (09 1983): 21-30. doi:10.1016/0165-1781(83)90025-2.

Gillberg, Christopher. "Brief Report: Onset at Age 14 of a Typical Autistic Syndrome. A Case Report of a Girl with Herpes Simplex Encephalitis." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 16, no. 3 (09 1986): 369-75. doi:10.1007/bf01531665.

Gillies, G.e., K. Virdee, S. Mcarthur, and J.w. Dalley. "Sex-dependent Diversity in Ventral Tegmental Dopaminergic Neurons and Developmental Programing: A Molecular, Cellular and Behavioral Analysis." *Neuroscience* 282 (12 2014): 69-85. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.05.033.

Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov, and M. Merad. "Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages." *Science* 330, no. 6005 (10, 2010): 841-45. doi:10.1126/science.1194637.

Golgi, C. “Generalita` sul sistema nervoso ed istologia del tessuto nervoso”. Vallardi, Milano (1883).

Gottfried-Blackmore, Andres, Amanda Sierra, Peter H. Jellinck, Bruce S. Mcewen, and Karen Bulloch. "Brain Microglia Express Steroid-converting Enzymes in the Mouse." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 109, no. 1-2 (03 2008): 96-107. doi:10.1016/j.jsbmb.2007.12.013.

Gottfried-Blackmore, Andres, Amanda Sierra, Bruce S. Mcewen, Renshan Ge, and Karen Bulloch. "Microglia Express Functional 11β-hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1." *Glia*, 2010. doi:10.1002/glia.21007.

Gottlicher, M. "Valproic Acid Defines a Novel Class of HDAC Inhibitors Inducing Differentiation of Transformed Cells." *The EMBO Journal* 20, no. 24 (12, 2001): 6969-978. doi:10.1093/emboj/20.24.6969.

Greer, Margaret K., Meredith Lyons-Crews, Lawrence B. Mauldin, and Frank R. Brown. "A Case Study of the Cognitive and Behavioral Deficits of Temporal Lobe Damage in Herpes Simplex Encephalitis." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 19, no. 2 (06 1989): 317-26. doi:10.1007/bf02211849.

Grossman, Charles J. "The Role of Sex Steroids in Immune System Regulation." *Bilateral Communication Between the Endocrine and Immune Systems Endocrinology and Metabolism*, 1994, 1-11. doi:10.1007/978-1-4612-2616-1_1.

Gupta, Sudhir, Sudeepta Aggarwal, Babek Rashanravan, and Thomas Lee. "Th1- and Th2-like Cytokines in CD4 and CD8 T Cells in Autism." *Journal of Neuroimmunology* 85, no. 1 (05 1998): 106-09. doi:10.1016/s0165-5728(98)00021-6.

Habib, Pardes, Alexander Slowik, Adib Zendedel, Sonja Johann, Jon Dang, and Cordian Beyer. "Regulation of Hypoxia-Induced Inflammatory Responses and M1-M2 Phenotype Switch of Primary Rat Microglia by Sex Steroids." *Journal of Molecular Neuroscience* 52, no. 2 (10, 2013): 277-85. doi:10.1007/s12031-013-0137-y.

Habib, Pardes, and Cordian Beyer. "Regulation of Brain Microglia by Female Gonadal Steroids." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 146 (02 2015): 3-14. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.02.018.

Hallmayer, Joachim. "Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism." *Archives of General Psychiatry* 68, no. 11 (11, 2011): 1095. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.76.

Hallmayer, Joachim, Emma J. Glasson, Carol Bower, Beverly Petterson, Lisa Croen, Judith Grether, and Neil Risch. "On the Twin Risk in Autism." *The American Journal of Human Genetics* 71, no. 4 (10 2002): 941-46. doi:10.1086/342990.

Hanisch, Uwe-Karsten, and Helmut Kettenmann. "Microglia: Active Sensor and Versatile Effector Cells in the Normal and Pathologic Brain." *Nature Neuroscience* 10, no. 11 (11 2007): 1387-394. doi:10.1038/nn1997.

Hara, Yuta, Yuko Maeda, Shunsuke Kataoka, Yukio Ago, Kazuhiro Takuma, and Toshio Matsuda. "Effect of Prenatal Valproic Acid Exposure on Cortical Morphology in Female Mice." *Journal of Pharmacological Sciences* 118, no. 4 (2012): 543-46. doi:10.1254/jphs.12025sc.

Hart, Benjamin L. "Biological Basis of the Behavior of Sick Animals." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 12, no. 2 (06 1988): 123-37. doi:10.1016/s0149-7634(88)80004-6.

Heijtz, R. D., S. Wang, F. Anuar, Y. Qian, B. Bjorkholm, A. Samuelsson, M. L. Hibberd, H. Forssberg, and S. Pettersson. "Normal Gut Microbiota Modulates Brain Development and Behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, no. 7 (01, 2011): 3047-052. doi:10.1073/pnas.1010529108.

Heo, Yong, Yubin Zhang, Donghong Gao, Veronica M. Miller, and David A. Lawrence. "Aberrant Immune Responses in a Mouse with Behavioral Disorders." *PLoS ONE* 6, no. 7 (07, 2011). doi:10.1371/journal.pone.0020912.

Hilton, G.d, J.l Nuez, and M.m Mccarthy. "Sex Differences in Response to Kainic Acid and Estradiol in the Hippocampus of Newborn Rats." *Neuroscience* 116, no. 2 (01 2003): 383-91. doi:10.1016/s0306-4522(02)00716-9.

Hopkins, Stephen J., and Nancy J. Rothwell. "Cytokines and the Nervous System I: Expression and Recognition." *Trends in Neurosciences* 18, no. 2 (02 1995): 83-88. doi:10.1016/0166-2236(95)80029-2.

Hornig, Mady, and W. Ian Lipkin. "Infectious and Immune Factors in the Pathogenesis of Neurodevelopmental Disorders: Epidemiology, Hypotheses, and Animal Models." *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 7, no. 3 (2001): 200-10. doi:10.1002/mrdd.1028.

Howland, J.g., B.n. Cazakoff, and Y. Zhang. "Altered Object-in-place Recognition Memory, Prepulse Inhibition, and Locomotor Activity in the Offspring of Rats Exposed to a Viral Mimetic during Pregnancy." *Neuroscience* 201 (01 2012): 184-98. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.11.011.

Hsiao, E., S. Mcbride, J. Chow, S.k. Mazmanian, and P.h. Patterson. "Modeling an Autism Risk Factor in Mice Leads to Permanent Changes in the Immune System." *Brain, Behavior, and Immunity* 26 (09 2012). doi:10.1016/j.bbi.2012.07.143.

Hsiao, Elaine Y., Catherine Bregere, Natalia Malkova, and Paul H. Patterson. "Modeling Features of Autism in Rodents." *Autism Spectrum Disorders*, 05 2011, 935-62.

doi:10.1093/med/9780195371826.003.0059.

Hsiao, Elaine Y., and Paul H. Patterson. "Placental Regulation of Maternal-fetal Interactions and Brain Development." *Developmental Neurobiology* 72, no. 10 (08, 2012): 1317-326. doi:10.1002/dneu.22045.

Hsiao, Elaine Y., Sara W. Mcbride, Sophia Hsien, Gil Sharon, Embriette R. Hyde, Tyler Mccue, Julian A. Codelli, Janet Chow, Sarah E. Reisman, Joseph F. Petrosino, Paul H. Patterson, and Sarkis K. Mazmanian. "Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders." *Cell* 155, no. 7 (12 2013): 1451-463. doi:10.1016/j.cell.2013.11.024.

Iossifov, Ivan, Brian J. O'Roak, Stephan J. Sanders, Michael Ronemus, Niklas Krumm, Dan Levy, Holly A. Stessman, Kali T. Witherspoon, Laura Vives, Karynne E. Patterson, Joshua D. Smith, Bryan Paeper, Deborah A. Nickerson, Jeanselle Dea, Shan Dong, Luis E. Gonzalez, Jeffrey D. Mandell, Shrikant M. Mane, Michael T. Murtha, Catherine A. Sullivan, Michael F. Walker, Zainulabedin Waqar, Liping Wei, A. Jeremy Willsey, Boris Yamrom, Yoon-Ha Lee, Ewa Grabowska, Ertugrul Dalkic, Zihua Wang, Steven Marks, Peter Andrews, Anthony Leotta, Jude Kendall, Inessa Hakker, Julie Rosenbaum, Beicong Ma, Linda Rodgers, Jennifer Troge, Giuseppe Narzisi, Seungtai Yoon, Michael C. Schatz, Kenny Ye, W. Richard Mccombie, Jay Shendure, Evan E. Eichler, Matthew W. State, and Michael Wigler. "The Contribution of De Novo Coding Mutations to Autism Spectrum Disorder." *Nature* 515, no. 7526 (10, 2014): 216-21. doi:10.1038/nature13908.

Isensee, Jörg, and Patricia Ruiz Noppinger. "Sexually Dimorphic Gene Expression in Mammalian Somatic Tissue." *Gender Medicine* 4 (01 2007). doi:10.1016/s1550-8579(07)80049-0.

Ito, Daisuke, Yoshinori Imai, Keiko Ohsawa, Kazuyuki Nakajima, Yasuo Fukuuchi, and Shinichi Kohsaka. "Microglia-specific Localisation of a Novel Calcium Binding Protein, Iba1." *Molecular Brain Research* 57, no. 1 (06 1998): 1-9. doi:10.1016/s0169-328x(98)00040-0.

Ivarsson, S., I. Bjerre, P. Vegfors, and K. Ahlfors. "Autism as One of Several Disabilities in Two Children with Congenital Cytomegalovirus Infection." *Neuropediatrics* 21, no. 02 (05 1990): 102-03. doi:10.1055/s-2008-1071471.

Iwata, Keiko, Hideo Matsuzaki, Taishi Miyachi, Chie Shimmura, Shiro Suda, Kenji J. Tsuchiya, Kaori Matsumoto, Katsuaki Suzuki, Yasuhide Iwata, Kazuhiko Nakamura, Masatsugu Tsujii, Toshirou Sugiyama, Kohji Sato, and Norio Mori. "Investigation of the Serum Levels of Anterior Pituitary Hormones in Male Children with Autism." *Molecular Autism* 2, no. 1 (2011): 16. doi:10.1186/2040-2392-2-16.

Jaenisch, Rudolf, and Adrian Bird. "Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals." *Nature Genetics* 33, no. 3s (03 2003): 245-54. doi:10.1038/ng1089.

Jacquemont, Sébastien, Bradley P. Coe, Micha Hersch, Michael H. Duyzend, Niklas Krumm, Sven Bergmann, Jacques S. Beckmann, Jill A. Rosenfeld, and Evan E. Eichler. "A Higher Mutational Burden in Females Supports a "Female Protective Model" in Neurodevelopmental Disorders." *The American Journal of Human Genetics* 94, no. 3 (03 2014): 415-25. doi:10.1016/j.ajhg.2014.02.001.

Jamain, Stéphane, Hélène Quach, Catalina Betancur, Maria Råstam, Catherine Colineaux, I. Carina Gillberg, Henrik Soderstrom, Bruno Giros, Marion Leboyer, Christopher Gillberg, Thomas Bourgeron, Christopher Gillberg, Maria Råstam, Carina Gillberg, Agneta Nydén, Henrik Söderström, Marion Leboyer, Catalina Betancur, Anne Philippe, Bruno Giros, Catherine Colineaux, Deborah Cohen, Nadia Chabane, Marie-Christine Mouren-Siméoni, Alexis Brice, Eili Sponheim, Ingrid Spurkland, Ola H. Skjeldal, Mary Coleman, Philip L. Pearl, Ira L. Cohen, John Tsiouris, Michele Zappella, Grazia Menchetti, Alfonso Pompella, Harald Aschauer, and Lionel Van Maldergem. "Mutations of the X-linked Genes Encoding Neuroligins NLGN3 and NLGN4 Are Associated with Autism." *Nature Genetics* 34, no. 1 (03, 2003): 27-29. doi:10.1038/ng1136.

Jarome, Timothy J., and Farah D. Lubin. "Histone Lysine Methylation: Critical Regulator of Memory and Behavior." *Reviews in the Neurosciences* 24, no. 4 (01, 2013). doi:10.1515/revneuro-2013-0008.

Johnston, G. R., and N. R. Webster. "Cytokines and the Immunomodulatory Function of the Vagus Nerve." *British Journal of Anaesthesia* 102, no. 4 (02, 2009): 453-62. doi:10.1093/bja/aep037.

Jorde, LB., Hasstedt, SJ., Ritvo, ER., Mason-Brothers, A., Freeman, BJ., Pingree, C., McMahon, WM., Petersen, B., Jenson, WR., Mo., A. "Complex Segregation Analysis of autism." Am. J. Hum. Genet. (1991): 932-8.

Kang, Victor, George C. Wagner, and Xue Ming. "Gastrointestinal Dysfunction in Children With Autism Spectrum Disorders." *Autism Research* 7, no. 4 (04, 2014): 501-06. doi:10.1002/aur.1386.

Kanner, Leo. *Autistic Disturbances of Affective Contact*. Place of Publication Not Identified: Publisher Not Identified, 1943.

Karperien, Audrey, Helmut Ahammer, and Herbert F. Jelinek. "Quantitating the Subtleties of Microglial Morphology with Fractal Analysis." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (2013). doi:10.3389/fncel.2013.00003.

Karuri, Ar, E. Dobrowsky, and If Tannock. "Selective Cellular Acidification and Toxicity of Weak Organic Acids in an Acidic Microenvironment." *British Journal of Cancer* 68, no. 6 (12 1993): 1080-087. doi:10.1038/bjc.1993.485.

Kataoka, Shunsuke, Kazuhiro Takuma, Yuta Hara, Yuko Maeda, Yukio Ago, and Toshio Matsuda. "Autism-like Behaviours with Transient Histone Hyperacetylation in Mice Treated Prenatally with Valproic Acid." *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 16, no. 01 (11, 2011): 91-103. doi:10.1017/s1461145711001714.

Kates, Wendy R., Ichiro Ikuta, and Courtney P. Burnette. "Gyrification Patterns in Monozygotic Twin Pairs Varying in Discordance for Autism." *Autism Research* 2, no. 5 (10 2009): 267-78. doi:10.1002/aur.98.

Kazlauskas, Nadia, Marcos Campolongo, Luciana Lucchina, Cecilia Zappala, and Amaicha Mara Depino. "Postnatal Behavioral and Inflammatory Alterations in Female Pups

Prenatally Exposed to Valproic Acid." *Psychoneuroendocrinology* 72 (10 2016): 11-21. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.06.001.

Keane, Robert W., and William F. Hickey. "Immunology of the Nervous System." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 57, no. 1 (01 1998): 95. doi:10.1097/00005072-199801000-00011.

Kerschensteiner, M., E. Meinl, and R. Hohlfeld. "Neuro-immune Crosstalk in CNS Diseases." *Neuroscience* 158, no. 3 (02 2009): 1122-132. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.09.009.

Kettenmann, H., U.-K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky. "Physiology of Microglia." *Physiological Reviews* 91, no. 2 (04, 2011): 461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010.

Kettenmann, Helmut, and Alex Verkhratsky. "Glial Cells." *Neuroscience in the 21st Century*, 2013, 475-506. doi:10.1007/978-1-4614-1997-6_19.

Kim, Ki Chan, Chang Soon Choi, Ji-Woon Kim, Seol-Heui Han, Jae Hoon Cheong, Jong Hoon Ryu, and Chan Young Shin. "MeCP2 Modulates Sex Differences in the Postsynaptic Development of the Valproate Animal Model of Autism." *Molecular Neurobiology* 53, no. 1 (11, 2014): 40-56. doi:10.1007/s12035-014-8987-z.

Kim, Ki Chan, Pitna Kim, Hyo Sang Go, Chang Soon Choi, Jin Hee Park, Hee Jin Kim, Se Jin Jeon, Ike Campomayor Dela Pena, Seol-Heui Han, Jae Hoon Cheong, Jong Hoon Ryu, and Chan Young Shin. "Male-specific Alteration in Excitatory Post-synaptic Development and Social Interaction in Pre-natal Valproic Acid Exposure Model of Autism Spectrum Disorder." *Journal of Neurochemistry* 124, no. 6 (02, 2013): 832-43. doi:10.1111/jnc.12147.

Kim, Ki Chan, Pitna Kim, Hyo Sang Go, Chang Soon Choi, Sung-Il Yang, Jae Hoon Cheong, Chan Young Shin, and Kwang Ho Ko. "The Critical Period of Valproate Exposure to Induce Autistic Symptoms in Sprague–Dawley Rats." *Toxicology Letters* 201, no. 2 (03 2011): 137-42. doi:10.1016/j.toxlet.2010.12.018.

Kim, So Hyun, and Catherine Lord. "New Autism Diagnostic Interview-Revised Algorithms for Toddlers and Young Preschoolers from 12 to 47 Months of Age." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 42, no. 1 (03, 2011): 82-93. doi:10.1007/s10803-011-1213-1.

Knickmeyer, R. C., and S. Baron-Cohen. "Topical Review: Fetal Testosterone and Sex Differences in Typical Social Development and in Autism." *Journal of Child Neurology* 21, no. 10 (10, 2006): 825-45. doi:10.1177/08830738060210101601.

Kohane, Isaac S., Andrew Mcmurry, Griffin Weber, Douglas Macfadden, Leonard Rappaport, Louis Kunkel, Jonathan Bickel, Nich Wattanasin, Sarah Spence, Shawn Murphy, and Susanne Churchill. "The Co-Morbidity Burden of Children and Young Adults with Autism Spectrum Disorders." *PLoS ONE* 7, no. 4 (04, 2012). doi:10.1371/journal.pone.0033224.

Konsman, Jan Pieter, Patricia Parnet, and Robert Dantzer. "Cytokine-induced Sickness Behaviour: Mechanisms and Implications." *Trends in Neurosciences* 25, no. 3 (03 2002): 154-59. doi:10.1016/s0166-2236(00)02088-9.

Kouzarides, Tony. "SnapShot: Histone-Modifying Enzymes." *Cell* 131, no. 4 (11 2007).

doi:10.1016/j.cell.2007.11.005.

Kreutzberg, Georg W. "Microglia: A Sensor for Pathological Events in the CNS." *Trends in Neurosciences* 19, no. 8 (08 1996): 312-18. doi:10.1016/0166-2236(96)10049-7.

Kriegstein, Arnold, and Arturo Alvarez-Buylla. "The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells." *Annual Review of Neuroscience* 32, no. 1 (06 2009): 149-84. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.

Ladd-Acosta, C., K. D. Hansen, E. Briem, M. D. Fallin, W. E. Kaufmann, and A. P. Feinberg. "Common DNA Methylation Alterations in Multiple Brain Regions in Autism." *Molecular Psychiatry* 19, no. 8 (09, 2013): 862-71. doi:10.1038/mp.2013.114.

Landrigan, Philip J. "What Causes Autism? Exploring the Environmental Contribution." *Current Opinion in Pediatrics* 22, no. 2 (04 2010): 219-25. doi:10.1097/mop.0b013e328336eb9a.

Lapaque, N., T. Walzer, S. Meresse, E. Vivier, and J. Trowsdale. "Interactions between Human NK Cells and Macrophages in Response to Salmonella Infection." *The Journal of Immunology* 182, no. 7 (04, 2009): 4339-348. doi:10.4049/jimmunol.0803329.

Larsson, Malin, Bernard Weiss, Staffan Janson, Jan Sundell, and Carl-Gustav Bornehag. "Associations between Indoor Environmental Factors and Parental-reported Autistic Spectrum Disorders in Children 6–8 Years of Age." *NeuroToxicology* 30, no. 5 (09 2009): 822-31. doi:10.1016/j.neuro.2009.01.011.

Layé, Sophie, Patricia Parnet, Emmanuelle Goujon, and Robert Dantzer. "Peripheral Administration of Lipopolysaccharide Induces the Expression of Cytokine Transcripts in the Brain and Pituitary of Mice." *Molecular Brain Research* 27, no. 1 (11 1994): 157-62. doi:10.1016/0169-328x(94)90197-x.

Levine, Seymour. "Primary Social Relationships Influence the Development of the Hypothalamic–pituitary–adrenal Axis in the Rat." *Physiology & Behavior* 73, no. 3 (06 2001): 255-60. doi:10.1016/s0031-9384(01)00496-6.

Licinio, J., I. Alvarado, and M-L Wong. "Autoimmunity in Autism." *Molecular Psychiatry* 7, no. 4 (04, 2002): 329. doi:10.1038/sj.mp.4001137.

Lin, D., M. A. Smith, C. Champagne, J. Elter, J. Beck, and S. Offenbacher. "Porphyromonas Gingivalis Infection during Pregnancy Increases Maternal Tumor Necrosis Factor Alpha, Suppresses Maternal Interleukin-10, and Enhances Fetal Growth Restriction and Resorption in Mice." *Infection and Immunity* 71, no. 9 (08, 2003): 5156-162. doi:10.1128/iai.71.9.5156-5162.2003.

Lin, Hui-Ching, Po-Wu Gean, Chao-Chuan Wang, Yun-Han Chan, and Po See Chen. "The Amygdala Excitatory/Inhibitory Balance in a Valproate-Induced Rat Autism Model." *PLoS ONE* 8, no. 1 (01, 2013). doi:10.1371/journal.pone.0055248.

Lindsberg, Perttu Johannes, Daniel Strbian, and Marja-Liisa Karjalainen-Lindsberg. "Mast Cells as Early Responders in the Regulation of Acute Blood–Brain Barrier Changes after Cerebral Ischemia and Hemorrhage." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30, no. 4 (04 2010): 689-702. doi:10.1038/jcbfm.2009.282.

Llorente, Ricardo, Meritxell López Gallardo, Alvaro Llorente Berzal, Carmen Prada, Luis Miguel Garcia-Segura, and María-Paz Viveros. "Early Maternal Deprivation in Rats Induces Gender-dependent Effects on Developing Hippocampal and Cerebellar Cells." *International Journal of Developmental Neuroscience* 27, no. 3 (05 2009): 233-41. doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.01.002.

London, Anat, Merav Cohen, and Michal Schwartz. "Microglia and Monocyte-derived Macrophages: Functionally Distinct Populations That Act in Concert in CNS Plasticity and Repair." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (2013). doi:10.3389/fncel.2013.00034.

Lombardo, M. V., E. Ashwin, B. Auyeung, B. Chakrabarti, K. Taylor, G. Hackett, E. T. Bullmore, and S. Baron-Cohen. "Fetal Testosterone Influences Sexually Dimorphic Gray Matter in the Human Brain." *Journal of Neuroscience* 32, no. 2 (01, 2012): 674-80. doi:10.1523/jneurosci.4389-11.2012.

Lucchina, Luciana, and Amaicha Mara Depino. "Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism." *Autism Research* 7, no. 2 (10, 2013): 273-89. doi:10.1002/aur.1338.

Macfabe, Derrick F., Nathan E. Cain, Francis Boon, Klaus-Peter Ossenkopp, and Donald P. Cain. "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." *Behavioural Brain Research* 217, no. 1 (02 2011): 47-54. doi:10.1016/j.bbr.2010.10.005.

Malkova, Natalia V., Collin Z. Yu, Elaine Y. Hsiao, Marlyn J. Moore, and Paul H. Patterson. "Maternal Immune Activation Yields Offspring Displaying Mouse Versions of the Three Core Symptoms of Autism." *Brain, Behavior, and Immunity* 26, no. 4 (05 2012): 607-16. doi:10.1016/j.bbi.2012.01.011.

Mantovani, Alberto, Antonio Sica, and Massimo Locati. "Macrophage Polarization Comes of Age." *Immunity* 23, no. 4 (10 2005): 344-46. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.001.

Markowitz, Philip I. "Autism in a Child with Congenital Cytomegalovirus Infection." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 13, no. 3 (09 1983): 249-53. doi:10.1007/bf01531564.

Martin, Loren A., Paul Ashwood, Daniel Braunschweig, Maricel Cabanlit, Judy Van De Water, and David G. Amaral. "Stereotypies and Hyperactivity in Rhesus Monkeys Exposed to IgG from Mothers of Children with Autism." *Brain, Behavior, and Immunity* 22, no. 6 (08 2008): 806-16. doi:10.1016/j.bbi.2007.12.007.

Mathieu, Patricia, Ana Paula Piantanida, and Fernando Pitossi. "Chronic Expression of Transforming Growth Factor-Beta Enhances Adult Neurogenesis." *Neuroimmunomodulation* 17, no. 3 (2010): 200-01. doi:10.1159/000258723.

Mcfarlane, H. G., G. K. Kusek, M. Yang, J. L. Phoenix, V. J. Bolivar, and J. N. Crawley. "Autism-like Behavioral Phenotypes in BTBR T Tf/J Mice." *Genes, Brain and Behavior* 7, no. 2 (03 2008): 152-63. doi:10.1111/j.1601-183x.2007.00330.x.

Mckinney, William T. "Animal Models for Affective Disorders." *Models of Mental Disorders*, 1988, 43-95. doi:10.1007/978-1-4684-5430-7_4.

Medzhitov, Ruslan, and Charles. Jr Janeway. "Innate Immune Recognition: Mechanisms and Pathways." *Immunological Reviews* 173, no. 1 (02 2000): 89-97. doi:10.1034/j.1600-065x.2000.917309.x.

Mehta, Mili V., Michael J. Gandal, and Steven J. Siegel. "MGluR5-Antagonist Mediated Reversal of Elevated Stereotyped, Repetitive Behaviors in the VPA Model of Autism." *PLoS ONE* 6, no. 10 (10, 2011). doi:10.1371/journal.pone.0026077.

Mevel, Le J. C., S. Abitbol, G. Beraud, and J. Maniey. "Temporal Changes in Plasma Adrenocorticotropin Concentration after Repeated Neurotropic Stress in Male and Female Rats." *Endocrinology* 105, no. 3 (09 1979): 812-17. doi:10.1210/endo-105-3-812.

Meyer, U. "The Time of Prenatal Immune Challenge Determines the Specificity of Inflammation-Mediated Brain and Behavioral Pathology." *Journal of Neuroscience* 26, no. 18 (05, 2006): 4752-762. doi:10.1523/jneurosci.0099-06.2006.

Meziane, H., A.-M. Ouagazzal, L. Aubert, M. Wietrzych, and W. Krezel. "Estrous Cycle Effects on Behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ Female Mice: Implications for Phenotyping Strategies." *Genes, Brain and Behavior* 6, no. 2 (03 2007): 192-200. doi:10.1111/j.1601-183x.2006.00249.x.

Miller, Brooke H., Laura E. Schultz, Anisha Gulati, Andrew I. Su, and Mathew T. Pletcher. "Phenotypic Characterization of a Genetically Diverse Panel of Mice for Behavioral Despair and Anxiety." *PLoS ONE* 5, no. 12 (12, 2010). doi:10.1371/journal.pone.0014458.

Milner, Teresa A., Kehinde Ayoola, Carrie T. Drake, Scott P. Herrick, Nora E. Tabori, Bruce S. Mcewen, Sudha Warrier, and Stephen E. Alves. "Ultrastructural Localization of Estrogen Receptor β Immunoreactivity in the Rat Hippocampal Formation." *The Journal of Comparative Neurology* 491, no. 2 (2005): 81-95. doi:10.1002/cne.20724.

Mitchell, Colin P., Ying Chen, Marija Kundakovic, Erminio Costa, and Dennis R. Grayson. "Histone Deacetylase Inhibitors Decreasereelinpromoter Methylationin Vitro." *Journal of Neurochemistry* 93, no. 2 (03, 2005): 483-92. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03040.x.

Moessner, Rainald, Christian R. Marshall, James S. Sutcliffe, Jennifer Skaug, Dalila Pinto, John Vincent, Lonnie Zwaigenbaum, Bridget Fernandez, Wendy Roberts, Peter Szatmari, and Stephen W. Scherer. "Contribution of SHANK3 Mutations to Autism Spectrum Disorder." *The American Journal of Human Genetics* 81, no. 6 (12 2007): 1289-297. doi:10.1086/522590.

Mogil, Jeffrey S., and Mona Lisa Chanda. "The Case for the Inclusion of Female Subjects in Basic Science Studies of Pain." *Pain* 117, no. 1 (09 2005): 1-5. doi:10.1016/j.pain.2005.06.020.

Molenhuis, Remco T., Leonie De Visser, Hilgo Bruining, and Martien J. Kas. "Enhancing the Value of Psychiatric Mouse Models; Differential Expression of Developmental Behavioral and Cognitive Profiles in Four Inbred Strains of Mice." *European*

Neuropsychopharmacology 24, no. 6 (06 2014): 945-54. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.01.013.

Mong, Jessica A., Rachel L. Kurzweil, Aline M. Davis, Meredith S. Rocca, and Margaret M. Mccarthy. "Evidence for Sexual Differentiation of Glia in Rat Brain." *Hormones and Behavior* 30, no. 4 (12 1996): 553-62. doi:10.1006/hbeh.1996.0058.

Mong, Jessica A., and Margaret M. Mccarthy. "Steroid-induced Developmental Plasticity in Hypothalamic Astrocytes: Implications for Synaptic Patterning." *Journal of Neurobiology* 40, no. 4 (09, 1999): 602-19. doi:10.1002/(sici)1097-4695(19990915)40:43.0.co;2-o.

Moniach, Deborah, and Ivan M. Roitt. "Human Organ Specific Autoimmunity: Personal Memories." *Autoimmunity* 1, no. 1 (01 1988): 11-13. doi:10.3109/08916938808997171.

Moore, S. J. "A Clinical Study of 57 Children with Fetal Anticonvulsant Syndromes." *Journal of Medical Genetics* 37, no. 7 (07, 2000): 489-97. doi:10.1136/jmg.37.7.489.

Morales-Montor, Jorge, Cristian Togno-Pierce, and Samira Munoz-Cruz. "Non-Reproductive Effects of Sex Steroids: Their Immunoregulatory Role." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11, no. 13 (07, 2011): 1714-727. doi:10.2174/156802611796117630.

Mostafa, Gehan A., Abeer Al Shehab, and Nermeen R. Fouad. "Frequency of CD4 CD25high Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Egyptian Children With Autism." *Journal of Child Neurology* 25, no. 3 (03 2010): 328-35. doi:10.1177/0883073809339393.

Mostafa, Gehan A., and Laila Y. Al-Ayadhi. "The Possible Link between the Elevated Serum Levels of Neurokinin A and Anti-ribosomal P Protein Antibodies in Children with Autism." *Journal of Neuroinflammation* 8, no. 1 (2011): 180. doi:10.1186/1742-2094-8-180.

Mouton, Peter R., Jeffrey M. Long, De-Liang Lei, Victor Howard, Mathias Jucker, Michael E. Calhoun, and Donald K. Ingram. "Age and Gender Effects on Microglia and Astrocyte Numbers in Brains of Mice." *Brain Research* 956, no. 1 (11 2002): 30-35. doi:10.1016/s0006-8993(02)03475-3.

Mowery, Todd M., Sarah M. Wilson, Polina V. Kostylev, Blair Dina, Jennifer B. Buchholz, Anne L. Prieto, and Preston E. Garraghty. "Embryological Exposure to Valproic Acid Disrupts Morphology of the Deep Cerebellar Nuclei in a Sexually Dimorphic Way." *International Journal of Developmental Neuroscience* 40 (02 2015): 15-23. doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.10.003.

Moy, S., J. Nadler, N. Young, A. Perez, L. Holloway, R. Barbaro, J. Barbaro, L. Wilson, D. Threadgill, and J. Lauder. "Mouse Behavioral Tasks Relevant to Autism: Phenotypes of 10 Inbred Strains." *Behavioural Brain Research* 176, no. 1 (01, 2007): 4-20. doi:10.1016/j.bbr.2006.07.030.

Moy, S. S., J. J. Nadler, A. Perez, R. P. Barbaro, J. M. Johns, T. R. Magnuson, J. Piven, and J. N. Crawley. "Sociability and Preference for Social Novelty in Five Inbred Strains: An Approach to Assess Autistic-like Behavior in Mice." *Genes, Brain and Behavior* 3, no. 5 (10 2004): 287-302. doi:10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x.

Muldoon, Leslie L., Jorge I. Alvarez, David J. Begley, Ruben J. Boado, Gregory J Del Zoppo,

Nancy D. Doolittle, Britta Engelhardt, John M. Hallenbeck, Russell R. Lonser, John R. Ohlfest, Alexandre Prat, Maurizio Scarpa, Richard J. Smeyne, Lester R. Drewes, and Edward A. Neuwelt. "Immunologic Privilege in the Central Nervous System and the Blood–Brain Barrier." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33, no. 1 (01 2013): 13-21. doi:10.1038/jcbfm.2012.153.

Nadebaum, C., V. A. Anderson, F. Vajda, D. C. Reutens, S. Barton, and A. G. Wood. "Language Skills of School-aged Children Prenatally Exposed to Antiepileptic Drugs." *Neurology* 76, no. 8 (02, 2011): 719-26. doi:10.1212/wnl.0b013e31820d62c7.

Nadebaum, Caroline, Vicki Anderson, Frank Vajda, David Reutens, Sarah Barton, and Amanda Wood. "The Australian Brain and Cognition and Antiepileptic Drugs Study: IQ in School-Aged Children Exposed to Sodium Valproate and Polytherapy." *Journal of the International Neuropsychological Society* 17, no. 01 (11, 2010): 133-42. doi:10.1017/s1355617710001359.

Nakahata, Yasukazu, Benedetto Grimaldi, Saurabh Sahar, Jun Hirayama, and Paolo Sassone-Corsi. "Signaling to the Circadian Clock: Plasticity by Chromatin Remodeling." *Current Opinion in Cell Biology* 19, no. 2 (04 2007): 230-37. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.016.

Nakasato, Akane, Yasushi Nakatani, Yoshinari Seki, Naohisa Tsujino, Masahiro Umino, and Hideho Arita. "Swim Stress Exaggerates the Hyperactive Mesocortical Dopamine System in a Rodent Model of Autism." *Brain Research* 1193 (02 2008): 128-35. doi:10.1016/j.brainres.2007.11.043.

Nalbandian, Greg, and Susan Kovats. "Understanding Sex Biases in Immunity: Effects of Estrogen on the Differentiation and Function of Antigen-Presenting Cells." *Immunologic Research* 31, no. 2 (2005): 091-106. doi:10.1385/ir:31:2:091.

Nardone, S., D. Sharan Sams, E. Reuveni, D. Getselter, O. Oron, M. Karpuj, and E. Elliott. "DNA Methylation Analysis of the Autistic Brain Reveals Multiple Dysregulated Biological Pathways." *Translational Psychiatry* 4, no. 9 (09, 2014). doi:10.1038/tp.2014.70.

Nedergaard, Maiken, Bruce Ransom, and Steven A. Goldman. "New Roles for Astrocytes: Redefining the Functional Architecture of the Brain." *Trends in Neurosciences* 26, no. 10 (10 2003): 523-30. doi:10.1016/j.tins.2003.08.008.

Nuñez, Joseph L., and Margaret M. Mccarthy. "Estradiol Exacerbates Hippocampal Damage in a Model of Preterm Infant Brain Injury." *Endocrinology* 144, no. 6 (06 2003): 2350-359. doi:10.1210/en.2002-220840.

Onore, Charity E., Milo Careaga, Brooke A. Babineau, Jared J. Schwartzer, Robert F. Berman, and Paul Ashwood. "Inflammatory Macrophage Phenotype in BTBR T Tf/J Mice." *Frontiers in Neuroscience* 7 (2013). doi:10.3389/fnins.2013.00158.

Orihuela, Ruben, Christopher A. Mcpherson, and Gaylia Jean Harry. "Microglial M1/M2 Polarization and Metabolic States." *British Journal of Pharmacology* 173, no. 4 (05, 2015): 649-65. doi:10.1111/bph.13139.

Paolicelli, R. C., G. Bolasco, F. Pagani, L. Maggi, M. Scianni, P. Panzanelli, M. Giustetto, T. A.

Ferreira, E. Guiducci, L. Dumas, D. Ragozzino, and C. T. Gross. "Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development." *Science* 333, no. 6048 (07, 2011): 1456-458. doi:10.1126/science.1202529.

Pardo, Carlos A., Diana L. Vargas, and Andrew W. Zimmerman. "Immunity, Neuroglia and Neuroinflammation in Autism." *International Review of Psychiatry* 17, no. 6 (01 2005): 485-95. doi:10.1080/02646830500381930.

Pardo, Carlos A., and Charles G. Eberhart. "The Neurobiology of Autism." *Brain Pathology* 17, no. 4 (10 2007): 434-47. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00102.x.

Parpura, Vladimir, and Alexei Verkhratsky. "Homeostatic Function of Astrocytes: Ca2 and Na Signalling." *Translational Neuroscience* 3, no. 4 (01, 2012). doi:10.2478/s13380-012-0040-y.

Parracho, H. M. "Differences between the Gut Microflora of Children with Autistic Spectrum Disorders and That of Healthy Children." *Journal of Medical Microbiology* 54, no. 10 (10, 2005): 987-91. doi:10.1099/jmm.0.46101-0.

Patterson, Paul. "Immune Involvement In Autism & Schizophrenia: Etiology And An Animal model." *Schizophrenia Research* 102, no. 1-3 (06 2008): 31. doi:10.1016/s0920-9964(08)70097-5.

Patterson, Paul H. "Maternal Infection: Window on Neuroimmune Interactions in Fetal Brain Development and Mental Illness." *Current Opinion in Neurobiology* 12, no. 1 (02 2002): 115-18. doi:10.1016/s0959-4388(02)00299-4.

Pearson, B. L., E. B. Defensor, R. L. H. Pobbe, L. H. L. Yamamoto, V. J. Bolivar, D. C. Blanchard, and R. J. Blanchard. "Mecp2 Truncation in Male Mice Promotes Affiliative Social Behavior." *Behavior Genetics* 42, no. 2 (09, 2011): 299-312. doi:10.1007/s10519-011-9501-2.

Pearson, Brandon L., Jaclyn K. Bettis, Ksenia Z. Meyza, Lace Y. Yamamoto, D. Caroline Blanchard, and Robert J. Blanchard. "Absence of Social Conditioned Place Preference in BTBR T Tf/J Mice: Relevance for Social Motivation Testing in Rodent Models of Autism." *Behavioural Brain Research* 233, no. 1 (07 2012): 99-104. doi:10.1016/j.bbr.2012.04.040.

Perez-Pouchoulen, Miguel, Marta Miquel, Paul Saft, Brenda Brug, Rebeca Toledo, Maria Elena Hernandez, and Jorge Manzo. "Prenatal Exposure to Sodium Valproate Alters Androgen Receptor Expression in the Developing Cerebellum in a Region and Age Specific Manner in Male and Female Rats." *International Journal of Developmental Neuroscience* 53 (10 2016): 46-52. doi:10.1016/j.ijdevneu.2016.07.001.

Perry, V. Hugh, and Jessica Teeling. "Microglia and Macrophages of the Central Nervous System: The Contribution of Microglia Priming and Systemic Inflammation to Chronic Neurodegeneration." *Seminars in Immunopathology* 35, no. 5 (06, 2013): 601-12. doi:10.1007/s00281-013-0382-8.

Perry, V.h., D.a. Hume, and S. Gordon. "Immunohistochemical Localization of Macrophages and Microglia in the Adult and Developing Mouse Brain." *Neuroscience* 15, no. 2 (06 1985): 313-26. doi:10.1016/0306-4522(85)90215-5.

Persico, Antonio M., and Thomas Bourgeron. "Searching for Ways out of the Autism Maze: Genetic, Epigenetic and Environmental Clues." *Trends in Neurosciences* 29, no. 7 (07 2006): 349-58. doi:10.1016/j.tins.2006.05.010.

Pfrieger, Frank W. "Role of Glial Cells in the Formation and Maintenance of Synapses." *Brain Research Reviews* 63, no. 1-2 (05 2010): 39-46. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.002.

Phiel, C. J., F. Zhang, E. Y. Huang, M. G. Guenther, M. A. Lazar, and P. S. Klein. "Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen." *Journal of Biological Chemistry* 276, no. 39 (07, 2001): 36734-6741. doi:10.1074/jbc.m101287200.

Pitossi, Fernando, Adriana Del Rey, Alexa Kabiersch, and Hugo Besedovsky. "Induction of Cytokine Transcripts in the Central Nervous System and Pituitary following Peripheral Administration of Endotoxin to Mice." *Journal of Neuroscience Research* 48, no. 4 (05, 1997): 287-98. doi:10.1002/(sici)1097-4547(19970515)48:43.0.co;2-7.

Pittman, Dr Quentin J. "A Neuro-Endocrine-Immune Symphony." *Journal of Neuroendocrinology* 23, no. 12 (11, 2011): 1296-297. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02176.x.

Pobbe, Roger L.h., Erwin B. Defensor, Brandon L. Pearson, Valerie J. Bolivar, D. Caroline Blanchard, and Robert J. Blanchard. "General and Social Anxiety in the BTBR T Tf/J Mouse Strain." *Behavioural Brain Research* 216, no. 1 (01 2011): 446-51. doi:10.1016/j.bbr.2010.08.039.

Pollard, Irina, Barbara M. White, J.r. Bassett, and K.d. Cairncross. "Plasma Glucocorticoid Elevation and Desynchronization of the Estrous Cycle following Unpredictable Stress in the Rat." *Behavioral Biology* 14, no. 1 (05 1975): 103-08. doi:10.1016/s0091-6773(75)90374-0.

Prendergast, Brian J., Kenneth G. Onishi, and Irving Zucker. "Female Mice Liberated for Inclusion in Neuroscience and Biomedical Research." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 40 (03 2014): 1-5. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.01.001.

Ransohoff, Richard M., and Melissa A. Brown. "Innate Immunity in the Central Nervous System." *Journal of Clinical Investigation* 122, no. 4 (04, 2012): 1164-171. doi:10.1172/jci58644.

Ransohoff, Richard M., and V. Hugh Perry. "Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses." *Annual Review of Immunology* 27, no. 1 (04 2009): 119-45. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132528.

Ring, Aliza, Yoram Barak, Aharon Ticher, Israel Ashkenazi, Avner Elizur, and Abraham Weizman. "Evidence for an Infectious Etiology in Autism." *Pathophysiology* 4, no. 2 (06 1997): 91-96. doi:10.1016/s0928-4680(97)00168-5.

Río-Hortega del, P., 1919. “El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervención de la microglia en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos granulo-adiposos). III. Naturaleza probable de la microglia.” *Bol. Soc. Esp. Biol*., (1883). 69-129.

Rivest, Serge. "Regulation of Innate Immune Responses in the Brain." *Nature Reviews Immunology* 9, no. 6 (06 2009): 429-39. doi:10.1038/nri2565.

Roberts, Eric M., Paul B. English, Judith K. Grether, Gayle C. Windham, Lucia Somberg, and Craig Wolff. "Maternal Residence Near Agricultural Pesticide Applications and Autism Spectrum Disorders Among Children in the California Central Valley." *Environmental Health Perspectives*, 2007. doi:10.1289/ehp.10168.

Rodier, Patricia M., Jennifer L. Ingram, Barbara Tisdale, Sarah Nelson, and John Romano. "Embryological Origin for Autism: Developmental Anomalies of the Cranial Nerve Motor Nuclei." *The Journal of Comparative Neurology* 370, no. 2 (06, 1996): 247-61. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19960624)370:23.0.co;2-2.

Roegge, C. S. "Gestational-Lactational Exposure to Aroclor 1254 Impairs Radial-Arm Maze Performance in Male Rats." *Toxicological Sciences* 57, no. 1 (09, 2000): 121-30. doi:10.1093/toxsci/57.1.121.

Romeo, R. D. "Puberty: A Period of Both Organizational and Activational Effects of Steroid Hormones On Neurobehavioural Development." *Journal of Neuroendocrinology* 15, no. 12 (12 2003): 1185-192. doi:10.1111/j.1365-2826.2003.01106.x.

Romeo, Russell D., Ilia N. Karatsoreos, and Bruce S. Mcewen. "Pubertal Maturation and Time of Day Differentially Affect Behavioral and Neuroendocrine Responses following an Acute Stressor." *Hormones and Behavior* 50, no. 3 (09 2006): 463-68. doi:10.1016/j.yhbeh.2006.06.002.

Roullet, F.i., L. Wollaston, D. Decatanzaro, and J.a. Foster. "Behavioral and Molecular Changes in the Mouse in Response to Prenatal Exposure to the Anti-epileptic Drug Valproic Acid." *Neuroscience* 170, no. 2 (10 2010): 514-22. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.06.069.

Sanders, Stephan J., Xin He, A. Jeremy Willsey, A. Gulhan Ercan-Sencicek, Kaitlin E. Samocha, A. Ercument Cicek, Michael T. Murtha, Vanessa H. Bal, Somer L. Bishop, Shan Dong, Arthur P. Goldberg, Cai Jinlu, John F. Keaney, Lambertus Klei, Jeffrey D. Mandell, Daniel Moreno-De-Luca, Christopher S. Poultney, Elise B. Robinson, Louw Smith, Tor Solli-Nowlan, Mack Y. Su, Nicole A. Teran, Michael F. Walker, Donna M. Werling, Arthur L. Beaudet, Rita M. Cantor, Eric Fombonne, Daniel H. Geschwind, Dorothy E. Grice, Catherine Lord, Jennifer K. Lowe, Shrikant M. Mane, Donna M. Martin, Eric M. Morrow, Michael E. Talkowski, James S. Sutcliffe, Christopher A. Walsh, Timothy W. Yu, David H. Ledbetter, Christa Lese Martin, Edwin H. Cook, Joseph D. Buxbaum, Mark J. Daly, Bernie Devlin, Kathryn Roeder, and Matthew W. State. "Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci." *Neuron* 87, no. 6 (09 2015): 1215-233. doi:10.1016/j.neuron.2015.09.016.

Sanders, Stephan J., A. Gulhan Ercan-Sencicek, Vanessa Hus, Rui Luo, Michael T. Murtha, Daniel Moreno-De-Luca, Su H. Chu, Michael P. Moreau, Abha R. Gupta, Susanne A. Thomson, Christopher E. Mason, Kaya Bilguvar, Patricia B.s. Celestino-Soper, Murim Choi, Emily L. Crawford, Lea Davis, Nicole R. Davis Wright, Rahul M. Dhodapkar, Michael Dicola, Nicholas M. Dilullo, Thomas V. Fernandez, Vikram Fielding-Singh, Daniel O. Fishman, Stephanie Frahm, Rouben Garagaloyan, Gerald S. Goh, Sindhuja Kammela, Lambertus Klei, Jennifer K. Lowe, Sabata C. Lund, Anna D. Mcgrew, Kyle A.

Meyer, William J. Moffat, John D. Murdoch, Brian J. O'roak, Gordon T. Ober, Rebecca S. Pottenger, Melanie J. Raubeson, Youeun Song, Qi Wang, Brian L. Yaspan, Timothy W. Yu, Ilana R. Yurkiewicz, Arthur L. Beaudet, Rita M. Cantor, Martin Curland, Dorothy E. Grice, Murat Günel, Richard P. Lifton, Shrikant M. Mane, Donna M. Martin, Chad A. Shaw, Michael Sheldon, Jay A. Tischfield, Christopher A. Walsh, Eric M. Morrow, David H. Ledbetter, Eric Fombonne, Catherine Lord, Christa Lese Martin, Andrew I. Brooks, James S. Sutcliffe, Edwin H. Cook, Daniel Geschwind, Kathryn Roeder, Bernie Devlin, and Matthew W. State. "Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism." *Neuron* 70, no. 5 (06 2011): 863-85. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.002.

Sanes, Joshua R. "Faculty of 1000 Evaluation for Maternal Influenza Infection Causes Marked Behavioral and Pharmacological Changes in the Offspring." *F1000 - Post-publication Peer Review of the Biomedical Literature*. doi:10.3410/f.1012117.184421.

Scattoni, M., H. Mcfarlane, V. Zhodzishsky, H. Caldwell, W. Young, L. Ricceri, and J. Crawley. "Reduced Ultrasonic Vocalizations in Vasopressin 1b Knockout Mice." *Behavioural Brain Research* 187, no. 2 (03, 2008): 371-78. doi:10.1016/j.bbr.2007.09.034.

Scattoni, M. L., L. Ricceri, and J. N. Crawley. "Unusual Repertoire of Vocalizations in Adult BTBR T Tf/J Mice during Three Types of Social Encounters." *Genes, Brain and Behavior* 10, no. 1 (07, 2010): 44-56. doi:10.1111/j.1601-183x.2010.00623.x.

Schaafsma, W., X. Zhang, K.c. Van Zomeren, S. Jacobs, P.b. Georgieva, S.a. Wolf, H. Kettenmann, H. Janova, N. Saiepour, U.-K. Hanisch, P. Meerlo, P.j. Van Den Elsen, N. Brouwer, H.w.g.m. Boddeke, and B.j.l. Eggen. "Long-lasting Pro-inflammatory Suppression of Microglia by LPS-preconditioning Is Mediated by RelB-dependent Epigenetic Silencing." *Brain, Behavior, and Immunity* 48 (08 2015): 205-21. doi:10.1016/j.bbi.2015.03.013.

Schebesch, C., V. Kodelja, C. Muller, N. Hakij, S. Bisson, C. E. Orfanos, and S. Goerdt. "Alternatively Activated Macrophages Actively Inhibit Proliferation of Peripheral Blood Lymphocytes and CD4 T Cells in Vitro." *Immunology* 92, no. 4 (12 1997): 478-86. doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00371.x.

Schendel, D., and T. K. Bhasin. "Birth Weight and Gestational Age Characteristics of Children With Autism, Including a Comparison With Other Developmental Disabilities." *Pediatrics* 121, no. 6 (06, 2008): 1155-164. doi:10.1542/peds.2007-1049.

Schmitz, Thomas, and Li-Jin Chew. "Cytokines and Myelination in the Central Nervous System." *The Scientific World JOURNAL* 8 (2008): 1119-147. doi:10.1100/tsw.2008.140.

Schneider, Tomasz, and Ryszard Przewłocki. "Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism." *Neuropsychopharmacology* 30, no. 1 (07, 2004): 80-89. doi:10.1038/sj.npp.1300518.

Schneider, Tomasz, Joanna Turczak, and Ryszard Przewłocki. "Environmental Enrichment Reverses Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Issues for a Therapeutic Approach in Autism." *Neuropsychopharmacology*, 05, 2005. doi:10.1038/sj.npp.1300767.

Schneider, Tomasz, Adam Roman, Agnieszka Basta-Kaim, Marta Kubera, Bogusława Budziszewska, Karolina Schneider, and Ryszard Przewłocki. "Gender-specific Behavioral and Immunological Alterations in an Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid." *Psychoneuroendocrinology* 33, no. 6 (07 2008): 728-40. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.02.011.

Schwartzer, J. J., M. Careaga, C. E. Onore, J. A. Rushakoff, R. F. Berman, and P. Ashwood. "Maternal Immune Activation and Strain Specific Interactions in the Development of Autism-like Behaviors in Mice." *Translational Psychiatry* 3, no. 3 (03 2013). doi:10.1038/tp.2013.16.

Schwarz, Jaclyn M., and Staci D. Bilbo. "Sex, Glia, and Development: Interactions in Health and Disease." *Hormones and Behavior* 62, no. 3 (08 2012): 243-53. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.02.018.

Seale, J. V., S. A. Wood, H. C. Atkinson, M. S. Harbuz, and S. L. Lightman. "Gonadal Steroid Replacement Reverses Gonadectomy-Induced Changes in the Corticosterone Pulse Profile and Stress-Induced Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity of Male and Female Rats." *Journal of Neuroendocrinology* 16, no. 12 (12 2004): 989-98. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01258.x.

Sechzer, Jeri Altneu, Vita Carulli Rabinowitz, Florence L. Denmark, Michael F. Mcginn, Bruce M. Weeks, and Carrie L. Wilkens. "Sex and Gender Bias in Animal Research and in Clinical Studies of Cancer, Cardiovascular Disease, and Depression." *Annals of the New York Academy of Sciences* 736, no. 1 Forging a Wom (12 1994): 21-48. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb12816.x.

Shaked, Iftach, Ziv Porat, Roman Gersner, Jonathan Kipnis, and Michal Schwartz. "Early Activation of Microglia as Antigen-presenting Cells Correlates with T Cell-mediated Protection and Repair of the Injured Central Nervous System." *Journal of Neuroimmunology* 146, no. 1-2 (01 2004): 84-93. doi:10.1016/j.jneuroim.2003.10.049.

Sharif, Ariane, and Vincent Prevot. "ErbB Receptor Signaling in Astrocytes: A Mediator of Neuron-glia Communication in the Mature Central Nervous System." *Neurochemistry International* 57, no. 4 (11 2010): 344-58. doi:10.1016/j.neuint.2010.05.012.

Shultz, Sandy R., Noor A.b. Aziz, Li Yang, Mujun Sun, Derrick F. Macfabe, and Terence J. O'Brien. "Intracerebroventricular Injection of Propionic Acid, an Enteric Metabolite Implicated in Autism, Induces Social Abnormalities That Do Not Differ between Seizure-prone (FAST) and Seizure-resistant (SLOW) Rats." *Behavioural Brain Research* 278 (02 2015): 542-48. doi:10.1016/j.bbr.2014.10.050.

Sierra, Amanda, Oihane Abiega, Anahita Shahraz, and Harald Neumann. "Janus-faced Microglia: Beneficial and Detrimental Consequences of Microglial Phagocytosis." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (2013). doi:10.3389/fncel.2013.00006.

Sierra, Amanda, Andres Gottfried-Blackmore, Teresa A. Milner, Bruce S. Mcewen, and Karen Bulloch. "Steroid Hormone Receptor Expression and Function in Microglia." *Glia* 56, no. 6 (04, 2008): 659-74. doi:10.1002/glia.20644.

Silva, Susana C., Catarina Correia, Constantin Fesel, Marta Barreto, Ana M. Coutinho, Carla

Marques, Teresa S. Miguel, Assunção Ataide, Celeste Bento, Luis Borges, Guiomar Oliveira, and Astrid M. Vicente. "Autoantibody Repertoires to Brain Tissue in Autism Nuclear Families." *Journal of Neuroimmunology* 152, no. 1-2 (07 2004): 176-82. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.03.015.

Simpson, David M., and Russell Ross. "The Neutrophilic Leukocyte in Wound Repair." *Journal of Clinical Investigation* 51, no. 8 (08, 1972): 2009-023. doi:10.1172/jci107007.

Singer, Harvey S., Christina M. Morris, Phillip N. Williams, Dustin Y. Yoon, John J. Hong, and Andrew W. Zimmerman. "Antibrain Antibodies in Children with Autism and Their Unaffected Siblings." *Journal of Neuroimmunology* 178, no. 1-2 (09 2006): 149-55. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.05.025.

Singh, Vijendra K., Reed Warren, Rex Averett, and Mohammad Ghaziuddin. "Circulating Autoantibodies to Neuronal and Glial Filament Proteins in Autism." *Pediatric Neurology* 17, no. 1 (07 1997): 88-90. doi:10.1016/s0887-8994(97)00045-3.

Singh, Vijendra K., and Ryan L. Jensen. "Elevated Levels of Measles Antibodies in Children with Autism." *Pediatric Neurology* 28, no. 4 (04 2003): 292-94. doi:10.1016/s0887-8994(02)00627-6.

Singh, Vijendra K. "Plasma Increase of Interleukin-12 and Interferon-gamma. Pathological Significance in Autism." *Journal of Neuroimmunology* 66, no. 1-2 (05 1996): 143-45. doi:10.1016/0165-5728(96)00014-8.

Singh, Vijendra K., and Wyatt H. Rivas. "Prevalence of Serum Antibodies to Caudate Nucleus in Autistic Children." *Neuroscience Letters* 355, no. 1-2 (01 2004): 53-56. doi:10.1016/j.neulet.2003.10.026.

Skaar, D. A., Y. Shao, J. L. Haines, J. E. Stenger, J. Jaworski, E. R. Martin, G. R. Delong, J. H. Moore, J. L. Mccauley, J. S. Sutcliffe, A. E. Ashley-Koch, M. L. Cuccaro, S. E. Folstein, J. R. Gilbert, and M. A. Pericak-Vance. "Analysis of the RELN Gene as a Genetic Risk Factor for Autism." *Molecular Psychiatry* 10, no. 6 (11, 2004): 563-71. doi:10.1038/sj.mp.4001614.

Smith, K. M., L. Pottage, E. R. Thomas, A. J. Leishman, T. N. Doig, D. Xu, F. Y. Liew, and P. Garside. "Th1 and Th2 CD4 T Cells Provide Help for B Cell Clonal Expansion and Antibody Synthesis in a Similar Manner In Vivo." *The Journal of Immunology* 165, no. 6 (09, 2000): 3136-144. doi:10.4049/jimmunol.165.6.3136.

Smith, S. E. P., J. Li, K. Garbett, K. Mirnics, and P. H. Patterson. "Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6." *Journal of Neuroscience* 27, no. 40 (10, 2007): 10695-0702. doi:10.1523/jneurosci.2178-07.2007.

Spinedi, E., M. O. Suescun, R. Hadid, T. Daneva, and R. C. Gaillard. "Effects of Gonadectomy and Sex Hormone Therapy on the Endotoxin-stimulated Hypothalamo-pituitary-adrenal Axis: Evidence for a Neuroendocrine-immunological Sexual Dimorphism." *Endocrinology* 131, no. 5 (11 1992): 2430-436. doi:10.1210/endo.131.5.1330501.

Spratt, Eve G., Joyce S. Nicholas, Kathleen T. Brady, Laura A. Carpenter, Charles R. Hatcher, Kirk A. Meekins, Richard W. Furlanetto, and Jane M. Charles. "Enhanced Cortisol

Response to Stress in Children in Autism." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 42, no. 1 (03, 2011): 75-81. doi:10.1007/s10803-011-1214-0.

Starossom, Sarah C., Ivan D. Mascanfroni, Jaime Imitola, Li Cao, Khadir Raddassi, Silvia F. Hernandez, Ribal Bassil, Diego O. Croci, Juan P. Cerliani, Delphine Delacour, Yue Wang, Wassim Elyaman, Samia J. Khoury, and Gabriel A. Rabinovich. "Galectin-1 Deactivates Classically Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration." *Immunity* 37, no. 2 (08 2012): 249-63. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.023.

Steffenburg, Suzanne, and Christopher Gillberg. "The Etiology of Autism." *Diagnosis and Treatment of Autism*, 1989, 63-82. doi:10.1007/978-1-4899-0882-7_6.

Stevens, Michael C., Deborah Fein, and Lynn H. Waterhouse. "Season of Birth Effects in Autism." *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 22, no. 3 (06 2000): 399-407. doi:10.1076/1380-3395(200006)22:3;1-v;ft399.

Stipursky, Joice, Luciana Romão, Vanessa Tortelli, Vivaldo Moura Neto, and Flávia Carvalho Alcantara Gomes. "Neuron–glia Signaling: Implications for Astrocyte Differentiation and Synapse Formation." *Life Sciences* 89, no. 15-16 (10 2011): 524-31. doi:10.1016/j.lfs.2011.04.005.

Stolp, H. B., and K. M. Dziegielewska. "Review: Role of Developmental Inflammation and Blood-brain Barrier Dysfunction in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Diseases." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35, no. 2 (04 2009): 132-46. doi:10.1111/j.1365-2990.2008.01005.x.

Strbian, Daniel, Marja-Liisa Karjalainen-Lindsberg, Turgut Tatlisumak, and Perttu J. Lindsberg. "Cerebral Mast Cells Regulate Early Ischemic Brain Swelling and Neutrophil Accumulation." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26, no. 5 (05 2006): 605-12. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600228.

Streit, Wolfgang J., Manuel B. Graeber, and Georg W. Kreutzberg. "Functional Plasticity of Microglia: A Review." *Glia* 1, no. 5 (1988): 301-07. doi:10.1002/glia.440010502.

Strömland, K., V. Nordin, M. Miller, B. Akerström, and C. Gillberg. "Autism In Thalidomide Embryopathy: A Population Study." *Developmental Medicine & Child Neurology* 36, no. 4 (11, 2008): 351-56. doi:10.1111/j.1469-8749.1994.tb11856.x.

Strömland, Kerstin, and Marilyn T. Miller. "Thalidomide Embryopathy: Revisited 27 Years Later." *Acta Ophthalmologica* 71, no. 2 (06, 2009): 238-45. doi:10.1111/j.1755-3768.1993.tb04997.x.

Stubbs, E. Gene. "Autistic Symptoms in a Child with Congenital Cytomegaloviras Infection." *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia* 8, no. 1 (03 1978): 37-43. doi:10.1007/bf01550276.

Sutcliffe, James S., David L. Nelson, Fuping Zhang, Maura Pieretti, C. Thomas Caskey, Debra Saxe, and Stephen T. Warren. "DNA Methylation Represses FMR-1 Transcription in Fragile X Syndrome." *Human Molecular Genetics* 1, no. 6 (1992): 397-400. doi:10.1093/hmg/1.6.397.

Suzuki, Miho M., and Adrian Bird. "DNA Methylation Landscapes: Provocative Insights from Epigenomics." *Nature Reviews Genetics* 9, no. 6 (06 2008): 465-76. doi:10.1038/nrg2341.

Swanberg, S. E., R. P. Nagarajan, S. Peddada, D. H. Yasui, and J. M. Lasalle. "Reciprocal Co-regulation of EGR2 and MECP2 Is Disrupted in Rett Syndrome and Autism." *Human Molecular Genetics* 18, no. 3 (11, 2008): 525-34. doi:10.1093/hmg/ddn380.

Takizawa, Takumi, Kinichi Nakashima, Masakazu Namihira, Wataru Ochiai, Atsumi Uemura, Makoto Yanagisawa, Naoyuki Fujita, Mitsuyoshi Nakao, and Tetsuya Taga. "DNA Methylation Is a Critical Cell-Intrinsic Determinant of Astrocyte Differentiation in the Fetal Brain." *Developmental Cell* 1, no. 6 (12 2001): 749-58. doi:10.1016/s1534-5807(01)00101-0.

Theije, Caroline G.m. De, Harm Wopereis, Mohamed Ramadan, Tiemen Van Eijndthoven, Jolanda Lambert, Jan Knol, Johan Garssen, Aletta D. Kraneveld, and Raish Oozeer. "Altered Gut Microbiota and Activity in a Murine Model of Autism Spectrum Disorders." *Brain, Behavior, and Immunity* 37 (03 2014): 197-206. doi:10.1016/j.bbi.2013.12.005.

Thiagalingam, Sam, Kuang-Hung Cheng, Hyunjoo J. Lee, Nora Mineva, Arunthathi Thiagalingam, and Jose F. Ponte. "Histone Deacetylases: Unique Players in Shaping the Epigenetic Histone Code." *Annals of the New York Academy of Sciences* 983, no. 1 (03 2003): 84-100. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb05964.x.

Todd, R. D., and R. D. Ciaranello. "Demonstration of Inter- and Intraspecies Differences in Serotonin Binding Sites by Antibodies from an Autistic Child." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, no. 2 (01, 1985): 612-16. doi:10.1073/pnas.82.2.612.

Todd, Richard D., Janice M. Hickok, George M. Anderson, and Donald J. Cohen. "Antibrain Antibodies in Infantile Autism." *Biological Psychiatry* 23, no. 6 (03 1988): 644-47. doi:10.1016/0006-3223(88)90012-1.

Tremblay, Marie-Ève, Rebecca L. Lowery, and Ania K. Majewska. "Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience." *PLoS Biology* 8, no. 11 (11, 2010). doi:10.1371/journal.pbio.1000527.

Tremblay, Marie-Ève, and Ania K. Majewska. "A Role for Microglia in Synaptic Plasticity?" *Communicative & Integrative Biology* 4, no. 2 (03 2011): 220-22. doi:10.4161/cib.4.2.14506.

Tsujino, Naohisa, Yasushi Nakatani, Yoshinari Seki, Akane Nakasato, Michiko Nakamura, Michiya Sugawara, and Hideho Arita. "Abnormality of Circadian Rhythm Accompanied by an Increase in Frontal Cortex Serotonin in Animal Model of Autism." *Neuroscience Research* 57, no. 2 (02 2007): 289-95. doi:10.1016/j.neures.2006.10.018.

Tung, Emily W.y., and Louise M. Winn. "Epigenetic Modifications in Valproic Acid-induced Teratogenesis." *Toxicology and Applied Pharmacology* 248, no. 3 (11 2010): 201-09. doi:10.1016/j.taap.2010.08.001.

Turner, Barbara B. "Sex Difference in Glucocorticoid Binding in Rat Pituitary Is Estrogen

Dependent." *Life Sciences* 46, no. 19 (01 1990): 1399-406. doi:10.1016/0024-3205(90)90340-w.

Turner, Barbara B., and Weaver Debra A. "Sexual Dimorphism of Glucocorticoid Binding in Rat Brain." *Brain Research* 343, no. 1 (09 1985): 16-23. doi:10.1016/0006-8993(85)91153-9.

Vamvakopoulos, N. C., and G. P. Chrousos. "Evidence of Direct Estrogenic Regulation of Human Corticotropin-releasing Hormone Gene Expression. Potential Implications for the Sexual Dimophism of the Stress Response and Immune/inflammatory Reaction." *Journal of Clinical Investigation* 92, no. 4 (10, 1993): 1896-902. doi:10.1172/jci116782.

Vargas, Diana L., Caterina Nascimbene, Chitra Krishnan, Andrew W. Zimmerman, and Carlos A. Pardo. "Neuroglial Activation and Neuroinflammation in the Brain of Patients with Autism." *Annals of Neurology* 57, no. 1 (2004): 67-81. doi:10.1002/ana.20315.

Veremeyko, Tatyana, Shafiuddin Siddiqui, Ilya Sotnikov, Amanda Yung, and Eugene D. Ponomarev. "IL-4/IL-13-Dependent and Independent Expression of MiR-124 and Its Contribution to M2 Phenotype of Monocytic Cells in Normal Conditions and during Allergic Inflammation." *PLoS ONE* 8, no. 12 (12, 2013). doi:10.1371/journal.pone.0081774.

Verkhratsky, Alexei, Markel Olabarria, Harun N. Noristani, Chia-Yu Yeh, and Jose Julio Rodriguez. "Astrocytes in Alzheimer's Disease." *Neurotherapeutics* 7, no. 4 (10 2010): 399-412. doi:10.1016/j.nurt.2010.05.017.

Verkhratsky, Alexei, José J. Rodríguez, and Vladimir Parpura. "Astroglia in Neurological Diseases." *Future Neurology* 8, no. 2 (03 2013): 149-58. doi:10.2217/fnl.12.90.

Verma, Deepak, Barnali Chakraborti, Arijit Karmakar, Tirthankar Bandyopadhyay, Asem Surindro Singh, Swagata Sinha, Anindita Chatterjee, Saurabh Ghosh, Kochupurackal P. Mohanakumar, Kanchan Mukhopadhyay, and Usha Rajamma. "Sexual Dimorphic Effect in the Genetic Association of Monoamine Oxidase A (MAOA) Markers with Autism Spectrum Disorder." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 50 (04 2014): 11-20. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.11.010.

Vinten, J., R.l. Bromley, J. Taylor, N. Adab, U. Kini, and G.a. Baker. "The Behavioral Consequences of Exposure to Antiepileptic Drugs in Utero." *Epilepsy & Behavior* 14, no. 1 (01 2009): 197-201. doi:10.1016/j.yebeh.2008.10.011.

Virchow, R. "Die Cellular pathologie in ihrer Begründung auf physiologische and pathologische". Gewebelehre, 1st edition ed. Berlin. (1858)

Vojdani, A., A.w Campbell, E. Anyanwu, A. Kashanian, K. Bock, and E. Vojdani. "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, no. 1-2 (08 2002): 168-77. doi:10.1016/s0165-5728(02)00180-7.

Vorhees, C.v. "Behavioral Teratogenicity of Valproic Acid: Selective Effects on Behavior after Prenatal Exposure to Rats." *Psychopharmacology* 92, no. 2 (06 1987). doi:10.1007/bf00177911.

Vries, B. B De, C. C. Jansen, A. A. Duits, C. Verheij, R. Willemsen, J. O Van Hemel, A. M Van Den Ouweland, M. F. Niermeijer, B. A. Oostra, and D. J. Halley. "Variable FMR1 Gene Methylation of Large Expansions Leads to Variable Phenotype in Three Males from One Fragile X Family." *Journal of Medical Genetics* 33, no. 12 (12, 1996): 1007-010. doi:10.1136/jmg.33.12.1007.

Wagner, George C., Kenneth R. Reuhl, Michelle Cheh, Paulette Mcrae, and Alycia K. Halladay. "A New Neurobehavioral Model of Autism in Mice: Pre- and Postnatal Exposure to Sodium Valproate." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 36, no. 6 (04, 2006): 779-93. doi:10.1007/s10803-006-0117-y.

Wang, Chao-Chuan, Ching-Hsiang Wu, Jeng-Yung Shieh, and Chen-Yuan Wen. "Microglial Distribution and Apoptosis in Fetal Rat Brain." *Developmental Brain Research* 139, no. 2 (12 2002): 337-42. doi:10.1016/s0165-3806(02)00584-9.

Wang, D., and A. Bordey. "The Astrocyte Odyssey." *Progress in Neurobiology*, 10, 2008. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.09.015.

Wang, Ke-Sheng, Xue-Feng Liu, and Nagesh Aragam. "A Genome-wide Meta-analysis Identifies Novel Loci Associated with Schizophrenia and Bipolar Disorder." *Schizophrenia Research* 124, no. 1-3 (12 2010): 192-99. doi:10.1016/j.schres.2010.09.002.

Wassink, Thomas H., Linda M. Brzustowicz, Christopher W. Bartlett, and Peter Szatmari. "The Search for Autism Disease Genes." *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 10, no. 4 (11 2004): 272-83. doi:10.1002/mrdd.20041.

Weinberg, Joanne, and Thomas R. Jerrells. "Suppression of Immune Responsiveness: Sex Differences in Prenatal Ethanol Effects." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 15, no. 3 (06 1991): 525-31. doi:10.1111/j.1530-0277.1991.tb00554.x.

Williams, Gail, John King, Michael Cunningham, Mark Stephan, Bronwyn Kerr, and Joseph H. Hersh. "Fetal Valproate Syndrome and Autism: Additional Evidence of an Association." *Developmental Medicine and Child Neurology* 43, no. 03 (04, 2001): 202. doi:10.1017/s001216220100038x.

Williamson, L. L., P. W. Sholar, R. S. Mistry, S. H. Smith, and S. D. Bilbo. "Microglia and Memory: Modulation by Early-Life Infection." *Journal of Neuroscience* 31, no. 43 (10, 2011): 15511-5521. doi:10.1523/jneurosci.3688-11.2011.

Wills, S., M. Cabanlit, J. Bennett, P. Ashwood, D. Amaral, and J. Van De Water. "Autoantibodies in Autism Spectrum Disorders (ASD)." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1107, no. 1 (06, 2007): 79-91. doi:10.1196/annals.1381.009.

Wills, Sharifia, Christy C. Rossi, Jeffrey Bennett, Veronica Cerdeño, Paul Ashwood, David G. Amaral, and Judy Van De Water. "Further Characterization of Autoantibodies to GABAergic Neurons in the Central Nervous System Produced by a Subset of Children with Autism." *Molecular Autism* 2, no. 1 (2011): 5. doi:10.1186/2040-2392-2-5.

Wilson, Emma H., Wolfgang Weninger, and Christopher A. Hunter. "Trafficking of Immune Cells in the Central Nervous System." *Journal of Clinical Investigation* 120, no. 5 (05, 2010):

1368-379. doi:10.1172/jci41911.

Wing, Lorna, and David Potter. "The Epidemiology of Autistic Spectrum Disorders: Is the Prevalence Rising?" *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 8, no. 3 (2002): 151-61. doi:10.1002/mrdd.10029.

Wiznitzer, M. “Autism and tuberous sclerosis”. *Journal of Child Neurology*. (2004): 675-9.

Wong, C. C Y, E. L. Meaburn, A. Ronald, T. S. Price, A. R. Jeffries, L. C. Schalkwyk, R. Plomin, and J. Mill. "Methylomic Analysis of Monozygotic Twins Discordant for Autism Spectrum Disorder and Related Behavioural Traits." *Molecular Psychiatry* 19, no. 4 (04, 2013): 495-503. doi:10.1038/mp.2013.41.

Wu, Melody V., and Nirao M. Shah. "Control of Masculinization of the Brain and Behavior." *Current Opinion in Neurobiology* 21, no. 1 (02 2011): 116-23. doi:10.1016/j.conb.2010.09.014.

Wu, Suping, Meixiang Jia, Yan Ruan, Jing Liu, Yanqing Guo, Mei Shuang, Xiaohong Gong, Yanbo Zhang, Xiaoling Yang, and Dai Zhang. "Positive Association of the Oxytocin Receptor Gene (OXTR) with Autism in the Chinese Han Population." *Biological Psychiatry* 58, no. 1 (07 2005): 74-77. doi:10.1016/j.biopsych.2005.03.013.

Wöhr, M., F. I. Roullet, and J. N. Crawley. "Reduced Scent Marking and Ultrasonic Vocalizations in the BTBR T Tf/J Mouse Model of Autism." *Genes, Brain and Behavior* 10, no. 1 (03, 2010): 35-43. doi:10.1111/j.1601-183x.2010.00582.x.

Wöhr, Markus, Florence I. Roullet, Albert Y. Hung, Morgan Sheng, and Jacqueline N. Crawley. "Communication Impairments in Mice Lacking Shank1: Reduced Levels of Ultrasonic Vocalizations and Scent Marking Behavior." *PLoS ONE* 6, no. 6 (06, 2011). doi:10.1371/journal.pone.0020631.

Yang, X. "Tissue-specific Expression and Regulation of Sexually Dimorphic Genes in Mice." *Genome Research* 16, no. 8 (06, 2006): 995-1004. doi:10.1101/gr.5217506.

Yilmaz, Gokhan, and D. Neil Granger. "Leukocyte Recruitment and Ischemic Brain Injury." *NeuroMolecular Medicine* 12, no. 2 (07, 2009): 193-204. doi:10.1007/s12017-009-8074-1.

Yochum, Carrie L., Peter Dowling, Kenneth R. Reuhl, George C. Wagner, and Xue Ming. "VPA-induced Apoptosis and Behavioral Deficits in Neonatal Mice." *Brain Research* 1203 (04 2008): 126-32. doi:10.1016/j.brainres.2008.01.055.

Zablotsky, Benjamin, Matthew Bramlett, and Stephen J. Blumberg. "Factors Associated with Parental Ratings of Condition Severity for Children with Autism Spectrum Disorder." *Disability and Health Journal* 8, no. 4 (10 2015): 626-34. doi:10.1016/j.dhjo.2015.03.006.

Zanier, Elisa R., Francesca Pischiutta, Loredana Riganti, Federica Marchesi, Elena Turola, Stefano Fumagalli, Carlo Perego, Emanuela Parotto, Paola Vinci, Pietro Veglianese, Giovanna D’Amico, Claudia Verderio, and Maria-Grazia De Simoni. "Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Drive Protective M2 Microglia Polarization After Brain Trauma." *Neurotherapeutics* 11, no. 3 (06, 2014): 679-95.

doi:10.1007/s13311-014-0277-y.

Zhan, Yang, Rosa C. Paolicelli, Francesco Sforazzini, Laetitia Weinhard, Giulia Bolasco, Francesca Pagani, Alexei L. Vyssotski, Angelo Bifone, Alessandro Gozzi, Davide Ragozzino, and Cornelius T. Gross. "Deficient Neuron-microglia Signaling Results in Impaired Functional Brain Connectivity and Social Behavior." *Nature Neuroscience* 17, no. 3 (02, 2014): 400-06. doi:10.1038/nn.3641.