



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento Fisiología, Biología Molecular y Celular

# **Estudios de los mecanismos subyacentes a la resiliencia en hembras y la vulnerabilidad en machos en un modelo de autismo en ratón**

Tesis presentada para optar por el título de

Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

**Araceli Seiffe**

Directora de tesis: Dra. Amaicha Mara Depino

Consejero de estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET).

Buenos Aires, 2022

## **Estudios de los mecanismos subyacentes a la resiliencia en hembras y la vulnerabilidad en machos en un modelo de autismo en ratón**

Los trastornos del espectro autista (TEA) son patologías del neurodesarrollo caracterizadas por deficiencias en la interacción social y la comunicación, y la expresión de movimientos e intereses repetitivos y estereotipados. Una observación epidemiológica notable es la aparición de TEA en 4 niños por cada niña diagnosticada. Esta evidencia sugiere que el sexo es un factor biológico prominente que contribuye a la etiología y/o desarrollo del TEA. En particular, los varones parecen ser más susceptibles y/o las mujeres son más resistentes a desarrollar TEA.

Los ratones macho expuestos prenatalmente a 600 mg/kg de ácido valproico (VPA) juegan menos cuando son jóvenes y muestran una sociabilidad reducida en la edad adulta. Por el contrario, encontramos que los ratones hembra expuestos prenatalmente a VPA no muestran esta reducción en la sociabilidad. Consideramos esta respuesta diferencial al VPA relacionada con el sexo como una herramienta valiosa para identificar los mecanismos celulares y moleculares subyacentes y generar conocimiento que pueda trasladarse a la mejor comprensión del TEA y a posibles tratamientos.

Previamente nuestro grupo reportó que la convivencia desde el destete (al día postnatal, P 21) de ratones VPA con ratones control revierte la reducción de la sociabilidad en la edad adulta observada en ratones VPA criados con otros compañeros VPA. Por otro lado, habíamos observado alteraciones neuroinflamatorias en los cerebros de animales VPA entre P21 y P35. Finalmente, nuestro grupo observó que los machos VPA inyectados intraperitonealmente día por medio con solución salina entre P22 y P34 no mostraban alteraciones en la sociabilidad en la adultez. Esta evidencia sugiere que el período entre P21 y P35 es crítico para determinar los niveles de sociabilidad adultos, y que las experiencias en este período podrían modular el desarrollo conductual a largo plazo. Así, nuestro primer objetivo fue evaluar los efectos de la manipulación juvenil (MJ) sobre las alteraciones conductuales y fisiológicas provocadas por la administración prenatal de VPA en machos. Encontramos que la MJ revierte la reducción en la sociabilidad en el ensayo de tres cámaras y el aumento en la inmovilidad en el ensayo de natación forzada, además de revertir el aumento en actividad neuronal en la corteza piriforme observado en los animales VPA.

En humanos y otros mamíferos, los machos sufren un proceso de masculinización cerebral, desencadenado por la exposición temprana a hormonas gonadales. En los roedores, esta organización del desarrollo del cerebro es esencial para la correcta visualización de los comportamientos sexuales en la edad adulta, pero también determina otras diferencias sexuales en la función del cerebro y el comportamiento.

Nuestro segundo objetivo fue evaluar si este proceso de masculinización cerebral influye en el desarrollo de conductas relevantes para los TEA. Con este objetivo, estudiamos las diferencias de sexo y el efecto del tratamiento neonatal de las hembras con 17 $\beta$ -estradiol benzoato (E2) sobre diferentes comportamientos relevantes para los TEA. En los P2, P5 y P8, se inyectaron las crías hembra con estradiol (E2) o vehículo. En la edad adulta (desde P60), encontramos que las diferencias de sexo observadas en la exploración, en los comportamientos

repetitivos y en los comportamientos relacionados con la depresión se reducen en gran medida cuando las hembras reciben tratamiento neonatal con E2.

Nuestro tercer objetivo fue identificar el rol de la masculinización por estradiol neonatal sobre el efecto diferencial del VPA prenatal en ratones macho y hembra mencionado más arriba. Analizamos para ello distintas conductas relacionadas con el TEA y observamos que sólo las hembras VPA-E2 muestran una deficiencia en la habituación social, demostrando que la combinación de la exposición prenatal a VPA y el tratamiento con E2 posnatal da como resultado una sociabilidad alterada en ratones hembra.

En resumen, esta tesis ha, por un lado, validado un modelo de rescate por manipulación juvenil, de las alteraciones conductuales y celulares relacionadas con el autismo en ratones macho expuestos prenatalmente a VPA. Este modelo podrá ser utilizado para estudiar posibles mecanismos celulares y moleculares que median los efectos del VPA, pero también para identificar estrategias de tratamiento. Por otro lado, hemos demostrado que la exposición temprana a estradiol masculiniza conductas relacionadas con el autismo, y que esta masculinización es necesaria para que se observen los efectos del VPA. Esperamos en el futuro identificar los mecanismos celulares y moleculares que median estos efectos, lo cual ahondaría en una mejor comprensión del TEA y permitiría el desarrollo de terapias.

**Palabras claves:** Trastornos del espectro autista, Modelo animal de enfermedades psiquiátricas, Masculinización del cerebro, Comportamiento social, Manipulación juvenil.

## **Studies of the mechanisms underlying female resilience and male vulnerability in a mouse model of autism**

Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders characterized by impairments in social interaction and communication, and the expression of repetitive and stereotyped movements and interests. A notable epidemiological observation is the appearance of ASD in 4 boys for every girl diagnosed. This evidence suggests that sex is a prominent biological factor contributing to the etiology and/or development of ASD. In particular, males seem to be more susceptible and/or females are more resistant to developing ASD.

Male mice prenatally exposed to 600 mg/kg valproic acid (VPA) play less when young and show reduced sociability as adults. In contrast, we found that female mice exposed prenatally to VPA do not show this reduction in sociability. We considered this sex-related differential response to VPA as a valuable tool to identify the underlying cellular and molecular mechanisms and to generate knowledge that can be translated into a better understanding of ASD and possible treatments.

Our group previously reported that keeping VPA mice with control mice from weaning (on postnatal day, P 21) reverses the reduction in adult sociability observed in VPA mice reared with other VPA peers. In addition, we observed neuroinflammatory alterations in the brains of VPA animals between P21 and P35. Finally, our group observed that VPA males injected intraperitoneally every other day with saline between P22 and P34 showed no alterations in sociability in adulthood. These evidences suggested that the period between P21 and P35 was critical in determining adult sociability levels and that experiences in this period could have long-lasting impact on behavior. Thus, our first objective was to evaluate the effects of juvenile handling (MJ) on behavioral and physiological alterations caused by prenatal administration of VPA in males. We found that MJ reversed the VPA-induced reduction in sociability in the three-chamber test and increase in immobility in the forced swimming test, in addition to reversing the increase in neuronal activity in the piriform cortex observed in VPA animals.

In humans and other mammals, males undergo a process of brain masculinization, triggered by early exposure to gonadal hormones. In rodents, this organization of brain development is essential for the correct display of sexual behaviors in adulthood, but it also determines other sex differences in brain function and behavior.

Our second objective was to assess whether this brain masculinization process influences the development of behaviors relevant to ASD. To this end, we studied sex differences and the effect of neonatal 17 $\beta$ -estradiol benzoate (E2) treatment of females on different behaviors relevant to ASD. At P2, P5, and P8, female pups were injected with E2 or vehicle. In adulthood (from P60), we found that the sex differences in exploration, repetitive behaviors, and depression-related behaviors are greatly reduced when females receive neonatal E2 treatment.

Our third objective was to identify the role of neonatal estradiol masculinization on the differential effect of prenatal VPA in male and female mice mentioned above. To this end, we analyzed different behaviors related to ASD and observed that only VPA-E2 females show a deficiency in social habituation, demonstrating that the combination of prenatal exposure to VPA and postnatal E2 treatment results in altered sociability in female mice.

In summary, this thesis has validated, on the one hand, a model of juvenile manipulation which rescues behavioral and cellular alterations related to autism in male mice prenatally exposed to VPA. This model can be used to study possible cellular and molecular mechanisms that mediate the effects of VPA, but also to identify treatment strategies. On the other hand, we have shown that early estradiol exposure masculinizes autism-related behaviors, and that this masculinization is necessary for VPA effects to be observed. We hope in the future to identify the cellular and molecular mechanisms that mediate these effects, which would deepen a better understanding of ASD and allow the development of therapies.

**Keywords:** Autism spectrum disorders, Animal model for psychiatric disorder, Brain masculinization, Juvenile handling.

A mi hermana Amalita y a mi hermano Federico  
que, en todas mis versiones, siempre me acompañan.

## Agradecimientos

A la UBA por la educación pública de calidad que recibí. Me emociona sentir que cumplí el sueño de estudiar en esta universidad.

A la Universidad Nacional de Tucumán, mi primera casa de estudios, donde la magia del interés por la ciencia de los docentes me interpeló para comenzar a hacerme preguntas y formarme como científica.

A Amaicha, por haberme ayudado a encontrar mi seguridad, guiarme tan generosamente y por ser un soporte fundamental en mi doctorado. Gracias por tu contención, confianza, disponibilidad, entrega y trabajo. Trabajar con vos ha sido un placer y ha sido un despertar en la forma de ver las cosas y de involucrarme con el trabajo.

A Julián, por guiarme en la vocación incluso desde antes que me decidiera por la biología, por enseñarme que el límite es el cielo.

Al CONICET por permitirme hacer el doctorado.

Al IFIByNE que se convirtió en mi segunda casa.

Al personal del bioterio por ayudarme un a mantener a mis ratoncitos.

A Mauro, por tu filtro hermoso para ver la realidad, porque mi vida ha cambiado desde que te conozco, por la risa y por el amor.

A mis compas del labo Kaio, Ceci, Florcita y Lu por compartir la magia.

A mi mamá que me ayudaste a despertar la curiosidad por el mundo. Gracias por enseñarme a pensar y a querer.

A mi hermana Amalita, mi persona favorita en todo el mundo. La vida me dio el mejor regalo con vos. Aguante nuestra complicidad, nuestro mundo de juegos de la niñez que sigue siendo mi lugar favorito.

A mi hermano Federico, mucho más que un hermano. Tu compañía, tu forma de ver las cosas en cada decisión que tomo son fundamentales en mí.

A padre por enseñarme la libertad de la independencia y contagiarme la pasión por vivir.

A Henri, Sonia, Nacho y Lila que están siempre en mi corazón.

A todos mis amigos que me salvaron la vida:

A Juanma por su claridad, su pasión, sus ganas de vivir y por sus consejos.

A la Juli, por tu sensibilidad, cobijo, por todas las aventuras y por todo el cariño que me has dado.

A la Ave, por invitarme a tomar el mundo con vos.

A la Charly, por nuestras noches de pelis, de charlas, por tu soporte, por ser una amiga impecable y generosa.

A Ale, por nuestras charlas y por la búsqueda de la plenitud que compartimos

A Mile, por tu energía esplendorosa y por tu cariño.

A la Clari, por recorrer este camino juntas.

A la Vale, por la fortaleza y las ganas de ser.

A los chimueles Fede, Jime, Aye, Sole y Brian por los veranos de pileta y cynar.

A los chicos (de los asados) del futbol por la alegría.



## Publicaciones

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

### Trabajos publicados

- Graciarena, M., Seiffe, A., Nait-Oumesmar, B., & Depino, A. M. (2019). Hypomyelination and oligodendroglial alterations in a mouse model of autism spectrum disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00517>.
- Kazlauskas, N., Seiffe, A., Campolongo, M., Zappala, C., & Depino, A. M. (2019). Sex-specific effects of prenatal valproic acid exposure on sociability and neuroinflammation: Relevance for susceptibility and resilience in autism. *Psychoneuroendocrinology*, 110(September). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104441>.
- Seiffe, A., Ramirez, M. F., Barrios, C. D., Albarrán, M. M., & Depino, A. M. (2021). Early estradiol exposure masculinizes disease-relevant behaviors in female mice. *European Journal of Neuroscience*, November 2020, 1–17. <https://doi.org/10.1111/ejn.15130>.
- Seiffe, A., Ramírez, M. F., Sempé, L., & Depino, A. M. (2022). Juvenile handling rescues autism - related effects of prenatal exposure to valproic acid. *Scientific Reports*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11269-7>.

## **Abreviaturas**

A-TAC = Autismo-Tics, ADHD y otras comorbilidades

acp = Comisura anterior

APA = Asociación Americana de Psiquiatría

aPir = Corteza piriforme anterior

AR = Receptor de andrógenos

ASD = Autism Spectrum Disorder

AVP = Arginina-vasopresina

AVPV = Núcleo antero-ventral periventricular

CAST = Prueba de Espectro Autista infantil

CNV = Variantes en el número de copias

Cox = Ciclooxygenasa

CT = Animales control que no fueron perturbados luego del destete

DG = Día gestacional

E2 = 17 $\beta$ -estradiol benzoato

ER = Receptor de estrógenos

FSH = Hormona folículo estimulante

FST = Ensayo de natación forzada

GABA = Ácido gamma-aminobutírico

GLMM = Modelos lineales mixtos generalizados

GnRH = Hormona liberadora de gonadotrofinas

HMG = Genes modificadores de histonas

HPA = Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

IQ = Coeficiente intelectual

LH = Hormona luteinizante

LME = Modelos lineales con efectos mixtos

MJ = Manipulación juvenil

NIH = Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos

NLG = Neurologina

NRXN = Neurexina

NSF = Ensayo de alimentación suprimida por la novedad

OF = Ensayo de campo abierto

P = Día postnatal  
PB = Buffer fosfato  
PFA = Paraformaldehído  
PFC = Corteza prefrontal  
PGE2 = Prostaglandina E2  
Pir = Corteza piriforme  
POA = Área preóptica  
Poly (I:C) = Ácido polyinosínico-polycitidílico  
pPir = Corteza piriforme posterior  
s.c. = Inyección subcutánea  
S.E.M. = Erros estándar de la media  
SG = Ensayo de autoacicalamiento  
Shank 3 = Múltiples dominios repetidos de ankirina 3  
SI = Índice de sociabilidad  
SDN = Núcleo dimórfico sexual  
SNV = Variantes de nucleótido único  
SYN = Sinapsina  
TEA = Trastornos del espectro autista  
TH = Tirosina hidroxilasa  
TP = Testosterona propionato  
TST = Ensayo de suspensión por la cola  
VPA = Ácido valproico  
YALT = Ensayo de laberinto en Y

## Contenido

1. Introducción general .....	14
1.1. Trastornos del espectro autista (TEA) .....	15
1.2. Prevalencia del autismo .....	16
1.3. Etiología del autismo .....	18
1.4. Sesgo del autismo relacionado al sexo.....	23
1.5. Masculinización del cerebro.....	27
1.6. Convergencia de las diferencias sexuales y el sistema inmune en el TEA .....	32
1.7. Modelos animales de TEA .....	33
1.8. ¿Por qué incluir hembras en estudios con modelos experimentales? .....	37
Hipótesis y objetivos .....	40
2. Materiales y métodos .....	42
2.1. Animales .....	43
2.2. Apareo .....	43
2.3. Tratamiento prenatal .....	43
2.4. Nacimiento y destete .....	44
2.5. Tratamiento postnatal.....	44
2.6. Ensayos conductuales .....	45
2.7. Evaluación del estado reproductivo.....	50
2.8. Análisis histológico .....	51
2.9. Medición de la concentración de hormonas en plasma .....	52
3. La manipulación juvenil rescata los efectos relacionados al autismo producto de la exposición prenatal al ácido valproico .....	53
3.1. Introducción .....	54
3.2. Diseño experimental .....	56
3.3. Estadística.....	56
3.4. Resultados .....	58
66	
3.5. Discusión .....	67
4. La exposición temprana al estradiol masculiniza comportamientos relevantes para el TEA en ratones hembra.....	73
4.1. Introducción .....	74
4.2. Diseño experimental .....	75
4.3 Estadística.....	76
4.4. Resultados .....	77

4.5. Discusión .....	87
5. Efectos de la exposición combinada de ácido valproico prenatal y estradiol postnatal sobre la conducta de animales hembras .....	92
5.1. Introducción .....	93
5.2. Diseño experimental .....	93
5.3. Resultados .....	94
5.4. Discusión .....	110
6. Discusión .....	116
6.1. Diferencias entre sexos en el diagnóstico del autismo .....	117
6.2. Interacción entre el tratamiento con VPA y la masculinización mediante la exposición a estradiol postnatal en ratones. ....	120
6.3. Períodos sensibles en el desarrollo que determinan la sociabilidad en ratones adultos .	123
6.4. Conclusiones generales.....	130
7. Bibliografía.....	131

# 1.Introducción general

### 1.1. Trastornos del espectro autista (TEA)

Existen historias que describen comportamientos atípicos que, con la perspectiva de hoy, pensaríamos que fueron niños autistas (Wing and Potter, 2002). Por ejemplo, la leyenda que concierne a los seguidores de San Francisco de Asís incluye historias acerca del Hermano Juniper, quien era descrito como gentil, naif y obstinado. Juniper seguía los preceptos franciscanos con absoluta literalidad, incluso al punto de quitarse la ropa para dársela a un mendigo en la calle. En ese momento, según los documentos, su comportamiento se atribuía a su santidad, mientras que probablemente en nuestros días sería diagnosticado con el síndrome de Asperger (Wing and Potter 2002).

Por otro lado, uno de los primeros casos mencionados que describen individuos que probablemente tenían autismo es el de Victor, “el niño salvaje de Aveyron”, quien fue encontrado cuando tenía aproximadamente 12 años y vivía en el bosque en el sur de Francia en el siglo XVIII. Este niño fue capturado y ubicado a cargo de J.M.G. Itard para ser educado. Itard escribió un relato completo que describía al niño, en el cual es bastante claro que Víctor presentaba autismo con muy poca comprensión del lenguaje u otra forma de comunicación (Lebrun 1980). Asimismo, se cree que el primer reporte en el que se reconocen características similares en niños y niñas insanos que hoy serían probablemente diagnosticados con autismo es de Henry Maudsley en 1867 [revisado en (Wing 1997)]. Luego, en la primera mitad del siglo XX, muchos autores en el campo publicaron acerca de niños/as con psicosis, pero los primeros en reconocer que este conjunto de síntomas descriptos ameritaba una descripción de un síndrome nuevo fueron Leo Kanner (Kanner, 1943) y Hans Asperger (Asperger, 1944).

Leo Kanner (Kanner 1943) analizó el fenotipo de 3 niñas y 8 niños que presentaban un síndrome común, que no estaba descrito hasta la fecha. Hasta entonces, estos niños/as eran presentados como idiotas, “mente floja”, imbéciles o esquizofrénicos. Sin embargo, estos casos en las descripciones de sus padres/madres presentaban varias características en común como ser “autosuficientes”, “felices de ser dejados solos”, “actuaban como si la gente no estuviera ahí”, “totalmente desinteresados de todo lo ajeno”, “actuaban como hipnotizados” y “no mostraban satisfacción social”. De los 11 niños/as, sólo 8 podían hablar y, en estos casos, el lenguaje consistía principalmente en nombrar objetos, adjetivos y números. Muchos de los niños/as presentaban una excelente memoria y podían, por ejemplo, recitar versos, nombres botánicos y compositores. Pero estas listas de palabras no eran más que palabras sin ningún significado, ya que para estos niños/as el lenguaje no se presentaba como una herramienta para comunicar mensajes con sentido. A su vez, el comportamiento de estos niños/as estaba

gobernado por un deseo obsesivo de mantener su entorno sin perturbaciones e igual. Alteraciones e intrusiones de cualquier tipo como la comida, exámenes médicos, o ruidos fuertes podían desencadenar severas crisis en los niños/as analizados. Otra característica clave que menciona Kanner es la presencia de patrones repetitivos en la conducta, ya que los niños/as se mostraban reacios al cambio, a no poder completar una rutina y mostraban poca variedad en sus actividades espontáneas. Por último, los niños/as estudiados por Kanner no presentaban ningún interés en las personas en general, incluida la madre, y preferían no interactuar con otros/as.

Actualmente, la Asociación Americana de Psiquiatría (American Psychological Association (APA), 2013) describe al Trastorno del Espectro Autista (TEA) como un trastorno del neurodesarrollo que se caracteriza por dificultades en la comunicación y en las interacciones sociales, y por patrones restringidos y repetitivos en comportamientos, intereses y actividades. Los síntomas se presentan en los primeros años de vida y afectan el funcionamiento diario. El término "espectro" se utiliza debido a la heterogeneidad en la presentación y gravedad de los síntomas del TEA, así como en las habilidades y el nivel de funcionamiento de las personas que tienen TEA. Las personas que tienen déficits marcados en la comunicación social, pero cuyos síntomas no cumplen los criterios para el TEA, deben ser evaluados para el Trastorno de la Comunicación Social (American Psychological Association (APA) 2013).

## 1.2. Prevalencia del autismo

La prevalencia del autismo actualmente se la estima entre 2.24% a 2.65% (Kim et al. 2011; Zablotsky et al. 2015) y además se reportó que los casos siguen aumentando (Christensen 2018; Matson and Kozlowski 2011). Existe una controversia considerable en cuanto a las causas de las tasas crecientes observadas. Muchos atribuyen estos aumentos a cambios en los criterios de diagnóstico a lo largo del tiempo, a nuevos instrumentos de evaluación y diagnóstico más sensibles, a que actualmente se utilizan nuevas metodologías de investigación para identificar estimaciones de prevalencia que pueden resultar en un aumento, a diferencias culturales que antes no eran tenidas en cuenta al momento de la evaluación y que permiten hacer hoy diagnósticos más confiables, a diferentes métodos de estimación del número de casos, y a un aumento en la concientización e información sobre autismo tanto de profesionales de la salud y de docentes como de las madres y padres [revisado en (Matson and Kozlowski, 2011)].

Una de las razones más esgrimidas para explicar el aumento de la prevalencia de autismo es la consolidación de cambios en los criterios de diagnóstico a lo largo del tiempo. Para



empezar, desde la publicación de Kanner hasta antes de la publicación de la tercera edición del Manual de Diagnóstico de Desórdenes Mentales donde se introdujo el TEA por primera vez, los diagnósticos no fueron asignados por un criterio unificado. A su vez, entre la tercera y la quinta edición del Manual de psiquiatría, el criterio de diagnóstico se fue modificando. Por ejemplo, en la quinta edición se eliminó al síndrome de Rett como parte del TEA. Además, el concepto general de lo que constituye el TEA ha sido expandido, ya que hoy incluye al síndrome de Asperger, puede ser diagnosticado en todos los períodos de la vida (no sólo en la niñez temprana) y a personas con una profunda incapacidad intelectual.

Por otro lado, se ha reportado que muchos de los niños diagnosticados con autismo fueron examinados brevemente siguiendo la entrevista de los padres conocida como Encuesta sobre Desarrollo y Bienestar de Niños y Adolescentes (DAWBA, por sus siglas en inglés *Development and Well-Being Assessment*), pero no por ensayos clínicos más completos llevados a cabo por profesionales, como es el caso de la Entrevista Diagnóstica de Trastornos Sociales y de la Comunicación (DISCO, por sus siglas en inglés *Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders*) (Posserud et al. 2010). De hecho, se encontró que el DAWBA pasa por alto una parte sustancial de los casos de TEA en niños que no presentan inhabilidad intelectual. Otro aspecto es que el DAWBA se enfoca en los síntomas del momento, mientras que un diagnóstico clínico para TEA se basa fuertemente en la historia detallada del desarrollo del paciente (Posserud et al. 2010). Además, hay profesionales con distinta formación que realizan estos cuestionarios diagnósticos, como ser psicólogos escolares, psicólogos clínicos, psiquiatras y neurólogos, por lo que la experiencia y formación profesional varía ampliamente, lo que conlleva muchas veces a diagnósticos no consistentes (Skellern, McDowell, and Schluter 2005; Taylor et al. 2016). Es de esperar que la mejor formación de los profesionales, junto con herramientas de diagnóstico más sensibles, especialmente para los casos más leves de TEA, resulten en un aumento en la prevalencia calculada.

Las estimaciones de la prevalencia de autismo se calculan de distintas formas, incluido el uso de datos de archivo, entrevistas telefónicas y encuestas de toda el área de estudio. Por ejemplo, en el estudio realizado por el *Center for Disease Control and Prevention* de los Estados Unidos (Rice 2006) había diferentes registros disponibles según las personas evaluadas: algunos sólo tenían registros médicos disponibles, mientras que otros también tenían registros educativos accesibles. Tal diferencia resultó en tasas de prevalencia más altas en las regiones con acceso a registros médicos y educativos respecto a las que tenían sólo parte de esta información. Esto podría explicar que frente a un mejor y más fácil acceso a los registros (dado por ejemplo por la informatización de los mismos), la prevalencia calculada tienda a aumentar.

Otro factor importante para considerar es el aumento sustancial en la concientización sobre el autismo y en la provisión de servicios que se ha experimentado en los últimos años. Dado que se discute del TEA con frecuencia en los medios de comunicación, especialmente con la preocupación de que las vacunas sean la causa o el desencadenante de dichos trastornos, los padres y las madres son cada vez más conscientes de la existencia y las características de este trastorno (Wing and Potter 2002). Esta mayor concientización puede llevar a los padres y madres a hacer examinar a sus hijos e hijas al observar ciertos síntomas que probablemente no hubiesen disparado la consulta hace unos años. Además, dado que la información ha aumentado y mejorado simultáneamente con la mayor conciencia, un diagnóstico de TEA ahora también puede ser más aceptado tanto por los padres y madres como por los médicos y médicas.

A pesar de todos estos factores que podrían explicar el significativo aumento en la prevalencia que se ha observado en los últimos años, los análisis poblacionales sugieren que no alcanzarían para justificar por completo dicho incremento y que el número de personas con TEA realmente está aumentando en el mundo (Chiarotti and Venerosi 2020). Las causas de este incremento se desconocen.

### 1.3. Etiología del autismo

A pesar de que ya Kanner planteaba el autismo como un síndrome con causas genéticas (Kanner 1943), durante mucho tiempo este trastorno fue concebido como un desorden emocional sin bases neurológicas, debido a las teorías psicoanalíticas que, sobre todo en los Estados Unidos, sostenían que las actitudes, las formas de educar y la personalidad de los padres, y especialmente las madres, eran las responsables del autismo de sus hijos [revisado en (Wing and Potter, 2002)]. Recién en los años 60 se publicaron las primeras investigaciones científicas sobre autismo.

Como se mencionó más arriba, los TEA son diagnosticados sobre la base de dos dominios alterados en el comportamiento: por un lado, déficits sociales, deterioro del lenguaje y de la comunicación y, por otro lado, la presencia de comportamientos estereotipados y repetitivos. Más allá de esta definición unificadora se encuentra una heterogeneidad clínica extrema, que va desde deficiencias debilitantes hasta un estudiante universitario con un coeficiente intelectual superior al promedio pero con habilidades sociales inadecuadas. Por lo tanto, el autismo no es una sola entidad, sino más bien un fenotipo complejo que abarca múltiples "trastornos autistas" o un continuo de rasgos y comportamientos similares al autismo definidos en el espectro de los TEA, que incluye el trastorno autista ("autismo" de Kanner), el trastorno

desintegrativo infantil, el trastorno generalizado del desarrollo no especificado (PDD-NOS, o “autismo atípico”) y el síndrome de Asperger [revisado en (Persico and Bourgeron, 2006)].

Así como se habla de un espectro autista en alusión a la variabilidad en el fenotipo, también existen múltiples causas que explican el autismo. De hecho, se está abordando la problemática desde múltiples áreas para obtener una mejor comprensión de las causas de este desorden, por lo que hoy el autismo se entiende como una enfermedad producto de una interacción compleja entre la genética y el medio ambiente [revisado en (Chaste and Leboyer, 2012)].

Originalmente se consideró al TEA como un desorden que se debía casi exclusivamente a factores genéticos. Esta concepción se basaba en estudios poblacionales que demostraban que la tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos era mucho más alta que la tasa de concordancia entre gemelos dicigóticos (mellizos) (Bailey et al. 2013; Folstein and Rutter 1977; Hallmayer et al. 2011; Steffenburg et al. 1989). En la misma línea, otros estudios reportaron la presencia de rasgos autistas en los/las parientes de niños/as autistas. El primer trabajo en analizar este aspecto fue publicado en 1957 (Eisenberg 1957) y resulta muy interesante porque, por un lado, refuta las teorías del psicoanálisis del momento que apuntaban a las “madres heladeras” como causante del autismo en los niños, y por otro lado, provee un análisis del comportamiento de los padres varones de niños autistas donde revela evidencia de serias dificultades de personalidad, lo que significa que si bien no presentaban problemas disruptivos de su vida social y laboral, presentaban algunos rasgos relacionados al autismo, como ser obsesivos, desapegados y sin sentido del humor. Luego otros trabajos analizaron la presencia de rasgos autistas en parientes de los casos autistas detectados (Fombonne et al. 1997; Pickles et al. 2000) y se plantearon hipótesis genéticas que podían explicar por qué en algunas familias hay más casos de autismo de los que se espera por azar. También se ha reportado en parientes de niños/as con autismo un retraso en el inicio del habla, dificultad para leer (Folstein et al. 1999), y depresión recurrente (Piven et al. 1991). Estos trabajos plantean la hipótesis de que hay varios genes que pueden interactuar para causar la aparición del TEA, que se segregan de forma independiente y son responsables de la variabilidad de los fenotipos y de los grados de severidad de los síntomas en los miembros de la familia.

En los años 2000, con la disponibilidad de nuevas técnicas moleculares, se han realizado múltiples estudios genéticos a gran escala en pacientes con TEA y sus familias, lo que ha llevado a la identificación de cientos de genes de riesgo. Si bien las proteínas que codifican esos genes tienen diversas funciones, la mayoría de los resultados que se han podido reproducir provienen

de dos amplias clases de proteínas: las involucradas en la formación de sinapsis y las involucradas en la regulación transcripcional y las vías de remodelación de la cromatina (De Rubeis et al. 2014). Los genes de riesgo relacionados con la sinapsis incluyen aquellos que codifican proteínas de adhesión tales como neuroliginas, neurexinas y cadherinas: sinapsina-1 (SYN1) y sinapsina-2 (SYN2), proteína de señalización del receptor de glutamato SH3 y múltiples dominios repetidos de anquirina 3 (SHANK3), proteína activadora 1 de Ras GTPasa sináptica (SYNGAP1) y la subunidad gamma 3 del receptor de ácido aminobutírico tipo A (GABRG3) [revisado en (Rylaarsdam and Guemez-Gamboa, 2019)]. Aquellas que participan en la remodelación de la cromatina incluyen enzimas modificadoras de histonas (codificadas por genes modificadores de histonas, HMG) y remodeladores de cromatina ("lectores") que reconocen modificaciones postraduccionales específicas de histonas y orquestan sus efectos sobre la cromatina (De Rubeis et al. 2014). Entre estos genes, cabe mencionar al gen que codifica la proteína 8 de unión al ADN del dominio helicasa, CHD8, debido a que las mutaciones de pérdida de función en CHD8 en individuos con TEA apuntan a la remodelación de la cromatina como un mecanismo molecular convergente (Ayhan and Konopka 2019).

Finalmente, la identificación de variaciones en el número de copias ha implicado a numerosos genes de diversa función en la etiología de los TEA. Aunque queda por demostrar la causalidad en la mayoría de los casos, un subconjunto sustancial parece ser importante en la modulación del riesgo de enfermedad (Webb et al. 2017). De todas maneras, estas mutaciones *de novo*, junto con las heredadas en el contexto de un síndrome raro, representan al menos el 10-20 % de los TEA (Abrahams and Geschwind 2008).

Si bien existe evidencia que muestra que los genes pueden causar o aumentar el riesgo del TEA, otro factor igual o más importante parece ser el ambiente. En un estudio poblacional de gemelos (Hallmayer et al. 2011) usaron los datos de las tasas de concordancia para obtener parámetros estimados para modelos genéticos. En todos los modelos planteados, tanto el componente genético como el ambiental fueron significativos y, de hecho, el modelo con mejor ajuste resultó ser el que atribuía un 37% de la variabilidad a factores genéticos, mientras que el ambiente compartido explicaba un 55%. Este trabajo presenta relevancia porque es uno de los primeros que prueba que la tasa de concordancia más alta en gemelos se debe en gran medida al ambiente que estos hermanos comparten, especialmente en el período perinatal, más allá de la genética. Otro trabajo que cabe mencionar es un estudio poblacional con una muestra muy grande, de más de 2 millones de niños, donde identificaron pares de gemelos, hermanos, primos y medios hermanos, y encontraron que la heredabilidad del TEA es aproximadamente un 50% (Sandin et al. 2014). Estos resultados indican que el ambiente es un factor tanto o más

importante para el desarrollo del TEA que los factores genéticos. Sin embargo, muchos trabajos han evaluado el aporte de los factores ambientales y de los factores genéticos por separado, en vez de analizar su interacción a través de procesos como la desregulación epigenética, lo cual tal vez permita identificar nuevos mecanismos.

El ambiente puede resultar **causal** si es dañino y precede al TEA, mediando su influencia en la cadena causal entre una predisposición genética y el TEA; también puede tener un efecto **moderador** si aminora la severidad del autismo y hasta **protector** si disminuye el riesgo de TEA (Bölte, Girdler, and Marschik 2019). Así se puede considerar que hay factores ambientales negativos que aumentan el riesgo, pero también interacciones positivas del individuo con el ambiente, que pueden protegerlo o moderar los efectos de los genes o de otros factores ambientales. Entre los factores de riesgo ambientales y biológicos para los TEA se incluyen:

La edad materna y paterna. La edad materna/paterna avanzada está asociada con un aumento en la incidencia de autismo (Bölte et al. 2019). Un meta-análisis que incluyó a 27 trabajos encontró que la categoría de la edad más baja estaba asociada con un menor riesgo en los hijos/hijas a presentar autismo, mientras que la categoría para la edad más alta de los padres fue asociada a un aumento en el riesgo a presentar autismo en la descendencia (Wu et al. 2017). Así, encontraron que un aumento de 10 años en la edad del padre o de la madre está asociado a un riesgo 18-21 % mayor en la descendencia a presentar autismo. Esto se debe probablemente a que con la edad aumenta la probabilidad de mutaciones malignas *de novo* (Jónsson et al. 2017), y lo más probable es que esto se explique por un mayor riesgo acumulativo de mutaciones durante la espermatogénesis a edades avanzadas, así como acumulación de mutaciones en los oocitos a lo largo de la vida. De hecho, las mutaciones *de novo* asociadas con TEA son más a menudo paternas que maternas (Kong et al. 2012).

El entorno fetal. En el contexto de la etiología del TEA, se han considerado numerosas exposiciones prenatales ambientales presentes en el entorno inmediato del feto en desarrollo, como alteraciones en los niveles de hormonas sexuales, obesidad materna, diabetes, hipertensión, infecciones y actividad inmunitaria, así como exposición a ultrasonidos. Respecto a las alteraciones hormonales, se ha hipotetizado que la exposición del feto a esteroides puede contribuir al desarrollo del TEA (Ingudomnukul et al. 2007). En cuanto a las infecciones durante el embarazo como un causante del aumento del riesgo a presentar autismo, se reportó una mayor prevalencia de autismo en niños con el síndrome de rubeola congénita (Chess 1971). A partir de este trabajo se observó que hay muchas infecciones virales y bacterianas maternas que se asocian a una mayor incidencia del TEA, por lo cual se comenzó a elaborar la teoría de que la infección materna, junto con la activación del sistema inmune de la madre, puede llevar al

desarrollo de autismo en la descendencia. Uno de los estudios más completos, que abarcó grandes cantidades de datos, identificó un aumento del 30% en la probabilidad de ser diagnosticado/a con TEA asociado a un diagnóstico de infección en la madre (Lee et al. 2015). La relevancia de la infección materna en el riesgo de TEA puede no estar asociada con la presencia de virus o bacterias *per se*, sino con la respuesta inmunitaria que invocan, una conclusión respaldada por investigaciones que identifican marcadores inflamatorios y anticuerpos elevados en mujeres embarazadas con hijos autistas (Zimmerman et al. 2007). Los modelos de trastornos del neurodesarrollo en roedores por infección directa en las madres proveen soporte a la teoría de activación inmunitaria materna como factor etiológico del TEA, ya que se encontró que la activación del sistema inmune materno lleva a efectos en las crías relacionados con el autismo, como alteraciones en las interacciones sociales, deficiencias comunicativas y comportamientos repetitivos/estereotipados (Lammert and Lukens 2019). Si bien esta hipótesis está bien establecida, no está claro todavía el mecanismo por el cual la infección inmune materna afecta al feto. Se apunta a una alteración en los niveles de citoquinas ya sean de origen materno, en cuyo caso cruzan la placenta, de origen placentario o de origen fetal, a través de la cual la activación inmune materna da como resultado una desregulación inmunitaria y genética en el propio feto (discutido en Abdallah et al., 2013).

Medicación. Se ha reportado previamente que los antidepresivos y anticonvulsivantes tomados durante el embarazo aumentan el riesgo de autismo en la descendencia. Respecto a los anticonvulsivantes, cabe mencionar el caso del VPA (ácido valproico o ácido 2-propilpentanoico) que es utilizado en clínica para el tratamiento de la epilepsia y como un estabilizador del humor en el desorden bipolar. El VPA tiene efectos teratogénicos, por lo que el síndrome de valproato fetal ha sido reconocido como una entidad clínica que se caracteriza por presentar anormalidades fenotípicas en la cara y alteraciones en el desarrollo de los órganos en los sistemas respiratorios, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinario y esquelético (Williams et al. 2001). Además de las alteraciones mencionadas, se encontró que niños con síndrome de valproato fetal también cumplían con el criterio para TEA, ya que presentaban trastornos en el habla, actividades repetitivas, intereses restringidos, y disminución en la sociabilidad (Christianson, Chester, and Kromberg 2008; Williams et al. 2001). También se ha reportado una mayor incidencia de autismo entre los niños expuestos prenatalmente a la talidomida, un sedante utilizado a fines de los años 1950 para tratar las náuseas durante el embarazo, que causó miles de casos de embriopatía, y en los cuales se vio que de 100 niños expuestos a talidomida al menos cuatro cumplieron criterios de diagnóstico para el autismo (Strömland et al. 1994).

Consumo de alcohol. Se ha reportado que el síndrome de alcohol fetal, generado en niños/as por el abuso de alcohol durante el embarazo, tiene cierto solapamiento con TEA, por lo que los niños con síndrome de alcohol fetal presentan más riesgo a cumplir con el criterio para el diagnóstico de autismo (Lange et al. 2018; Nanson 1992).

Exposiciones a tóxicos (ej. contaminación del aire, metales pesados, pesticidas, contaminantes orgánicos). La exposición a tóxicos ambientales afecta a millones de niños en todo el mundo. Los productos químicos industriales que dañan el cerebro en desarrollo se encuentran entre las causas conocidas de aumento en la prevalencia de las discapacidades del neurodesarrollo, incluidos el autismo, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, la dislexia y otras deficiencias cognitivas (Grandjean and Landrigan 2014).

Por último, es pertinente aclarar que las vacunas no están correlacionadas con el desarrollo de autismo. Originalmente se publicó un trabajo donde analizaron 11 casos de niños y una niña en la que se reportó la pérdida de habilidades ya adquiridas, incluyendo el lenguaje, siendo diagnosticados con autismo 11 de esos niños. El trabajo sugería que el comienzo de los síntomas comportamentales coincidía con la administración de las vacunas contra la rubeola, el sarampión y las paperas (Wakefield et al. 1998). Este trabajo ha sido retractado (Editors 2010) ya que las afirmaciones en el artículo original de que las investigaciones fueron “aprobadas” por el comité de ética local han demostrado ser falsas. Luego de esta retracción, se han publicado numerosos trabajos epidemiológicos de gran escala donde refutan que las vacunas, sus componentes (timerosal o mercurio), o las vacunas múltiples (como la de rubeola-paperas-sarampión) se correlacionen positivamente con los casos de TEA [por ejemplo, (Taylor, Swerdfeger, and Eslick 2014)].

#### 1.4. Sesgo del autismo relacionado al sexo

Si bien las causas del autismo no son del todo claras, un factor de riesgo importante es el sexo. Se ha reportado que de los niños/as que cumplen con los criterios de TEA, la proporción es de entre 3 y 4.5 niños por cada niña (Christensen et al. 2018; Loomes, Hull, and Mandy 2017). De esta manera, una posibilidad es que los varones porten factores de riesgo inherentes que los hagan más vulnerables a mutaciones genéticas o a las agresiones ambientales. La otra posibilidad es que las niñas estén inherentemente protegidas contra mutaciones genéticas o riesgos ambientales. Cabe aclarar que ambas posibilidades no son excluyentes.

#### *1.4.1. Mayor susceptibilidad al TEA de los varones*

Los estudios que exploran un origen biológico de la mayor susceptibilidad al TEA de los niños frente a las niñas apuntan a los niveles de esteroides gonadales circulantes en el útero (Auyeung et al. 2009; Ingudomnukul et al. 2007). La mayoría de estos estudios están enmarcados en la teoría del cerebro masculino extremo. Esta teoría consiste en definir el cerebro masculino como la tendencia de ciertos individuos a sistematizar en lugar de empatizar, y el cerebro femenino se define como aquel con el perfil cognitivo opuesto (Baron-Cohen Simon 2010). Usando estas definiciones, el autismo puede ser considerado como un extremo del perfil masculino normal (Baron-Cohen 2002). El mecanismo al que apunta esta teoría es la presencia de hormonas sexuales masculinas durante la gestación. En este sentido, se reportó que la exposición hormonal prenatal y un aumento de la testosterona fetal son fundamentales para la diferenciación sexual y la masculinización en humanos (Welsh, Suzuki, and Yamada 2014), y que la exposición prenatal a niveles excesivos de testosterona puede estar relacionada con el desarrollo de rasgos autistas (Auyeung et al. 2009; Baron-Cohen et al. 2020). Sin embargo, esta teoría y los trabajos que la sostienen son fuertemente criticados. Por ejemplo, los estudios mencionados miden las hormonas en el líquido amniótico, sin un buen control de que las hormonas efectivamente provengan del feto.

Otra hipótesis que explicaría la vulnerabilidad en varones es que los genes de riesgo para TEA están regulados de manera diferente entre sexos o bien, que estos genes interactúen con vías diferentes en los distintos sexos. En este sentido, no se encontró evidencia de que exista una expresión diferencial sistemática debida al sexo en los genes de riesgo de TEA, pero sí se observó que los genes de las vías moleculares y/o procesos celulares que interactúan con los genes de riesgo de autismo se expresan de manera diferencial según el sexo (Werling, Parikshak, and Geschwind 2016). Además, los genes identificados en dicho estudio participan en gran medida en la activación de astrocitos y microglia. Esto sugiere que no existe una expresión diferencial por sexo de los genes de riesgo de TEA, sino que más bien las vías dimórficas sexuales, que pueden incluir interacciones neuronales-gliales, son las que modulan el impacto de las variantes de riesgo y contribuyen a la prevalencia sesgada por sexo en los TEA.

Por último, otro enfoque para estudiar la vulnerabilidad en varones es el proceso de masculinización del cerebro, cuyas vías convergen con procesos inflamatorios y aumenta la vulnerabilidad en varones a presentar TEA (McCarthy and Wright 2017). Durante el desarrollo, los varones están expuestos a altos niveles de testosterona y, por ende, a su producto de aromatización, el estradiol (McCarthy, 2008). Esta molécula modula la neurogénesis, la



sinaptogénesis y la diferenciación celular al inducir o reprimir la expresión de genes asociados con la excitación/inhibición y con reguladores de la transcripción (McCarthy et al., 2009). Además, se ha observado que el proceso de masculinización en roedores está mediado por moléculas de señalización, como las prostaglandinas, que a su vez derivan de células inmunes innatas como la microglía y los astrocitos (Dean, Wright, et al. 2012; Lenz et al. 2013; Nelson and Lenz 2017). Teniendo en cuenta, como se mencionó previamente, que la inflamación durante el embarazo en humanos es un factor de riesgo para el desarrollo del TEA (Jiang et al. 2016), estas observaciones combinadas llevan a proponer que el proceso natural de masculinización del cerebro pone en riesgo a los varones al acercarlos a un umbral de vulnerabilidad que puede ser superado más fácilmente debido a procesos inflamatorios que tengan lugar durante los períodos críticos del desarrollo del cerebro.

#### *1.4.2. Resiliencia al TEA en hembras*

Respecto a las causas de la resiliencia de las hembras al TEA, se apunta principalmente a que las mujeres tienen una mayor carga de mutación genética antes de sucumbir al TEA. En este sentido, se observó que las mujeres con autismo presentaban mutaciones del tipo variantes en el número de copias (CNV) y variantes de nucleótido único (SNV) autosómicas con una carga mucho mayor que los varones con autismo (Jacquemont et al. 2014). En la misma línea, otro trabajo comparó los rasgos autistas en gemelos varones y mujeres con autismo. Los rasgos autistas fueron medidos mediante los cuestionarios CAST (del inglés *Childhood Autism Spectrum Test*) y A-TAC (del inglés *Autism-Tics, ADHD and other Comorbidities*) que devuelven un puntaje que va desde cero o unos pocos comportamientos similares al autismo hasta un número mayor, por encima del puntaje que obtiene el promedio de la población, asociado con los individuos diagnosticados clínicamente con TEA. En dicho trabajo observaron que las gemelas con TEA presentaban significativamente más rasgos autistas que los gemelos con TEA (Robinson et al. 2013), lo cual da sustento a la hipótesis del efecto protector femenino que predice que las mujeres con autismo deberían tener puntajes más altos de rasgos autistas que los varones con el mismo grado de deficiencia.

#### *1.4.3. Sesgo en el diagnóstico de autismo entre niños y niñas*

Es posible también que la alta proporción de TEA en varones se deba, en parte, al sesgo en los criterios de diagnóstico utilizados actualmente, o a que la forma en que estos criterios se aplican para reconocer los TEA en la clínica sean diferentes en niños que en niñas. Asimismo, dado que se reportan muchos más niños que niñas con autismo, muchos estudios se basan en este sesgo para incluir a sus participantes, por lo que la comprensión del autismo puede haber

estado sustancialmente sesgada hacia los niños (Lai et al. 2015). De hecho, la mayoría de los estudios de autismo tienden a incluir participantes en función de esta proporción, u optan por incluir sólo a varones (Philip et al. 2012; Via et al. 2011).

Un aspecto de este sesgo que merece ser evaluado es cuán diferente es el fenotipo entre niños y niñas con autismo. En un estudio respondieron esta pregunta comparando niñas y niños que cumplían con los criterios de diagnóstico de TEA con aquellos que no los cumplían a pesar de tener puntuaciones muy altas en la prueba CAST del espectro autista infantil (Dworzynski et al. 2012). CAST es un cuestionario para padres para detectar condiciones del espectro autista en sus hijos, que cuando arroja como resultado un puntaje mayor a 15 se considera que el niño tiene autismo (Williams et al. 2005). Encontraron que las niñas, pero no los niños, que cumplieron con los criterios de diagnóstico para TEA mostraron significativamente más problemas adicionales (bajo nivel intelectual, dificultades de comportamiento) que las niñas con puntajes CAST altos que no cumplieron con los criterios de diagnóstico para TEA (Dworzynski et al. 2012). Los resultados de esta comparación sugieren que, en ausencia de problemas intelectuales o conductuales adicionales, las niñas tienen menos probabilidad que los niños de cumplir con los criterios de diagnóstico de TEA en niveles equivalentemente altos de rasgos de tipo autista. Esto podría reflejar un sesgo de género en el diagnóstico o una adaptación/compensación genuinamente mejor de las niñas.

Una de las posibles causas de la diferencia entre fenotipos es la hipótesis de camuflaje social de las niñas. El camuflaje se refiere al uso de estrategias conscientes o inconscientes, que pueden aprenderse explícitamente o desarrollarse implícitamente, para minimizar la aparición de características autistas durante un entorno social (Hull, Petrides, and Mandy 2020). En un trabajo examinaron hasta qué punto los comportamientos sociales relacionados con el género ayudan a las niñas con TEA a enmascarar sus síntomas, para lo que analizaron cómo se comportan los niños y niñas durante el recreo mediante un sistema de codificación de comportamiento (POPE, por sus siglas en inglés *Playground Observation of Peer Engagement*) que genera datos cuantitativos y cualitativos y es útil para el estudio de la conducta en patios (Dean, Harwood, and Kasari 2017). Los resultados indicaron que el paisaje social femenino apoya la hipótesis del camuflaje: Las niñas con TEA utilizaron conductas compensatorias para ganar acceso a las actividades de sus pares, como permanecer cerca o imitar comportamientos, lo que favorecía el enmascaramiento de sus limitaciones sociales. Por el contrario, los niños con TEA tendían a jugar solos en vez de incorporarse a jugar juegos en grupo. Estos resultados resaltan un sesgo masculino en la percepción y detección del TEA. Si los profesionales (personal del

colegio) buscan a los niños que prefieren el aislamiento social para identificar casos de autismo, entonces las niñas con TEA seguirán sin identificarse.

Por último, otro trabajo reportó que los criterios que definen los perfiles de síntomas de TEA eran muy similares en niños y niñas (Solomon et al. 2012). Sin embargo, las niñas con TEA diferían marcadamente de las niñas neurotípicas en síntomas que no se utilizaron como base para el diagnóstico, como alteraciones en el lenguaje y habilidades sociales, lo que indica que estos síntomas sí deberían ser tomados en cuenta. También observaron diferencias con respecto a la internalización de la psicopatología, ya que las niñas adolescentes con TEA evidenciaron síntomas significativos de internalización en comparación con los niños con TEA y las niñas sin TEA.

## 1.5. Masculinización del cerebro

### *1.5.1. Determinación del sexo versus diferenciación sexual*

Antes de comenzar a desarrollar esta sección es importante discutir la diferencia entre sexo y género. El sexo es la clasificación de los organismos de acuerdo a sus órganos reproductivos, los que a su vez son determinados en mamíferos por el complemento cromosomal. Por otro lado, el género es la autorrepresentación de una persona como varón, mujer u otro, y cómo las instituciones sociales responden a esa persona. Así, el género está determinado por el entorno y la experiencia mientras que el sexo no (McCarthy, 2008). En esta tesis, nos referiremos al sexo de los animales y a su efecto, ya que se ha trabajado en modelos animales no humanos en los cuales el concepto de género no debe utilizarse.

En los mamíferos, la determinación del sexo está dada por el complemento cromosómico, donde los machos presentan un cromosoma X y un cromosoma Y, mientras que las hembras presentan dos cromosomas X. Luego, los machos presentan un gen clave en el cromosoma Y que es el gen Sry. Este gen comienza a expresarse durante las primeras semanas del desarrollo embrionario y con este evento el sexo del organismo es determinado, ya que las gónadas se diferenciarán en testículos. En el caso de las hembras, que no presentan el gen Sry, las gónadas se diferenciará en ovarios (McCarthy, 2008).

Una vez que se establece el sexo gonadal, se diferenciará el tracto urogenital apropiado. En machos, el sistema de conductos de Wolff sobrevivirá y se convertirá en el conducto deferente y en las glándulas secretoras asociadas del sistema reproductor masculino, mientras que se suprimirá activamente la formación del sistema reproductor femenino. Por el contrario,

si las gónadas se diferencian a ovarios, el sistema masculino degenerará debido a la insuficiencia de andrógenos y el sistema de conductos de Müller se convertirá en el tracto reproductivo femenino (McCarthy, 2008). Luego, la diferenciación de los genitales externos y las características sexuales secundarias se establecen progresivamente debido a la síntesis de esteroides gonadales en el momento adecuado de la vida.

#### *1.5.2. Diferencias sexuales en el cerebro*

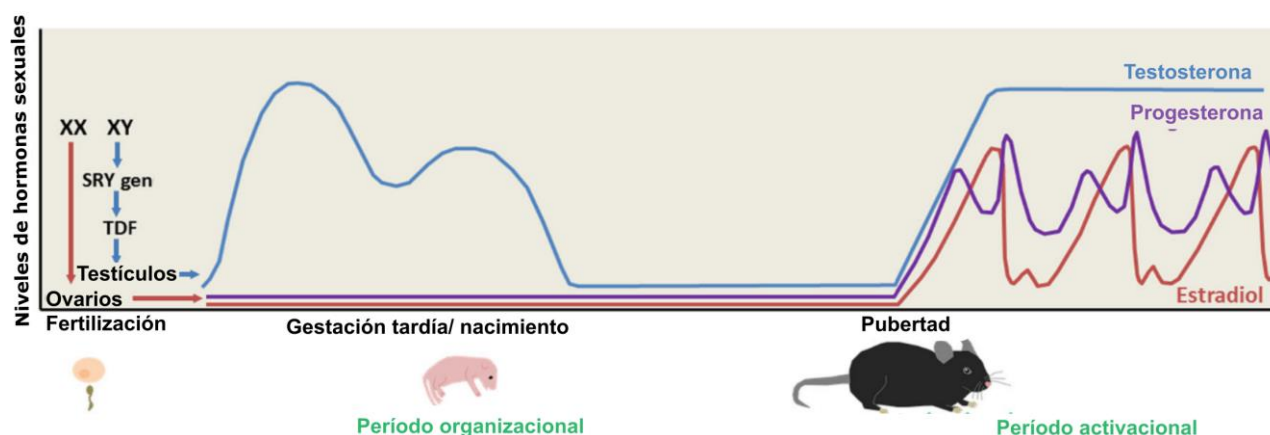
La diferenciación sexual es un proceso que impacta en los comportamientos reproductivos y en la fisiología, así como también en procesos no reproductivos vía distintos mecanismos en diferentes áreas del cerebro. Las diferencias sexuales en el cerebro están muy extendidas y varían mucho en magnitud e impacto dependiendo de la región del cerebro y el punto final funcional que se modula. La mayoría de las diferencias sexuales en el cerebro se establecen permanentemente durante una ventana de desarrollo restringida por las acciones de los esteroides gonadales en un sustrato bipotencial. Las diferencias sexuales del cerebro más robustas son las que subyacen a los comportamientos sexuales, sin embargo también se han reportado diferencias sexuales en cognición, estrés, ansiedad, preferencia de comida, locomoción, entre otras [revisado en (McCarthy, 2008)].

La principal causa de las diferencias sexuales observadas en el cerebro es la masculinización del cerebro que sufren los machos durante el desarrollo temprano. La masculinización del cerebro es el proceso por el cual los machos, que son expuestos a hormonas gonadales durante el período perinatal, muestran en la adultez comportamientos sexuales masculinos como montar a la hembra receptiva o defender la territorialidad (McCarthy, 2008).

#### *1.5.3. Teoría organizacional/activacional*

Se ha descripto que esta masculinización responde a un proceso organizacional de circuitos neuronales claves durante el período perinatal, seguido de una activación específica de dichos circuitos en la adultez, fenómeno conocido como la teoría organizacional/activacional de las conductas sexuales (Phoenix et al. 1959). Esta teoría sostiene que los esteroides gonadales actúan durante un período sensible perinatal para alterar permanentemente la arquitectura neural del cerebro y, por lo tanto, restringir el perfil de respuesta del cerebro adulto cuando se expone a una hormona en particular (Figura 1.1.). De esta manera, la testosterona gonadal en machos, durante el período que se designa como organizacional, es clave para la masculinización permanente del cerebro y el cuerpo. Luego, a partir de la pubertad, las hormonas sexuales

aumentan durante el período de activación (pubertad) para ejercer efectos más transitorios activando los circuitos que fueron organizados durante el período perinatal.



**Figura 1.1: Teoría organizacional/activacional de los comportamientos sexuales.** Se observa la oleada de testosterona a la que son expuestos los machos durante el período perinatal (período organizacional). Luego, a partir de la pubertad, las hembras tienen pulsos de hormonas sexuales, principalmente de progesterona y estradiol, mientras que los machos presentan niveles de testosterona relativamente constantes. Esta etapa luego de la maduración sexual se considera el período activacional. Adaptada de (Ferri et al. 2018).

#### 1.5.4. Mecanismos de la masculinización del cerebro

En uno de los primeros estudios de la teoría activacional/organizacional en roedores, la testosterona era administrada a hembras recién nacidas para masculinizarlas. En estos estudios inyectaban estradiol como un control de la inyección de esteroides y, sorprendentemente, encontraron que el estradiol era incluso más efectivo que la testosterona para masculinizar el comportamiento (Feder 1967). Luego, en otro trabajo, se reportó que los machos tratados prenatalmente con un inhibidor de la aromatización de esteroides sexuales (la 1,4,6-androstatriene-3,17-diona) exhibía mayor comportamiento de lordosis y comportamientos proceptivos (conjunto de comportamientos exhibidos por la hembra previos a la aceptación de la cópula) que los animales control (Gladue and Clemens 1980). De estos experimentos es que surge la hipótesis de que la aromatización de la testosterona a estradiol es necesaria, junto con la testosterona, para masculinizar distintas áreas del cerebro. La enzima responsable de dicha aromatización es la aromatasa citocromo P450, producto del gen *CYP19*, que fue detectada por primera vez en el hipotálamo de rata en 1972 (Naftolin, Ryan, and Petro 1972). La aromatasa es una enzima clave en el desarrollo del cerebro y su regulación determina la disponibilidad de estradiol. Cabe destacar que las neuronas que se desarrollan en el cerebro embrionario masculino contienen una mayor actividad aromatasa que el cerebro femenino. Esta diferencia

entre sexos existe en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Hutchison et al. 1995). Así, tanto el estradiol como la testosterona son necesarias para masculinizar las distintas áreas del cerebro, por lo que la masculinización del cerebro involucra tanto la activación de receptores de andrógenos (Sato et al. 2004) como la activación de receptores de estrógenos (Wu et al. 2009).

Un factor para tener en cuenta es la noción de que la placenta produce altas cantidades de estradiol durante el embarazo, lo que llevaría a que todos los fetos estuvieran expuestos a esta hormona, impidiendo una exposición diferencial a estradiol de acuerdo con el sexo. Esto no ocurre debido a la presencia de  $\alpha$ -fetoproteína, una globulina circulante que se encuentra en los fetos de gestación tardía y en las crías postnatales tempranas que tiene una alta afinidad por el estradiol y, por lo tanto, secuestra el esteroide del torrente sanguíneo, impidiendo la masculinización del cerebro (Bakker et al. 2006).

La masculinización del cerebro perinatal requiere de la función de los receptores de andrógenos, y la expresión de comportamientos típicos masculinos en adultos está mediada por señales de andrógenos tanto dependientes como independientes de los receptores de andrógenos (Sato et al. 2004). El receptor de andrógeno (AR) es un receptor nuclear que cuando se une a un ligando, sufre un cambio conformacional y fosforilación que le permite interactuar con elementos específicos de respuesta a andrógenos (ARE, *androgen-response elements*) en las regiones reguladoras de genes blanco, lo que da como resultado la regulación de la expresión génica (Brinkmann et al. 1999). No obstante, también se ha descrito otro mecanismo que explica cómo el andrógeno puede afectar de forma más rápida la función celular, independientemente de la transcripción [revisado en (Sarkey et al. 2008)]. Este mecanismo está mediado por receptores de andrógenos extranucleares ubicados en axones en la corteza cerebral y la amígdala, provenientes del hipocampo. Estos receptores axonales de andrógenos modulan la actividad neuronal del hipocampo, la corteza cerebral y la amígdala, y participan en la modulación de la plasticidad sináptica y de la conducta (Sarkey et al. 2008).

Por otro lado, hay distintos tipos de mecanismos a través de los cuales el estradiol actúa en las células blanco [revisado en (McCarthy, 2008)]: 1) activación “clásica” del receptor de estrógenos (ER), por unión al mismo, dimerización y translocación al núcleo, donde se asocia con coactivadores y otras moléculas reguladoras de la transcripción; 2) activación “nouveau”, mediante la cual el complejo ER-estradiol interactúa directamente con vías intracelulares de señalización como la activación de las quinasas de proteínas; o 3) se ha reportado también que el estradiol interactúa con otros receptores de membrana, tales como los receptores de neurotransmisores. A través de estos receptores, el estradiol afecta el desarrollo neuronal en

diferentes áreas, a través de distintos mecanismos como son la apoptosis celular, el crecimiento de neuritas y la regulación del patrón sináptico. Como consecuencia de estos procesos, se observan dimorfismos entre sexos en distintas áreas que subyacen a las diferencias entre sexos observadas en el comportamiento [revisado en (Schwarz and McCarthy 2008)].

Tres de las áreas que presentan mayor divergencia morfológica entre sexos son el núcleo dimórfico sexual, el núcleo hipotalámico antero-ventral periventricular, y el núcleo arcuato. El núcleo dimórfico sexual (SDN, por su sigla en inglés) de ratas, que se encuentra en el área preóptica media y es un centro integrador para la regulación de la expresión del comportamiento sexual masculino, presenta la particularidad de que en machos es mucho más grande que en hembras. Al comienzo, en el desarrollo postnatal, en el día postnatal (P) 3, las hembras y los machos presentan la misma cantidad de células, pero alrededor del P7 las células comienzan a morir en las hembras, por lo que en el P10 ya presentan un núcleo mucho menor en tamaño que el de los machos [revisado en (McCarthy, 2008)]. Si las hembras son tratadas con estradiol durante ese período, las células de este núcleo no mueren y presentarán un núcleo de igual tamaño que el de los machos (Rhees, Shryne, and Gorski 1990). También, el SDN en machos presenta más espinas dendríticas que en hembras, y esta diferencia también está mediada por estradiol, ya que se observó que la administración de estradiol exógeno a hembras durante el período neonatal induce un patrón masculino de espinas y lleva a que exhiban un comportamiento sexual masculino cuando llegan a la adultez (Amateau and McCarthy 2004).

Por otro lado, el núcleo antero-ventral periventricular (AVPV) es mucho más grande en hembras que en machos, y este dimorfismo se encuentra tanto en ratones como en ratas. Su función en hembras es crítica, ya que controla la oleada de secreción de gonadotrofinas requerida para la ovulación. Principalmente está formado por neuronas dopaminérgicas y la supervivencia de las mismas es socavada por la presencia de estradiol (Simerly et al. 1997).

Se demostró previamente que el estradiol también modula el crecimiento de las espinas dendríticas, por ejemplo, en el núcleo arcuato. Este núcleo está ubicado en el hipotálamo dorsomedial y comprende neuronas que liberan las hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH) a la eminencia media, responsables de estimular a los gonadotropos en la hipófisis a liberar las hormonas luteinizante (LH) y folículo-estimulante (FSH) que actúan en las gónadas [revisado en (Schwarz and McCarthy 2008)]. El núcleo arcuato masculino presenta la mitad de espinas dendríticas en las neuronas que el de las hembras (Matsumoto and Arai 1986). Esta diferencia de sexo depende de la cantidad elevada de estradiol en el cerebro de machos durante el período sensible perinatal. Por otro lado, en machos, los astrocitos del núcleo arcuato son más estrellados y con más procesos que los de las hembras. Esto se debe a que el estradiol

aumenta la síntesis del neurotransmisor inhibitor GABA por las neuronas, que luego actúa sobre los astrocitos vecinos para inducir la ramificación de estos (Mong et al., 2002). Se especula que el aumento de la complejidad de los astrocitos en los machos suprime la formación de sinapsis en las espinas dendríticas, pero actualmente se desconoce el mecanismo por el cual se logra.

#### 1.6. Convergencia de las diferencias sexuales y el sistema inmune en el TEA

Como se mencionó previamente, si bien se han reportado cientos de genes como factores de riesgo para el TEA, no hay un sesgo claro de sexo en los genes identificados (De Rubeis et al. 2014), indicando que los machos no presentan mayor riesgo a presentar autismo debido a una única fuente genética. En cambio, como también se mencionó previamente, se ha reportado que los genes de riesgo para TEA son regulados por vías dimórficas sexuales (Werling et al., 2016). De manera interesante, en este grupo se encuentran representados en gran medida genes involucrados en la activación de astrocitos y microglía. Asimismo, se ha reportado que el ingreso hospitalario debido a una infección viral materna en el primer trimestre o a una infección bacteriana materna en el segundo trimestre se asocian con el diagnóstico de TEA en la descendencia (Atladóttir et al. 2010).

Por otro lado, se observó que hay mediadores inflamatorios claves que regulan el desarrollo del cerebro masculino (Dean, Knutson, et al. 2012; Dean, Wright, et al. 2012; Lenz et al. 2013, 2018, 2019), como por ejemplo la prostaglandina E2 (PGE2) (Dean, Wright, et al. 2012; Lenz et al. 2013; McCarthy and Wright 2017; Todd, Schwarz, and McCarthy 2005; Wright, Burks, and McCarthy 2008). Las prostaglandinas son compuestos derivados de lípidos de membrana que funcionan como moléculas de señalización paracrinas, endocrinas e incluso autocrinas como parte de una amplia variedad de funciones fisiológicas. Son formadas a partir del ácido araquidónico mediante el acoplamiento secuencial de las ciclooxygenasas (COX), COX-1 y COX-2, a las prostaglandina sintetas (Rouzer and Marnett 2009). La PGE2 es el determinante clave de la fiebre y se eleva precipitadamente e inmediatamente en el hipotálamo tras la infección para iniciar la respuesta febril (Ivanov and Romanovsky 2004). Se demostró previamente que la interrupción de la síntesis de prostaglandinas con inhibidores de las ciclooxygenasas durante un período crítico postnatal temprano altera el desarrollo de las células de Purkinje del cerebelo en ratas, lo que da como resultado un crecimiento dendrítico inicialmente mayor en ambos sexos (Dean, Knutson, et al. 2012). En dicho trabajo además mostraron que la inhibición de las COX da como resultado una atrofia cerebelar tardía y el comportamiento social alterado sólo en machos. Por otro lado, también se reportó que el aumento en la PGE2, resultante de los cambios en la



regulación de la COX-2 inducida por la exposición perinatal al estradiol, es necesario y suficiente para organizar el área preóptica (POA) que media el comportamiento sexual masculino (Amateau and McCarthy 2004). Se reportó que la inhibición microglial impide la regulación positiva de PGE2 inducida por estradiol, lo que indica que la microglia es esencial para el proceso de retroalimentación a través del cual el estradiol regula positivamente la producción de prostaglandinas (Lenz et al. 2013). Estos estudios demuestran que las células inmunes del cerebro interactúan con el sistema nervioso y endocrino durante el desarrollo y son cruciales para la diferenciación sexual del cerebro y el comportamiento.

Las imágenes *in vivo* de adultos con TEA revelan una activación glial excesiva en múltiples regiones del cerebro (Suzuki et al., 2013; Vargas et al., 2005), y los análisis transcriptómicos encuentran una desregulación en genes neuroinmunes de los individuos con autismo (Gupta et al., 2014). La evidencia convergente de los estudios clínicos y preclínicos señala así que el sistema neuroinmune es fundamental para el desarrollo normal del cerebro masculino y el riesgo de TEA.

#### 1.7. Modelos animales de TEA

La definición clásica de un modelo animal de una enfermedad humana es “un organismo vivo en el cual un proceso patológico heredado, adquirido naturalmente o inducido se parece en uno o varios aspectos al mismo fenómeno que tiene lugar en los seres humanos” (Wessler 1976). Para validar un modelo animal se utilizan tres criterios [revisado en (Chadman et al., 2009)]:

1) **validez de construcción:** incorpora una analogía conceptual respecto a la causa de la enfermedad humana. Ratones mutantes con una mutación en un gen implicado en un desorden neuropsiquiátrico presentan una validez de construcción razonable debido a la inactivación o polimorfismo de un gen humano.

2) **validez de apariencia:** incorpora una analogía conceptual respecto a los síntomas de la enfermedad humana en el modelo animal. Síntomas comportamentales, patologías neuroanatómicas, respuestas neurofisiológicas y anormalidades neuroquímicas son ejemplos de los componentes de la enfermedad o *endofenotipos* que pueden ser modelados en animales. Los endofenotipos son marcadores neurofisiológicos únicos comportamentales, anatómicos, bioquímicos y neurofisiológicos para una enfermedad dada.

3) **validez predictiva:** incorpora a los modelos animales la especificidad de la respuesta al tratamiento que resulta efectivo en la enfermedad humana.

Los objetivos principales de los modelos animales son evaluar hipótesis acerca de los mecanismos que subyacen a la enfermedad y llevar a cabo una evaluación para extrapolar los tratamientos farmacológicos y comportamentales de la enfermedad. El modelo va a ser más robusto cuantas más similitudes de construcción, apariencia y predictiva haya entre el modelo animal y la enfermedad en el humano.

Dado que el diagnóstico del TEA es comportamental, las investigaciones que emplean modelos de ratón requieren que los animales presenten un repertorio de comportamientos amplio como para evaluar cada uno de los endofenotipos del autismo (Crawley 2012). Afortunadamente, los ratones son una especie muy sociable que muestran un amplio repertorio en distintos comportamientos sociales como la aproximación a un conespecífico desconocido, comportamientos de agresión, vocalizaciones ultrasónicas, comportamiento sexual y parental, y territorialidad (Crawley 2012). Por otro lado, los ratones en desarrollo se involucran en episodios frecuentes y prolongados de comportamiento amistoso y juguetón, que representan un componente clave de su repertorio de comportamiento natural (Terranova and Laviola 2005).

#### *1.7.1. Modelos genéticos de autismo*

Avances recientes en genética y genómica han develado que muchos casos de autismo están relacionados con variantes genéticas raras, donde cada variación está asociada a un riesgo relativamente alto de causar autismo y, en conjunto, estas variaciones explican una amplia proporción de los casos de TEA (Betancur, Sakurai, and Buxbaum 2009). Resulta interesante que muchas de estas variantes están relacionadas a vías moleculares de adhesión sináptica. Particularmente, se han identificado mutaciones en NEUREXIN1, NEUROLIGIN3, NEUROLIGIN4, SHANK2, SHANK3, and CNTNAP2 en individuos con autismo. Estas proteínas son glicoproteínas de adhesión a la superficie celular y forman parte del mecanismo primario a través del cual se elaboran las conexiones de los axones y las dendritas en las sinapsis neuronales (Betancur et al. 2009).

Para analizar el papel de cada una de estas anomalías genéticas en la etiología y sintomatología del TEA, se han generado mutaciones genéticas homólogas en animales de experimentación, particularmente en ratones. Algunos de los modelos más importantes en el campo son:

Ratón knockout de Shank3: Existen 5 líneas mutantes para Shank3 y, de acuerdo al sitio en el que se inserta la mutación, se observan distintos fenotipos [revisado en (Crawley, 2012)]. Por ejemplo, insertando la mutación en el sitio de unión *Homer* se observó una mayor interacción social, principalmente en forma de agresión, mientras que mutaciones en el dominio PDZ generaron un fenotipo más severo, incluyendo un auto-acicalamiento exacerbado, sociabilidad alterada y una reducción en la transmisión excitatoria córtico-estriatal (Peça et al. 2011).

Síndrome de Frágil X: este síndrome es causada por la mutación del gen *FMR1*, presente en el cromosoma X. El aumento de repeticiones del triplete CGG (>200) silencian el gen *FMR1*, causando la deficiencia de la proteína FMR1P. Esta proteína normalmente se encuentra expresada en el cerebro e inhibe la síntesis de un gran número de proteínas. Aproximadamente el 30% de los individuos que presentan el síndrome de Frágil X cumplen con el criterio de diagnóstico para TEA y, además, muchas de los problemas en la desregulación celular que se observan en individuos con más de 200 repeticiones CGG como en individuos con pre-mutación (menos de 200) son similares a las alteraciones celulares que han sido documentadas en casos de autismo que no presentan la mutación de frágil X, por ejemplo, la desregulación de los receptores de glutamato (Hagerman, Hoem, and Hagerman 2010). Se ha reportado que ratones con una mutación única en *FMR1* muestran alteraciones en la potenciación de largo plazo, comportamientos sociales alterados, y comportamientos relacionados a la ansiedad (Mineur, Huynh, and Crusio 2006). De esta manera, los ratones nulos para *FMR1* son un buen modelo para estudiar las vías convergentes entre el síndrome de frágil X y el autismo.

#### 1.7.2. Modelos ambientales de autismo

Dado que, como se mencionó previamente, la tasa de concordancia entre gemelos idénticos no es del 100%, también deben tenerse en cuenta las causas ambientales y epigenéticas del autismo en los modelos animales para este desorden. Entre los modelos ambientales de autismo más importantes, se destacan los inflamatorios y los farmacológicos.

**Modelos inflamatorios.** Como se mencionó previamente, se ha demostrado que el ingreso hospitalario debido a una infección viral materna en el primer trimestre o a una infección bacteriana materna en el segundo trimestre se asocian con el diagnóstico de TEA en la descendencia (Atladóttir et al. 2010). Teniendo esto en cuenta se desarrollaron modelos que se basan en la exposición prenatal a infecciones virales o bacterianas. Se observó que la infección respiratoria de ratonas preñadas (tanto las cepas BALB/c como C57BL/6) con el virus de la influenza humana produce descendencia que muestra respuestas conductuales alteradas en la

edad adulta, entre las que se presentaron alteraciones en los comportamientos sociales (Shi et al. 2003). En este mismo trabajo también se plantearon si las alteraciones observadas se debían a la infección viral del feto o a una reacción de la respuesta inmune materna. Para contestar esto, se propusieron evocar la respuesta inmune en la madre (MIA por sus siglas en inglés: *Maternal immune activation*), pero sin usar el virus sino inyectando un análogo sintético de la doble cadena de ARN, el ácido polyinosínico-polycitidílico, Poly(I:C). Los animales inyectados prenatalmente con Poly(I:C) presentaron los fenotipos más importantes del TEA como alteraciones en la sociabilidad, en la comunicación y comportamientos estereotipados o repetitivos [revisado en (Lammert and Lukens 2019)]. Entre estos trabajos, algunos protocolos consistieron en una inyección de Poly(I:C) en el día gestacional 9.5 y encontraron que los ratones tratados presentaron alteraciones en la sociabilidad (Shi et al. 2003). En otros trabajos, en las crías inyectadas prenatalmente en el día gestacional 12.5 con Poly(I:C) se observaron alteraciones en la sociabilidad (Smith et al. 2007), alteraciones en las vocalizaciones ultrasónicas a P8 y un aumento en los comportamientos repetitivos o estereotipados en los ensayos de enterramiento de canicas y de auto-acicalamiento (Hsiao et al. 2013; Malkova et al. 2012).

**Modelos farmacológicos.** Como se mencionó previamente, un factor de riesgo importante en el autismo es la exposición a fármacos en el período prenatal, entre ellos el VPA (Williams et al. 2001). En base a este análisis epidemiológico se desarrolló el modelo de VPA en roedores, que consiste en la exposición prenatal a VPA entre el día gestacional 11.5 al 13, previo al cierre del tubo neural (Rodier et al. 1997; Wagner et al. 2006). Este modelo ha sido ampliamente utilizado y validado (Nicolini and Fahnestock 2018), y se han reportado alteraciones que recapitulan los fenotipos observados en autismo, como disminución en la sociabilidad, presencia de comportamientos repetitivos y alteraciones en la comunicación (Lucchina and Depino 2014; Schneider and Przewłocki 2005). También se han reportado alteraciones en el modelo VPA en los comportamientos relacionados a la ansiedad y la depresión, que son patologías que muestran alta comorbilidad con el autismo (Campolongo et al. 2018). Si bien el mecanismo a través del cual actúa el VPA no se conoce con claridad, se apunta al rol que presenta el VPA como inhibidor de deacetilasas de histonas (Phiel et al. 2001), y de hecho se han observado efectos similares a la exposición prenatal a VPA cuando se utilizan inhibidores específicos de acetilasas como la tricostatina A (Kawanai et al. 2016).

Estos datos sugieren que el VPA es un buen modelo porque presenta validez de apariencia, ya que los ratones presentan alterados comportamientos relacionados al TEA, y también presenta validez de construcción debido a que los niños expuestos prenatalmente a VPA presentaron una incidencia aumentada de autismo. Por último, se reportó que los déficits

de sociabilidad después de la exposición prenatal al VPA son rescatados por el enriquecimiento social temprano en ratones (Campolongo et al. 2018), lo cual sugiere que el modelo VPA también presenta cierta validez predictiva.

#### 1.8. ¿Por qué incluir hembras en estudios con modelos experimentales?

En los últimos 30 años una serie de sucesos alertaron a la comunidad científica respecto al rol del sexo en ciencia y del género en medicina que venían siendo subestimados y desestimados. Un informe de la Oficina de control y fiscalización general de Estados Unidos (U.S. Government Accountability Office 2001) al gobierno de Estados Unidos en 2001 alertaba que, en los últimos años, 8 de cada 10 drogas que habían sido retiradas del mercado presentaban efectos adversos más comunes o más severos en mujeres que en hombres, o que los tratamientos presentaban malos resultados sólo en mujeres. Por ejemplo, el *Zolpidem*, un somnífero ampliamente utilizado, causaba mayor incidencia de accidentes de tránsito en mujeres porque no se realizaba un ajuste de dosis respecto al sexo. Por otro lado, también se está tomando consciencia de que los criterios de diagnóstico para distintas enfermedades y desórdenes no son los mismos para varones que para mujeres, y que esto lleva a un sesgo en el diagnóstico y en los tratamientos. Por ejemplo, como se mencionó más arriba, en el TEA se ha reportado un diferente fenotipo en varones que en mujeres (Giarelli et al. 2010).

Frente a estos antecedentes, el Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (NIH, por sus siglas en inglés) introdujo “un acto de revitalización” (Shepherd 1994), que requería la inclusión de mujeres en investigación clínica financiada por el NIH. Luego, en 2014 el NIH implementó una política (Clayton and Collins 2014) que requiere a los solicitantes reportar en sus proyectos un balance por sexo en estudios preclínicos, a menos que la exclusión de uno de los sexos esté rigurosamente justificada. En noviembre de 2017 anunciaron una enmienda [NOT-OD-18-014] a las Políticas y Pautas del NIH sobre la inclusión de mujeres y minorías como sujetos en la investigación clínica, estipulando que los resultados del análisis de subgrupos (incluidos el sexo o género del sujeto) debe reportarse a [clinic-trials.gov](http://clinicaltrials.gov).

Lamentablemente, estas nuevas políticas no fueron acompañadas por una revolución correspondiente en los diseños experimentales, el análisis de células o la investigación en animales. A pesar de la abundante evidencia de diferencias entre sexos en los efectos de drogas y en los comportamientos no sexuales en ratas y ratones, la mayoría de los investigadores continúan trabajando con animales macho exclusivamente (Hughes 2007). En un análisis de los artículos publicados entre febrero de 2005 y septiembre de 2006 en cinco revistas con alto impacto que abarcaban las áreas del estudio del comportamiento y la farmacología,

encontraron que más del 80% de los estudios fueron llevados a cabo en machos tanto en ratas como en ratones (Hughes 2007). Otro estudio evaluó el sesgo por sexo en 10 campos de la Biología y encontraron sesgo masculino en ocho disciplinas, donde la más extrema era la neurociencia, con estudios realizados en machos superando a los realizados en hembras en una proporción 5.5 a 1 (Beery and Zucker 2011).

Cabe destacar que los estudios llevados a cabo en cultivos celulares no son la excepción. El trasplante de células madre derivadas de musculatura regenera el músculo enfermo. Por años, los investigadores y las investigadoras se preguntaban respecto a la no predictibilidad de la respuesta generativa, a veces rápida, a veces muy lenta. En 2007, un grupo liderado por Johnny Huard pudo explicar esta variabilidad, demostrando que las células musculares tomadas de ratones hembra regeneraban mucho más rápido que las que eran tomadas de ratones macho (Pollitzer 2013).

Respecto al sesgo reportado en neurociencias, se observó que incluso cuando el sexo es informado, esto no se hace claramente hasta el final en los resultados, o a veces está disponible sólo en las figuras suplementarias (Beery 2018). Es notorio que el sesgo existente en los trabajos con animales no refleja la diferencia de tendencia entre hombres y mujeres a padecer desórdenes o enfermedades. Así, el porcentaje de mujeres diagnosticadas con determinada enfermedad excede al porcentaje de sujetos hembras no humanas en estudios de esa condición. Por último, vale mencionar que los estudios conducidos por autoras mujeres correlacionan positivamente con la inclusión de ambos sexos en los diseños experimentales y con el análisis por género/sexo (Beery 2018).

Los argumentos más recurrentes en contra de la inclusión de hembras en modelos experimentales son los que se detallan abajo. A continuación, discutiré por qué estos argumentos están equivocados:

1. Argumento: “Las hembras son más variables debido, en gran parte, al ciclo estral”.  
Respuesta: En un meta-análisis de 293 artículos donde analizan los rasgos conductuales, morfológicos, fisiológicos y moleculares en ratones machos y hembras, sin tener en cuenta la etapa del ciclo estral, encontraron que la variabilidad no fue significativamente mayor en las hembras que en los machos (Prendergast, Onishi, and Zucker 2014). Reportaron además que la forma en que los animales son alojados aporta mucho más a la variabilidad que el sexo de los individuos.

2. Argumento: “La inclusión de hembras puede conducir a una sobreestimación de las diferencias de sexo / género humano, especialmente en el cerebro y el comportamiento”.

Respuesta: Por el contrario, en algunos casos, pequeñas diferencias fenotípicas provienen de diferencias fundamentales en los mecanismos subyacentes. Se han documentado múltiples diferencias de sexo en las vías subyacentes de los comportamientos sociales en machos y hembras, incluso cuando los machos y las hembras exhiben comportamientos similares como es el caso del cuidado de las crías en los topillos de la pradera (De Vries 2004).

3. Argumento: “La inclusión de hembras en los experimentos disminuye el poder estadístico debido a la mayor dispersión de los datos y a los tamaños submuestrales más pequeños de cada sexo”. Respuesta: Los diseños factoriales pueden evaluar los principales efectos del tratamiento y el sexo con la misma potencia que los ensayos pareados, sin necesidad de aumentar el tamaño de la muestra (Beery 2018).

# Hipótesis y objetivos



En base a los antecedentes expuestos, se plantearon las siguientes **hipótesis de trabajo**:

- El período comprendido entre P21 y P35 es crítico para determinar los niveles de sociabilidad adultos, y las experiencias como la manipulación juvenil durante este período modulan el desarrollo conductual a largo plazo.
- Existen diferencias sexuales en los comportamientos relevantes al autismo y estas diferencias son determinadas por el proceso de masculinización del cerebro.
- La masculinización del cerebro es necesaria para que la exposición prenatal al VPA afecte los comportamientos relacionados con el autismo, las alteraciones neuronales y la gliosis.

El **objetivo general** de esta tesis consiste en identificar mecanismos neurofisiológicos que actúan en el cerebro postnatal y contribuyen a determinar los niveles de sociabilidad en ratones adultos machos y hembras. A su vez, los **objetivos específicos** propuestos en esta tesis son:

- Evaluar los efectos de la manipulación juvenil sobre las alteraciones conductuales y fisiológicas provocadas por la administración prenatal de VPA en machos.
- Estudiar las diferencias sexuales en los comportamientos relevantes para el autismo y evaluar el rol de la masculinización del cerebro en estos comportamientos a través de un modelo de exposición neonatal a estradiol en hembras.
- Estudiar los efectos de la exposición postnatal a estradiol en ratones hembra que fueron expuestas a VPA en el día de gestación 12.5.

## 2. Materiales y métodos

## 2.1. Animales

Para realizar todos los experimentos incluidos en esta tesis, se usaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa exocriada CrlFcen:CF1 que se obtuvieron del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Todos los animales fueron criados en el Bioterio Central de la FCEN y fueron sometidos a un régimen de 12:12 horas de luz:oscuridad (comienzo de la etapa lumínica a las 6.00 a.m.) y a una temperatura de 20-22°C. Las medidas de las jaulas de residencia fueron 18 cm de ancho x 29 cm de largo x 12 cm de alto. Todos los animales disponían de comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo con 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 (Protocolos CICUAL Nro. 128 y 128b).

## 2.2. Apareo

Se utilizaron animales adultos de 8 semanas de edad. Previo al comienzo del apareo, se habituaron a la sala los machos, en jaulas individuales, y las hembras, en jaulas de a cuatro, durante una semana. El primer día de apareo, entre las 14 y 15hs, se colocaron dos hembras núlparas junto a un macho en la jaula donde éste fue habitado. Durante los siguientes cuatro días se chequeó la presencia/ausencia de tampón vaginal de semen, a las 9 am. El día en que se observó tapón vaginal fue considerado como el día gestacional (DG) 0.5, y en ese caso, cada hembra fue devuelta a su jaula original. Luego de cinco días, todas las hembras, independientemente se les haya observado tapón vaginal o no, fueron devueltas a su jaula.

## 2.3. Tratamiento prenatal

Se utilizó un protocolo modificado de Lucchina and Depino, 2014. En el DG 12.5 se asignó aleatoriamente el tratamiento a cada hembra y fueron inyectadas de manera subcutánea con 600 mg/kg de ácido valproico (VPA) en solución salina (VPA; Sigma, St. Louis, MO, USA). Las hembras control fueron inyectadas con vehículo (SAL, NaCl 0.9%). Luego de las inyecciones, las hembras fueron alojadas en jaulas individuales hasta el nacimiento de sus crías.

## 2.4. Nacimiento y destete

El día de nacimiento, después de aproximadamente 18-20 días de gestación, fue considerado como el día postnatal (P) 0. Se usaron solamente camadas entre 5 y 10 crías. Si el tamaño de la camada era mayor a 10 crías, las crías excedentes fueron sacrificadas en P1 o P2 para evitar efectos del tamaño de la camada. No se cambió la viruta de las jaulas hasta luego de una semana que las hembras hubieran parido para no alterar el nido. En P21 las crías fueron destetadas y se armaron jaulas por tratamiento. En cada jaula se colocaron 4-5 ratones macho o 5-6 ratonas hembras. De esta manera, en todos los experimentos, el tratamiento prenatal de todos los animales de cada jaula correspondía a VPA o SAL.

## 2.5. Tratamiento postnatal

### 2.5.1. Manipulación postnatal

Para este experimento, se utilizaron ratones machos, ya que se observó previamente que la administración prenatal de VPA produce alteraciones en la sociabilidad solamente en machos (Kazlauskas et al. 2019). En P21, todos los animales fueron destetados en jaulas que contenían de tres a cinco animales correspondientes al mismo tratamiento prenatal y se asignó, aleatoriamente, el tratamiento postnatal a las jaulas: manipulación juvenil (MJ) y control (CT). De esta manera, todos los animales fueron destetados en jaulas que contenían el mismo tratamiento pre y postnatal, y el diseño involucró cuatro grupos experimentales: SAL-CT, SAL-MJ, VPA-CT and VPA-MJ. Las sesiones de manipulación fueron llevadas a cabo desde P22 hasta P34 y día de por medio, por lo que cada animal experimentó 7 sesiones de manipulación durante este período. El protocolo que utilizamos fue tomado de Todeschin et al., 2009: En cada sesión, cada animal fue manipulado utilizando guantes de látex, durante 3 minutos, usando ambas manos.

### 2.5.2. Estradiol

Para imitar la exposición a hormonas gonadales de machos en hembras, se llevó a cabo el protocolo de masculinización descrito en Villa et al., 2018. En cada camada se eligieron aleatoriamente entre dos y cuatro hembras para cada tratamiento. Los animales fueron inyectados de forma subcutánea (s.c.) en P2, P5 y P8 con 5 µg de 17β-estradiol benzoato (E2) (Sigma, St. Louis, MO, USA), disuelto en 50 µl de aceite de sésamo (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los animales control (OIL) fueron inyectados con 50 µl de aceite de sésamo. Como fueron inyecciones previas al destete, para diferenciar el tratamiento se marcaron las crías con un

marcador indeleble en las extremidades. A partir de P8-9, cuando se observó la presencia de pelo, las crías fueron marcadas con ácido pícrico (solución 1.2 %; BioChemica).

## 2.6. Ensayos conductuales

La mayoría de los ensayos conductuales fueron realizados en animales adultos (a partir de las 8 semanas de vida), excepto el comportamiento postnatal que fue analizado entre P1 y P21, y el juego juvenil que se analizó en P21. Los ensayos que se llevaron a cabo durante la adultez se realizaron con un intervalo de una semana entre ensayos para maximizar la independencia entre los resultados de los distintos ensayos. En el caso que hubiera más de una cohorte para cada experimento, los ensayos se repitieron en el mismo orden. La mayoría de los ensayos se llevaron a cabo durante el período de luz, entre las 9.00hs y 17.00hs, salvo en el caso de los ensayos de laberinto en Y, habituación/deshabituación olfatoria, preferencia olfatoria, test de marcación de orina y juego juvenil que fueron realizados en períodos de oscuridad para maximizar los niveles de exploración.

Antes de comenzar con cada ensayo, a menos que se especifique lo contrario, los ratones fueron habituados en sus jaulas en la sala de evaluación durante 30 minutos. Se utilizó un sistema de seguimiento digital (ANY-maze, Stoelting, IL, USA) para grabar, registrar locomoción y, en algunos casos, la posición en el laberinto del animal testeado, además de para registrar comportamientos específicos a lo largo del tiempo y en las distintas zonas de las arenas. Entre sesiones, los laberintos se limpiaron con etanol 20% y con papel descartable, excepto los elementos y laberintos de acrílico que se enjuagaron con abundante agua y luego fueron secados.

### 2.6.1. *Análisis del comportamiento postnatal y de marcadores tempranos del desarrollo*

Estos ensayos se llevaron a cabo como se describe en Kazlauskas et al., 2016.

Marcadores tempranos del desarrollo. Con el fin de evaluar cómo los tratamientos afectan el desarrollo postnatal, evaluamos los marcadores físicos que aparecen en días determinados y sirven de parámetros para determinar el normal desarrollo. Para esto, registramos el día postnatal en que: 1) los ratones abrieron sus ojos, 2) se observó aparición de pelo, 3) se observaron las pinas separadas de la cabeza. Además, cada cría fue pesada entre P2 y P20 para evaluar crecimiento somático.

Reflejo de enderezamiento. La cría fue colocada de espaldas sobre una superficie plana y se midió el tiempo necesario para volver a la posición natural (las cuatro patas sobre el piso).

Con una tolerancia máxima de 60 s. Este reflejo fue evaluado entre P3 y P8, ya que es la ventana temporal cuando se registró diferencias entre SAL y VPA en hembras (Kazlauskas et al. 2016).

Fuerza de Agarre. Cada cría fue ubicada en la superficie de una reja metálica. Luego, la grilla fue invertida, de manera que la cría tenía que agarrarse a la grilla para evitar caerse. Se midió la latencia a caerse con una tolerancia máxima de 60 s. Este ensayo fue realizado de P11 a P17.

Ensayo de sobresalto acústico. Cada cría fue evaluada por la presencia / ausencia de respuesta a un estímulo acústico (chasquido de dedos) ejecutado 10 cm por encima de la cría. Este ensayo fue realizado entre los días P11 y P19.

Geotaxis negativa. Cada cría fue colocada en una reja inclinada a 45° con la cabeza orientada hacia abajo. Se midió la latencia a girar 180° con una tolerancia máxima de 60s. El ensayo se llevó a cabo entre P11 y P17.

#### 2.6.2. *Juego juvenil*

Para evaluar el compromiso en juego social juvenil, seguimos el protocolo detallado previamente (Campolongo et al., 2018). Brevemente, en P20 armamos parejas E2-E2 y OIL-OIL entre no hermanas de peso similar ( $0.8 \pm 0.205$  g). En P21, los ratones fueron aislados en la sala de testeo durante 30 minutos en su jaula de residencia, bajo luz tenue (10 lux). Luego, cada animal por separado fue habituado a la arena de testeo (construida con PVC espumado negro de 30 cm x 30 cm x 30 cm) durante 10 minutos. Luego, ambos animales fueron colocados en el laberinto durante 30 minutos. El comportamiento fue registrado con una cámara que tomaba las imágenes desde arriba de la arena. Fueron evaluados ambos ratones de la pareja. Evaluamos frecuencia de solicitud de juego (pasar por arriba, pasar por abajo y aproximaciones), tiempo transcurrido en comportamientos afiliativos (lado a lado, acicalamiento social, o auto-acicalamiento al lado de otro ratón), tiempo invertido en comportamientos no sociales (exploración, auto-acicalamiento y tiempo sentado sólo). Cada comportamiento fue cuantificado posteriormente por dos experimentadores entrenados y ciegos a los tratamientos, con la ayuda del software Any-maze. La reproducibilidad del experimento fue confirmada gracias a la coherencia de los resultados de ambas cuantificaciones.

#### 2.6.3. *Ensayo de interacción social*

El ensayo se llevó a cabo, como se describió previamente en Depino et al., 2011. El ensayo consiste en dos etapas, una de habituación de 5 minutos de duración y otra de evaluación propiamente dicha de 10 minutos de duración. Se iluminó la sala con 10 lux. Se usó

una caja rectangular negra de 40.6 cm de largo por 15 cm de ancho por 23 cm de alto. Este laberinto consta de 3 cámaras interconectadas. A las cajas se les agregó viruta en la base y se situaron dos cilindros transparentes de acrílico, uno a cada lado. Estos cilindros tienen 15 cm de alto por 8 cm de diámetro y presentan múltiples agujeros de 1 cm de diámetro que permiten que el ratón que está siendo evaluado pueda oler e investigar con su hocico hacia adentro del mismo.

Previo al comienzo de cada ensayo, se designó aleatoriamente a una de las cámaras laterales como “lado social” y la otra cámara lateral como “lado no social”. Para la habituación los cilindros se colocaron vacíos, tapados con una placa de Petri de plástico y se permitió que el ratón explorara libremente por las tres cámaras durante 5 minutos. Una vez finalizada la habituación, sin sacar al ratón evaluado del laberinto, se colocó un objeto en el cilindro del “lado no social” y un ratón estímulo en el cilindro del “lado social”. El objeto era de tamaño y color similar al de un ratón, y los estímulos que se usaron tenían entre 21 y 35 días de vida, y eran del mismo sexo y cepa que el ratón evaluado. Transcurridos los 10 minutos, cada ratón fue pesado y devuelto a su jaula. A partir de los videos, se contabilizó el tiempo en el que el ratón investigó cada cilindro. Se consideró como investigación, cada vez que el hocico del ratón estaba a menos de 1 cm del cilindro.

#### *2.6.4. Tarea de habituación y reconocimiento de la novedad social*

Este protocolo fue tomado de Hörnberg et al., 2020. Para este ensayo utilizamos las mismas arenas de juego juvenil (construidos en PVC espumado, de 30 cm x 30 cm de base y 30 cm de altura). Cada animal fue habituado al laberinto durante 30 minutos. El ensayo consistió en cinco presentaciones consecutivas de un ratón estímulo, de 2 minutos cada una, con intervalos de 5 minutos entre cada presentación. Los estímulos que se usaron tenían entre 21 y 35 días de vida, y eran del mismo sexo y cepa que el ratón testeado. En las primeras cuatro presentaciones se le presentó al ratón evaluado el mismo ratón estímulo, mientras que en la quinta presentación se utilizó un estímulo novedoso para el ratón experimental. De esta manera, la habituación a un estímulo social pudo ser observada entre las presentaciones 1 y 4, mientras que la deshabituación está dada por la diferencia de tiempo de interacción entre las presentaciones 4 y 5. Los ensayos fueron filmados y analizados posteriormente con ayuda del programa Any-maze. Se consideró como interacción cada vez que el ratón experimental iniciaba una acción con el estímulo o cuando la nariz del ratón evaluado estaba a menos de 1 cm del estímulo social.

#### 2.6.5. *Ensayo de auto-acicalamiento (SG)*

Este ensayo se llevó a cabo como se describe en Depino et al., 2011. Este ensayo no requiere de los 30 minutos previos de habituación a la sala. Se usaron unos cilindros de acrílico transparente de 20 cm de alto y 5.5 cm de diámetro. Se iluminó la sala con 10 luxes. Los animales fueron habituados en el cilindro los dos días previos al testeo durante una hora cada día. Luego de colocar los animales en el cilindro, se colocó un barbijo para tapar el cilindro y así impedir que el ratón pudiera escaparse del mismo. Se pusieron separadores entre los cilindros para impedir que los ratones pudieran verse entre ellos durante el ensayo. En el día de la evaluación se filmaron los animales desde el lateral durante 10 minutos, luego de un período de habituación de 10 minutos. A partir de los videos, se contabilizó el tiempo de auto-acicalamiento durante los 10 minutos.

#### 2.6.6. *Ensayo de splash de sacarosa*

Se siguió un protocolo modificado de Teissier et al., 2020. Luego de los 3 días consecutivos en los que se realizó el ensayo de auto-acicalamiento, el cuarto día se realizó el ensayo de *splash* (salpicado) de sacarosa. Éste consistió en habitar al ratón al mismo tubo donde se cuantificó acicalamiento el día anterior, durante 30 minutos. Luego, cada ratón se sacó del tubo, se roció con sacarosa 20% en agua destilada (0.5 ml aprox.) y fue devuelto al tubo donde, durante se filmó su comportamiento durante 10 minutos. Se cuantificó el tiempo en que cada ratón: 1) se rascó el lomo con las patas delanteras, 2) se pasó las patas delanteras por la cara, y 3) se rascó el cuerpo con las patas traseras.

#### 2.6.7. *Ensayo de campo abierto (OF)*

Se utilizó un protocolo modificado de Depino and Gross, 2007. Se utilizó un laberinto de PVC negro de 45 cm por 45 cm de base y 30 cm de altura. La sala se iluminó de forma de asegurar 100 luxes en el centro de la arena. Al comienzo del ensayo, se colocó al animal mirando al centro, junto a una de las paredes, equidistante a las dos esquinas más cercanas. Se permitió al animal la circulación libre en el laberinto durante 30 minutos. Para analizar el ensayo, se definió una zona central de 23cm por 23cm, más iluminada y ansiogénica. A partir del programa Any-maze se obtuvieron los datos de distancia total recorrida, tiempo total en el centro, y distancia recorrida en el centro. Además, en algunos casos, se cuantificó la exploración vertical y el tiempo acicalándose.



#### 2.6.8. *Ensayo de suspensión por la cola (TST)*

Se siguió el protocolo de Lucchina et al., 2010. Se iluminó la sala con 50 luxes. Los animales fueron suspendidos con una cinta adhesiva envuelta alrededor de la cola (aproximadamente a 4/5 partes de la base de la cola) y fueron fijados de un alambre a una altura de 25 cm de una base de madera. El ensayo duró 5 minutos y se contabilizó el porcentaje de tiempo en que el animal permaneció inmóvil.

#### 2.6.9. *Ensayo de natación forzada (FST)*

Se siguió el protocolo como se detalla en Lucchina et al., 2010. Se iluminó la sala con 50 luxes. Se utilizaron vasos de precipitado de 27 cm de altura por 18 cm de diámetro. Se llenó con agua a 24 °C hasta 15 cm de altura, de manera que el ratón no podía tocar la base del vaso ni con la cola ni con las extremidades posteriores. Cuidadosamente, se colocó el ratón en el agua, durante 6 minutos. Los animales fueron filmados, y se cuantificó el tiempo inmóvil que incluye cualquier movimiento que sea necesario para balancear el cuerpo y mantener la cabeza por fuera del agua. Una vez finalizada cada sesión, cada ratón fue secado con toallas de papel y fue colocado en una jaula con una manta eléctrica bajo la jaula hasta que se secaron por completo.

#### 2.6.10. *Ensayo de marcación de orina*

Para evaluar el patrón de marcado territorial se llevó a cabo el ensayo de marcado de orina (protocolo original de Desjardins et al., 1973; Kimura and Hagiwara, 1985, modificado según Wu et al., 2009). Como una estrategia de defensa territorial, los roedores machos, entre otros mamíferos, marcan su territorio dispersando gotas de orina en todo el piso de la jaula, mientras que las hembras suelen orinar en los bordes, dejando generalmente unas pocas marcas de orina, más grandes y periféricas. Esta prueba no requiere habituación previa. En una sala iluminada con 10 luxes, se colocó a cada animal durante 60 minutos en una jaula de igual tamaño a las residenciales, tapada y con un papel de filtro Whatman en la base. Al final del testeo, cada animal fue devuelto a su jaula original. El patrón de marcado fue visualizado con iluminación ultravioleta y fotografiado. En las imágenes se contabilizaron la cantidad de manchas de orina totales y cantidad de manchas centrales (manchas que no se encuentran tocando los bordes).

#### 2.6.11. *Ensayo de preferencia olfatoria*

En este ensayo se mide cuánto prefiere un ratón el olor de hembra por sobre el de macho. Se siguió un protocolo previamente descrito (Lenz et al. 2019). Se usó un laberinto de 30 cm por 30 cm de base y 30 cm de altura. El ensayo consta de dos etapas: una habituación de 10 minutos y el ensayo propiamente dicho de 10 minutos. En la habituación se colocaron cuatro

cuencos de cerámico, uno en cada esquina, de 10 cm de diámetro por 5 cm de altura con viruta limpia. Para el ensayo, sin sacar al ratón del laberinto, se cambió la viruta de dos de los cuencos. A uno de los cuencos se le puso viruta de una jaula donde estuvo una hembra adulta receptiva (pasó por el estadio de estro alguno de los días) por lo menos durante 5 días. En otro cuenco, opuesto al de viruta de hembra, se le puso viruta de una jaula donde residió por 5 días un macho adulto con experiencia sexual. Los animales fueron filmados. Se contabilizó el tiempo durante el cual el animal explora activamente cada uno de los cuencos, esto incluye oler o cavar la viruta, y se calculó el índice de preferencia por la viruta de hembra como  $((\text{tiempo investigando la viruta de hembra} - \text{tiempo investigando la viruta de macho}) / \text{tiempo de investigación total})$ .

#### 2.6.12. *Ensayo de privación de alimentación en un ambiente novedoso (NSF)*

Se siguió el protocolo detallado previamente (Olusakin et al. 2020). Se iluminó la sala con 100 luxes y se utilizó un laberinto de PVC espumado (50 cm x 80 cm x 20 cm), con el piso cubierto con viruta, de manera de cubrir toda la base del laberinto. 24 horas antes de la evaluación, se le retiró la comida de las jaulas a los ratones. Cada ratón fue pesado antes y después de la privación de la comida. Durante el ensayo, 2 pellets de comida fueron colocados sobre un papel de filtro (12 cm de diámetro), localizado en el centro de la arena. Cada ratón, fue colocado en la esquina del laberinto y se midió la latencia a aproximarse a oler la comida con una tolerancia máxima de 5 minutos. Para controlar la ingesta, un día después del día del ensayo los ratones fueron pesados nuevamente.

#### 2.7. Evaluación del estado reproductivo

Cinco días después del último ensayo comportamental, se obtuvieron frotis vaginales cada día a lo largo de 2 semanas. Seguimos un protocolo previamente descrito (Byers et al. 2012). Con una pipeta cargada con solución salina estéril, humedecemos las paredes vaginales y tomamos una muestra, que fue observada inmediatamente en el microscopio. Los estados del ciclo estral se determinaron de acuerdo a la proporción de los tipos celulares presentes y se clasificaron en:

Proestro: La mayoría de las células corresponden a nucleadas, pueden encontrarse algunas células cornificadas epiteliales y algunos leucocitos.

Estro: La mayoría de las células que se encuentran son cornificadas.

Diestro: Sólo se encuentran leucocitos.

Metaestro: Células cornificadas y leucocitos polimorfonucleares.

Finalmente, las hembras fueron sacrificadas, y se realizó una evaluación cualitativa de los ovarios y útero, y fueron clasificamos como normal o atrofiado.

## 2.8. Análisis histológico

### 2.8.1. *Procesamiento de los tejidos*

Los animales fueron profundamente anestesiados, con una mezcla de 80 mg/kg de ketamina clorhidrato y 8 mg/kg de xilacina administrada mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Luego, los animales fueron perfundidos transcardíacamente con paraformaldehído (PFA) 4 % en 0.1 M de buffer fosfato (PB), pH = 7.2. Los cerebros fueron removidos y fueron dejados en PFA durante toda la noche a 4°C, y luego criopreservados en solución sacarosa 30 % en PB a 4 °C. Para congelar los cerebros, se extrajeron de la sacarosa, cuidando que queden lo menos húmedos posible, fueron envueltos en papel aluminio y fueron llevados al congelador a una temperatura de -80 °C por lo menos durante 2 horas. Las secciones de 40 µm fueron obtenidas con el crióstato (Shenyang Roundfin, RD-2230), donde los cerebros fueron seccionados, seriados de a doce, en plano coronal, mientras que los cerebelos fueron cortados en plano sagital y se seriaron de a 6.

### 2.8.2. *Inmunohistoquímica: cFos*

cFos es un gen de expresión temprana que lo usamos para medir actividad neuronal. Para medir la expresión de cFos se siguió un protocolo previamente descripto (Campolongo et al. 2018). Brevemente, se utilizó un anticuerpo primario anti-cFos (1:1000 en suero de burro 1% en PBS-Tx 0,1 %; EMD Millipore, Burlington, MA, USA), el anticuerpo secundario en burro anti-conejo conjugado con biotina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) y el kit ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Luego, las secciones fueron teñidas con cresyl violeta (5 mg/ml in 0.6% ácido acético).

### 2.8.3. *Obtención y análisis de imágenes*

Para obtener las imágenes de la inmunohistoquímica anti c-Fos, utilizamos una cámara Infinity1 (Lumera Corporation, Ottawa, ON, Canada) y un microscopio de campo luminoso (Olympus CX31, Buenos Aires, Argentina) con una magnificación de 40X. Contabilizamos núcleos positivos para cFos en la capa 2 de la corteza piriforme (Pir). Las mediciones fueron realizadas con la ayuda del software Fiji (Schindelin et al. 2012).

## 2.9. Medición de la concentración de hormonas en plasma

Para llevar a cabo la medición de la concentración de hormonas en plasma se utilizaron kits de Elisa (DRG Instruments GmbH, Alemania). En el caso de la medición de estradiol se utilizó el kit EIA-2693 y en el caso de la medición de la concentración de progesterona se utilizó el kit EIA-1561. En ambos casos se siguió el protocolo especificado en los kits.

### 3. La manipulación juvenil rescata los efectos relacionados al autismo producto de la exposición prenatal al ácido valproico

### 3.1. Introducción

Originalmente se consideró al TEA como un desorden que se debía casi exclusivamente a factores genéticos. Esto se debió a estudios poblacionales que reportaron que la tasa de concordancia de gemelos monocigóticos era alta (entre 36 % y 91 %), mientras que no se observaba concordancia entre gemelos dicigóticos (Bailey et al. 2013; Folstein and Rutter 1977; Steffenburg et al. 1989). Sin embargo, un estudio posterior demostró que, con ciertas correcciones de la metodología empleada, la tasa de concordancia entre gemelos dicigóticos puede alcanzar el 31 % para varones y el 36 % para mujeres (Hallmayer et al. 2011). En este estudio, además, se calcularon parámetros estimados a partir de modelos genéticos y observaron que los modelos que ajustan mejor son los que consideran, además de la heredabilidad genética, al ambiente compartido por los gemelos. Actualmente, hay evidencia creciente a favor de que los factores epigenéticos y ambientales tienen un rol en la susceptibilidad al TEA (Persico and Bourgeron 2006), mientras que sólo alrededor de 10-20 % de los individuos con TEA presentan una etiología genética conocida (Folstein and Rosen-Sheidley 2001). Además, la mayoría de los estudios que examinan las contribuciones ambientales y genéticas a la etiología del autismo han analizado ambos factores por separado, en vez de considerar el rol de las interacciones entre genes y ambiente, un enfoque que podría sugerir nuevos mecanismos etiológicos involucrados en el TEA (Bölte et al. 2019). Podríamos decir, entonces, que la probabilidad de desarrollar autismo depende de la predisposición genética y su interacción con el ambiente que, a su vez, dependiendo si es perjudicial o enriquecido, puede favorecer la aparición de síntomas y exacerbarlos, o moderar la severidad del TEA y hasta proteger a los individuos de presentar los síntomas del desorden.

Entre los factores ambientales protectores y moderadores, el enriquecimiento social temprano puede tener un profundo impacto durante el desarrollo de niños con riesgo a presentar autismo. De hecho, estudios clínicos indican que estrategias que favorecen la interacción social temprana pueden promover habilidades sociales en niños afectados por TEA (Dawson 2008; Hwang and Hughes 2000). A pesar de que no se conocen los mecanismos de acción, el enriquecimiento social temprano puede alterar la expresión génica, el desarrollo del cerebro y el comportamiento en niños con TEA (Dawson 2008). De acuerdo con estas observaciones clínicas, nuestro grupo ha demostrado previamente que destetar animales VPA con animales SAL en el P21, rescata el fenotipo social en animales VPA adultos respecto a animales que crecieron con otros animales VPA (Campolongo et al. 2018). Esta evidencia sugiere que hay un período crítico entre P21 y P60, durante el cual factores ambientales tales como interacciones sociales diarias entre pares, pueden determinar los niveles de sociabilidad.

Curiosamente, en un estudio no publicado hemos observado que machos expuestos prenatalmente a VPA que recibieron inyecciones intraperitoneales entre P22 y P34 mostraron niveles de sociabilidad similares a los controles en la adultez, revirtiendo de esta manera las alteraciones que se observan típicamente en animales VPA (datos no publicados). Nuestra **hipótesis** es que este efecto se debió a la manipulación de los animales durante ese período, que fue la mínima y necesaria para llevar a cabo las inyecciones.

El término “Manipulación” (*handling* en inglés) se refiere a la interacción del experimentador con el animal, y generalmente es llevada a cabo para habituar a los roedores a una determinada situación experimental para reducir el estrés. Por otro lado, la Manipulación es también uno de los primeros modelos que se ha utilizado para investigar los efectos a largo plazo de la experiencia temprana en el desarrollo del cerebro. Estudiar los efectos de la manipulación postnatal en el desarrollo del cerebro ayudó a entender cómo cambios sutiles en el ambiente temprano pueden alterar las trayectorias del neurodesarrollo consideradas típicas (Rainecki, Lucion, and Weinberg 2014). La mayoría de los protocolos de manipulación se basan en los estudios fundacionales de Seymour Levine, quien estudió los efectos a largo plazo de las experiencias tempranas en el desarrollo postnatal. El modelo original consistió en manipular los animales durante 3 minutos desde P1 hasta P20 (Levine, Chevalier, and Korchin 1956), pero desde entonces se han reportado múltiples protocolos y diferentes resultados. A pesar de que la manipulación experimental no reproduce un estímulo ambiental natural, los efectos a largo plazo reportados indican que la manipulación recluta vías biológicamente relevantes.

Dados los resultados previos de nuestro laboratorio, y que, a pesar de que se han reportado múltiples efectos de la manipulación postnatal sobre la conducta, pocos trabajos describen efectos sobre la sociabilidad, y ninguno lo hace cuando la manipulación es postdestete, me propuse como **objetivo** investigar cómo la manipulación juvenil (MJ) entre P22 y P34 afecta el fenotipo del modelo VPA en ratón. Para esto, se evaluaron los efectos de la MJ en comportamientos relevantes al autismo que son, además, afectados por la exposición prenatal a VPA: sociabilidad (ensayo de interacción social), comportamientos repetitivos (ensayos de auto-acicalamiento y laberinto en Y) y comportamientos relacionados a la depresión (ensayos de suspensión por la cola y de natación forzada).

En nuestro laboratorio, hemos identificado a la corteza piriforme (Pir) como una estructura afectada por la exposición prenatal a VPA y por el enriquecimiento social. La Pir en los machos VPA está caracterizada por un aumento en la actividad neuronal, y se ha reportado que la estimulación social revierte esta alteración, sugiriendo de esta manera que la Pir podría

ser un componente clave en el circuito social del cerebro (Campolongo et al. 2018). Aquí, evaluamos el efecto de la manipulación juvenil en la actividad neuronal basal de la Pir. Para ello, analizamos la expresión de un marcador de actividad neuronal, el factor de transcripción cFos.

Se observó que los animales VPA presentaron una disminución en la sociabilidad, un incremento en los comportamientos repetitivos y en el tiempo de inmovilidad en el ensayo de natación forzada, y que la MJ puede revertir las alteraciones generadas por el VPA. Finalmente, se observó un aumento en la actividad neuronal en la Pir en los animales VPA, mientras que la MJ restituyó los niveles de actividad a valores similares al control.

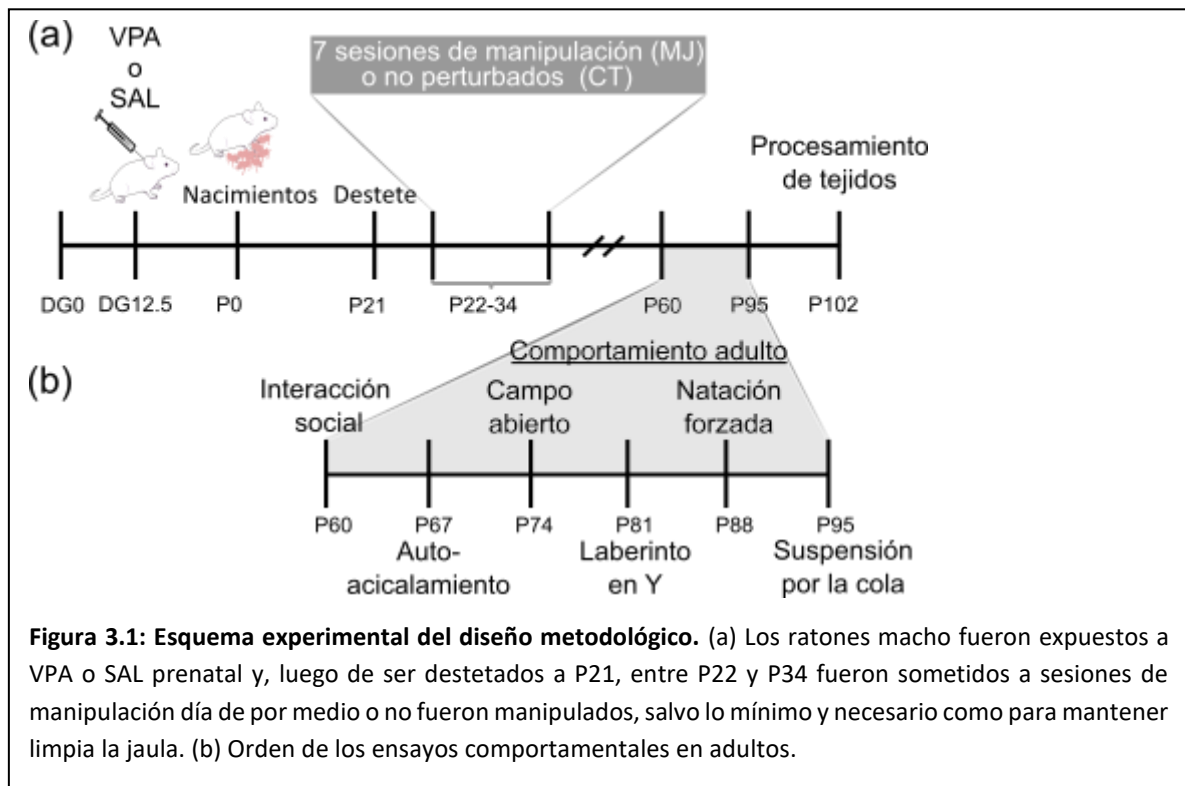
### 3.2. Diseño experimental

Para esta sección se utilizaron dos cohortes. La cohorte 1 consistió en 16 camadas (8 SAL y 8 VPA). De cada camada se eligieron aleatoriamente cuatro machos como máximo a los que se les asignó un tratamiento juvenil: Manipulación juvenil (MJ) o control (CT) de manera que, como máximo, en cada camada se obtuvieron 2 machos MJ y 2 machos CT. De esta manera, de adultos, se testearon 8 SAL-CT, 8 SAL-MJ, 7 VPA-CT y 10 VPA-MJ. La cohorte 2 consistió en 11 camadas (7 SAL y 4 VPA), donde de cada camada se eligieron aleatoriamente hasta 2 machos (1 MJ y 1 CT) y se testearon de adultos 7 SAL-CT, 7 SAL-MJ, 3 VPA-CT y 4 VPA-MJ. Luego, se eligieron 5 animales de cada tratamiento de la cohorte 1 para cuantificar células cFos-positivas en la Pir. Los días en los que se llevó a cabo cada tratamiento, así como el orden de los ensayos conductuales en adultos se muestran en la figura 3.1.

### 3.3. Estadística

En este capítulo se utilizó el programa R (R Core Team 2021) con la librería lmerTest (Kuznetsova, Brockhoff, and Christensen 2017) para ajustar modelos lineales con efectos mixtos (LME, por sus siglas en inglés) a cada variable y se agregó a la madre como factor aleatorio. Cuando los supuestos de linealidad y homocedasticidad no se cumplieron, se ajustaron los datos a modelos lineales mixtos generalizados (GLMM) con distribución de Poisson o binomial negativa, usando la librería glmmTMB (Brooks, Mollie et al. 2017). Para realizar las comparaciones *post hoc* se utilizó la librería emmeans (Lenth 2021), junto con los métodos Tukey y de FDR para la corrección del p-valor. Para evaluar la preferencia por cada lado en la fase de habituación y la preferencia por el lado social en el ensayo de interacción social,





utilizamos una prueba *t* de Student. En todos los casos, se consideró significancia estadística cuando  $p < 0.05$ .

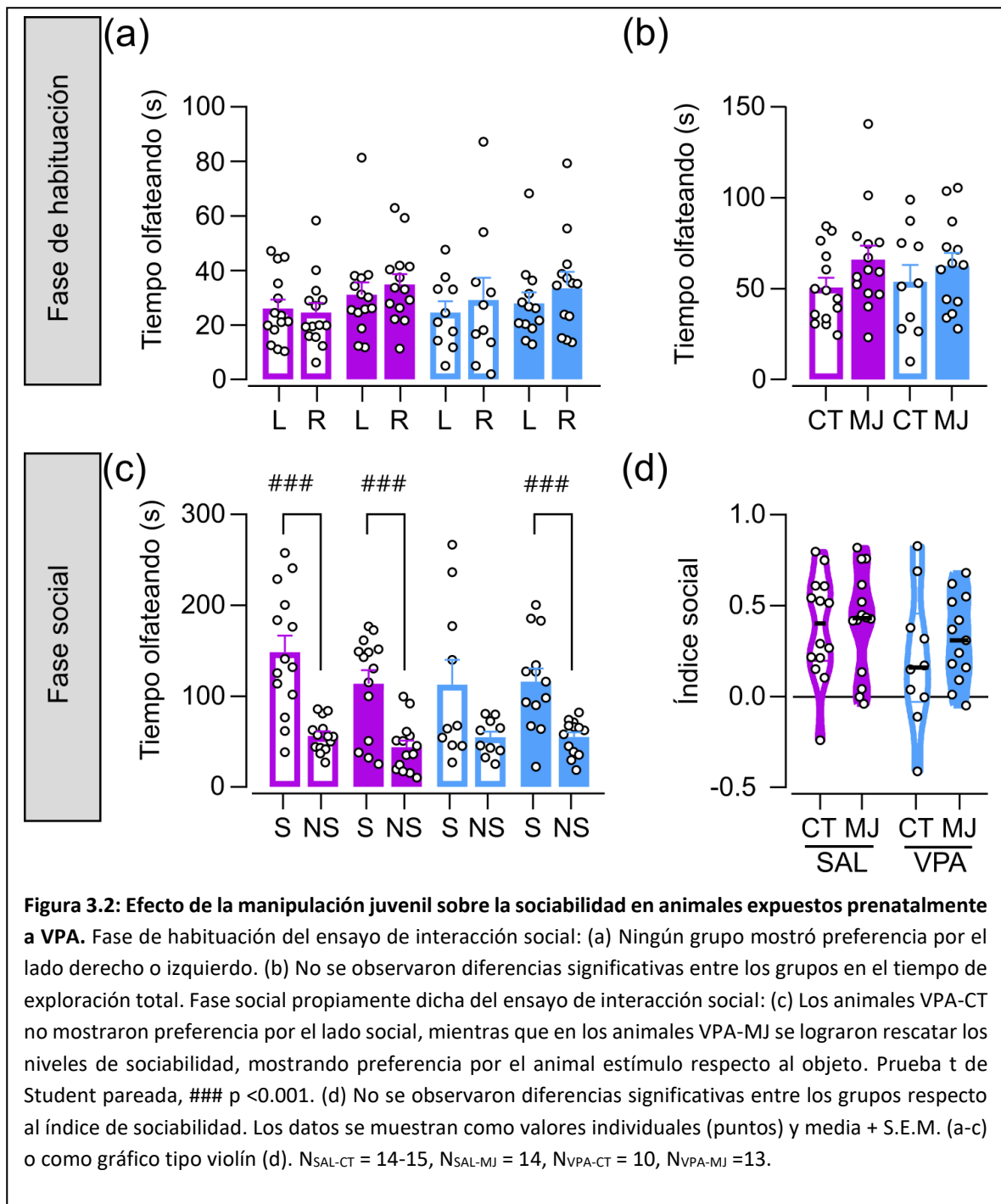
Para crear un factor de “autismo”, se realizó un análisis factorial exploratorio, seguido de un análisis factorial confirmatorio con la ayuda del paquete lavaan (Rosseel 2012). Se incluyeron seis variables de los ensayos realizados en el análisis que consideramos que mejor caracterizan los comportamientos relacionados al autismo: índice de sociabilidad (SI) del ensayo de interacción social, tiempo de acicalamiento en el ensayo de auto-acicalamiento (SG), tiempo de acicalamiento en el ensayo de campo abierto (SG\_OF), porcentaje de alternancias en el ensayo de laberinto en Y (YALT), tiempo inmóvil en el ensayo de suspensión por la cola (tTST) y tiempo inmóvil durante los últimos 4 minutos en el ensayo de natación forzada (tFST). Antes de los análisis exploratorios, se implementó la prueba de Kaiser-Meyer-Olkin y se obtuvo un MSA de 0.6. Luego se realizó la prueba de esfericidad de Bartlett donde se obtuvo:  $\chi^2 = 16.014$ ,  $df = 15$ ,  $p = 0.381$ . Los resultados de estas pruebas indican que los datos disponibles son apropiados para un análisis factorial. Luego, en el análisis factorial confirmatorio, extrajimos un factor (Aut1) de todas las variables y corroboramos con las medidas globales de ajuste que el modelo elegido ajusta bien a los datos ( $\chi^2 = 3.455$ ,  $df = 9$ ,  $p = 0.943$ ). Finalmente, estimamos los valores de la variable latente para cada animal y ajustamos un modelo lineal mixto con la madre como factor aleatorio.

Todos los datos de este capítulo, así como el protocolo del análisis estadístico en R, se encuentran publicados en el repositorio Open Science Foundation: [https://osf.io/3zbvf/?view\\_only=34d9176268594c3caf43293555760cf0](https://osf.io/3zbvf/?view_only=34d9176268594c3caf43293555760cf0).

### 3.4. Resultados

#### 3.4.1. Ensayo de interacción social

En la fase de habituación en el ensayo de interacción social, ningún grupo mostró preferencia ni por el lado izquierdo ni el derecho [prueba t de Student pareada, SAL-CT:  $t(13) = 0.323$ ,  $p = 0.751$ ; SAL-MJ:  $t(13) = -1.215$ ,  $p = 0.246$ ; VPA-CT:  $t(9) = -0.518$ ,  $p = 0.617$ ; VPA-MJ:  $t(12) = -1.127$ ,  $p = 0.282$ ; Figura 3.2a]. Se evaluó también el tiempo de exploración total, que se obtuvo de la suma de los tiempos oliendo el cilindro de la izquierda y el de la derecha, y no se observaron diferencias significativas entre los grupos [tratamiento prenatal:  $F(1, 22.763) < 0.001$ ,  $p = 0.987$ ; tratamiento juvenil:  $F(1, 25.145) = 3.188$ ,  $p = 0.086$ ; Figura 3.2b]. En la fase social del ensayo de interacción social, los animales VPA-CT, como se reportó previamente, no mostraron preferencia por ninguno de los tubos [VPA-CT:  $t(9) = 1.957$ ,  $p = 0.082$ ]. Mientras que los animales control sí prefirieron el tubo social [prueba t de Student pareada, SAL-CT:  $t(13) = 4.482$ ,  $p < 0.001$ ; SAL-JH:  $t(13) = 4.598$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 3.2c]. También pudimos observar que en los animales VPA-MJ, la MJ fue suficiente para rescatar los niveles de sociabilidad [prueba t de Student:  $t(12) = 4.263$ ,  $p = 0.001$ ; Figura 3.2c]. No observamos diferencias en el índice de sociabilidad entre los grupos, si bien se puede ver en la figura una tendencia de los animales VPA-CT a presentar un índice más bajo [tratamiento prenatal:  $F(1, 24.657) = 2.077$ ,  $p = 0.162$ ; tratamiento juvenil:  $F(1, 25.156) = 1.174$ ,  $p = 0.288$ ; Figura 3.2d].



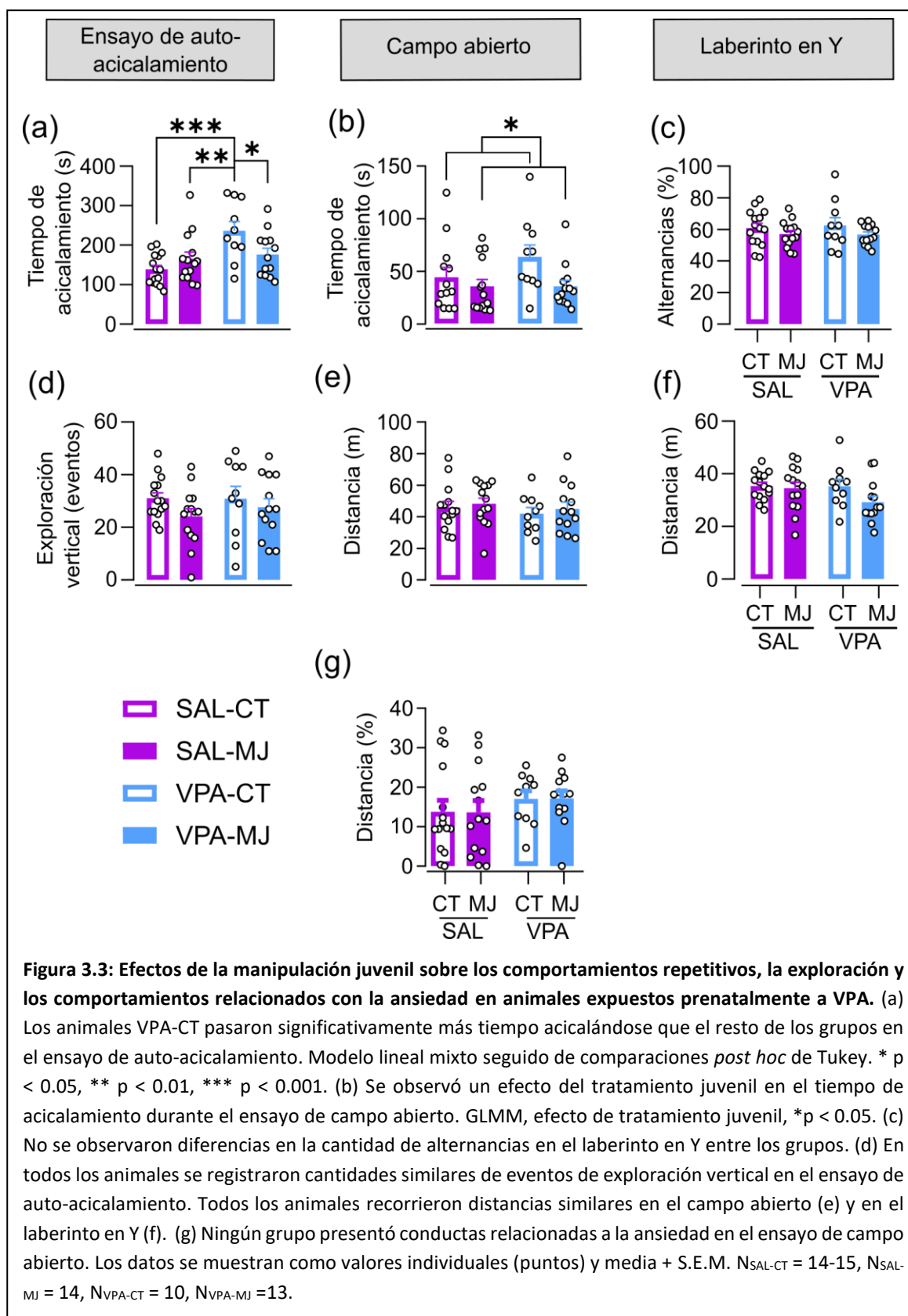
### 3.4.2. Comportamientos repetitivos

Los comportamientos repetitivos fueron cuantificados y analizados en los ensayos de auto-acicalamiento y de laberinto en Y, así como en el ensayo de campo abierto. En el ensayo de auto-acicalamiento encontramos un efecto de interacción entre los tratamientos prenatal y juvenil en el tiempo de acicalamiento [ $F(1, 24.069) = 13.3460, p = 0.001$ ]. El análisis *post hoc* reveló que los animales VPA-CT presentaron un mayor tiempo de acicalamiento respecto a los demás grupos (Figura 3.3a). Respecto al tiempo de acicalamiento en el ensayo de campo abierto, se observó un efecto del tratamiento juvenil, donde los animales MJ mostraron menores niveles de acicalamiento [GLMM, tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, 46) = 0.282, p = 0.595$ ; tratamiento juvenil:  $\chi^2(1, 46) = 8.022, p = 0.004$ ; Figura 3.3b]. En el ensayo del laberinto en Y también medimos comportamientos repetitivos. El ensayo consiste en evaluar la exploración del animal a través del porcentaje de alternancias. Se espera que los animales tengan un promedio de alternancias cercano al 60%, lo que significa que cada vez que los animales eligieron un nuevo brazo, es muy probable que hayan elegido un brazo distinto a los dos últimos. Si un animal prefiriera quedarse en uno o dos brazos, el porcentaje de alternancias sería menor al 50% y se puede interpretar este comportamiento como un patrón repetitivo en la conducta. No se observaron diferencias entre los grupos, ya que todos los grupos presentaron una media de porcentaje de alternancias cercana al 60% [tratamiento prenatal:  $F(1, 27.584) = 0.003, p = 0.953$ ; tratamiento juvenil:  $F(1, 29.736) = 3.243, p = 0.082$ ; Figura 3.3c].

### 3.4.3. Exploración y comportamientos relacionados con la ansiedad

Todos los animales manifestaron niveles de exploración similares. No se observaron diferencias entre los grupos respecto a la cantidad de eventos de exploración vertical en el ensayo de auto-acicalamiento [tratamiento prenatal:  $F(1, 26.142) = 0.033, p = 0.857$ ; tratamiento juvenil:  $F(1, 27.610) = 2.873, p = 0.101$ ; Figura 3.3d], y todos los animales caminaron distancias similares en los ensayos de campo abierto [tratamiento prenatal:  $F(1, 48) = 1.545, p = 0.220$ ; tratamiento juvenil:  $F(1, 48) = 0.021, p = 0.884$ ; Figura 3.3e] y de laberinto en Y [tratamiento prenatal:  $F(1, 23.065) = 1.638, p = 0.213$ ; tratamiento juvenil:  $F(1, 26.740) = 2.764, p = 0.108$ ; Figura 3.3f].

En el ensayo de campo abierto también se evaluó el porcentaje de distancia recorrida en el centro, como una medida relacionada a la ansiedad, y se observó que todos los animales presentaron valores similares en este parámetro [tratamiento prenatal:  $F(1, 22.143) = 0.922, p = 0.347$ ; tratamiento juvenil:  $F(1, 22.861) = 0.037, p = 0.849$ , Figura 3.3g].

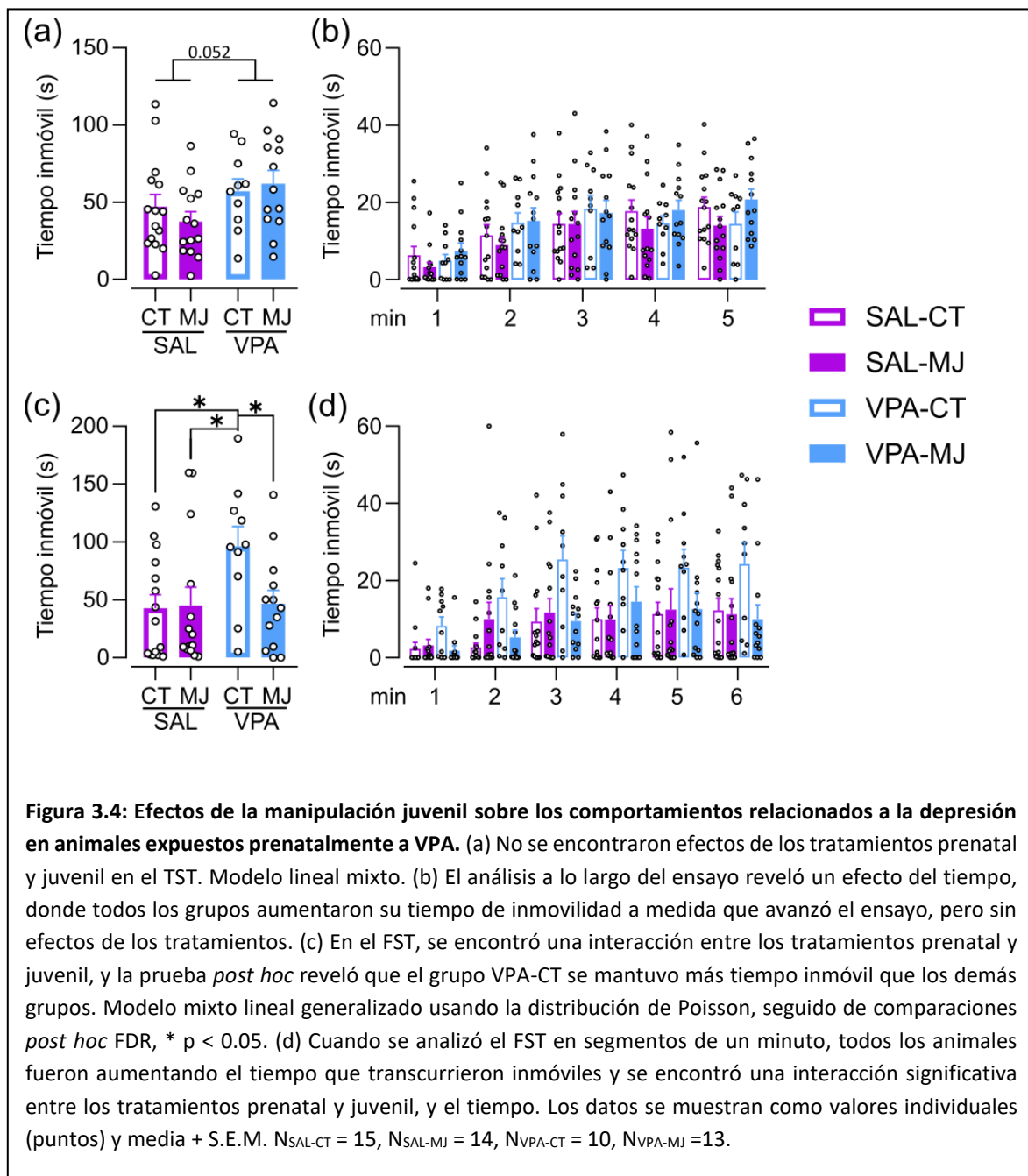


#### 3.4.4. Comportamientos relacionados a la depresión

El ensayo de natación forzada (FST, por sus siglas en inglés) y el de suspensión por la cola (TST, por sus siglas en inglés) son ensayos que se utilizan para evaluar conductas relacionadas con la depresión. Ambos ensayos se basan en poner al animal en una situación de estrés de la que no pueden escapar, donde el animal puede adoptar conductas relacionadas al escape como nadar en el caso del FST o moverse en el TST, o bien, quedarse inmóvil que sería un comportamiento de desesperanza (Cryan, Valentino, and Lucki 2005). Así, el tiempo de inmovilidad en estos ensayos se asocia a la depresión ya que se ha visto que drogas antidepressivas disminuyen la inmovilidad (Castagné et al. 2010; Nagatani et al. 1987; Porsolt, Bertin, and Jalfre 1977; Porsolt, Le Pichon, and M Jalfre 1977; Steru et al. 1985), y que este parámetro es sensible a distintas manipulaciones neurobiológicas y comportamentales (Can et al. 2011; Cryan et al. 2005).

No encontramos diferencias significativas en la inmovilidad en el TST cuando analizamos el tiempo total, si bien encontramos una tendencia a un efecto prenatal [tratamiento prenatal:  $F(1, 25.593) = 4.138, p = 0.052$ ; tratamiento juvenil:  $F(1, 26.114) = 0.181, p = 0.674$ ; Figura 3.4a]. Cuando analizamos el ensayo en segmentos de un minuto, encontramos un efecto del tiempo [ $F(4, 192.000) = 26.537, p < 0.001$ ; Figura 3.4b], donde todos los grupos fueron aumentando el tiempo inmóvil por cada minuto, mientras que no encontramos efectos de los tratamientos prenatal y juvenil significativos [tratamiento prenatal x tiempo:  $F(4, 192) = 1.435, p = 0.223$ ; tratamiento juvenil x tiempo:  $F(4, 192) = 0.168, p = 0.954$ ; Figura 3.4b].

En el FST incluimos en el análisis los 4 minutos finales y encontramos un efecto de interacción entre los tratamientos prenatal y juvenil [GLMM,  $\chi^2(1, 46) = 4.038, p = 0.044$ ]. Luego llevamos a cabo un análisis *post hoc*, donde observamos que los animales VPA-CT transcurrieron más tiempo inmóviles que los demás grupos (Figura 3.4c). Luego, el análisis a lo largo del tiempo en períodos de un minuto reveló que todos los animales aumentaron el tiempo de inmovilidad a lo largo del ensayo [ $\chi^2(5, 282) = 1775.583, p < 0.001$ ; Figura 3.4d] y encontramos un efecto significativo en la interacción de los tratamientos prenatal, juvenil y el tiempo [ $\chi^2(5, 282) = 430.755, p < 0.001$ ; Figura 3.4d].

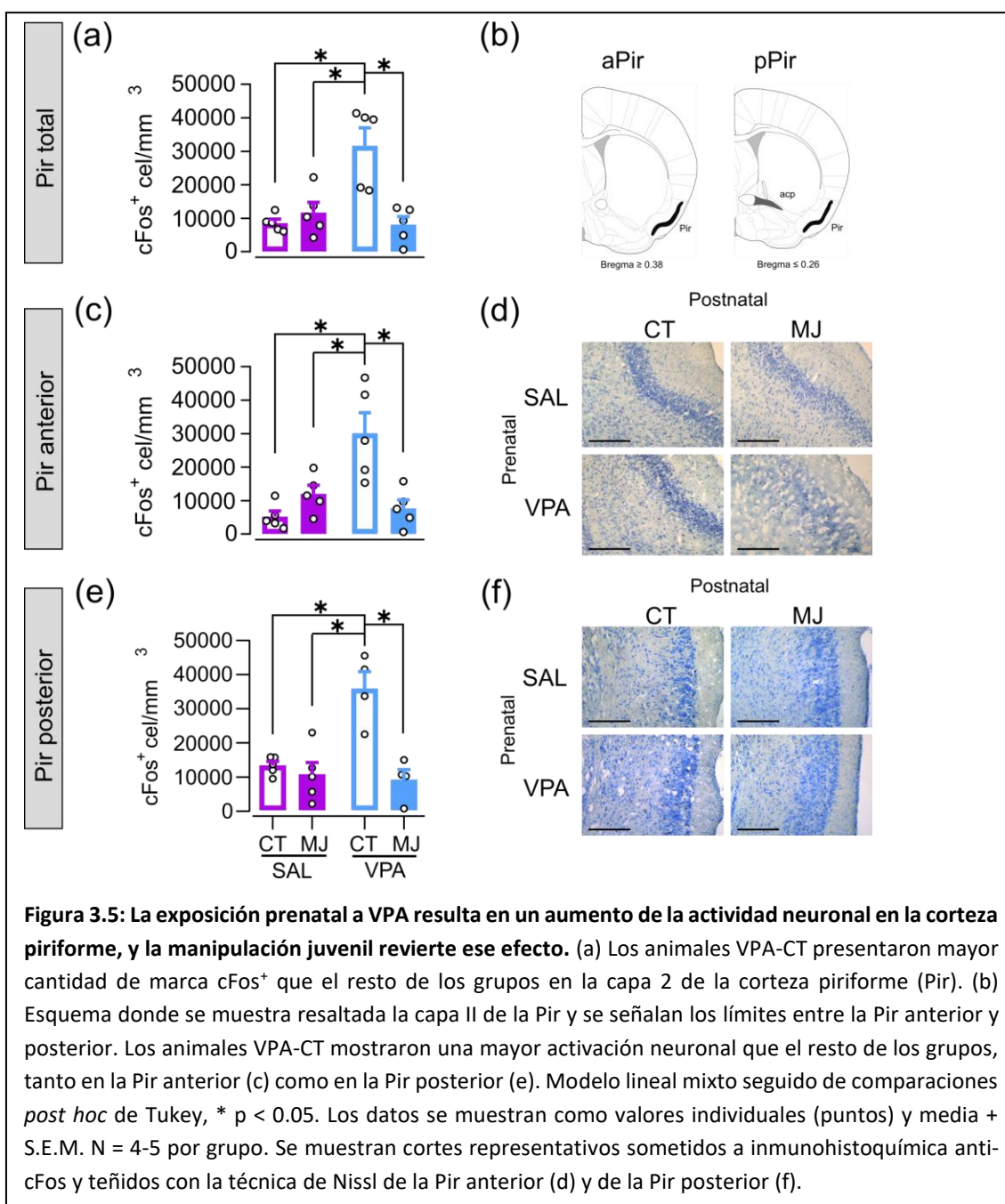


### 3.4.5. Actividad neuronal

Nuestro grupo demostró previamente que los ratones expuestos prenatalmente al VPA tienen un metabolismo de la glucosa alterado en la corteza piriforme (Pir) y una actividad neuronal aumentada en esta región respecto a los controles (Campolongo et al. 2018). Además, en el mismo estudio se observó que estas alteraciones se revierten cuando los animales VPA son criados junto a animales control, lo que interpretamos como una respuesta positiva a la estimulación social que los animales SAL ejercen sobre los animales VPA. La actividad neuronal

puede medirse mediante el análisis de la expresión del gen cFos, ya que es un gen que, en algunas neuronas, se expresa luego de la despolarización de las mismas (Bullitt 1990).

Dados los antecedentes mencionados, se analizó la expresión de cFos en los cuatro grupos experimentales, y encontramos una interacción significativa entre los tratamientos prenatal y juvenil [F (1, 6.674) = 15.908,  $p = 0.005$ ]. Los análisis *post hoc* revelaron que los animales VPA presentan una mayor activación neuronal en la Pir que los animales de los demás tratamientos (Figura 3.5a). La Pir puede dividirse funcional y anatómicamente en una parte anterior (aPir) y una parte posterior (pPir), cuyo límite puede estimarse observando la aparición de la rama posterior de la comisura anterior (acp, Figura 3.5b). Dado que se ha demostrado

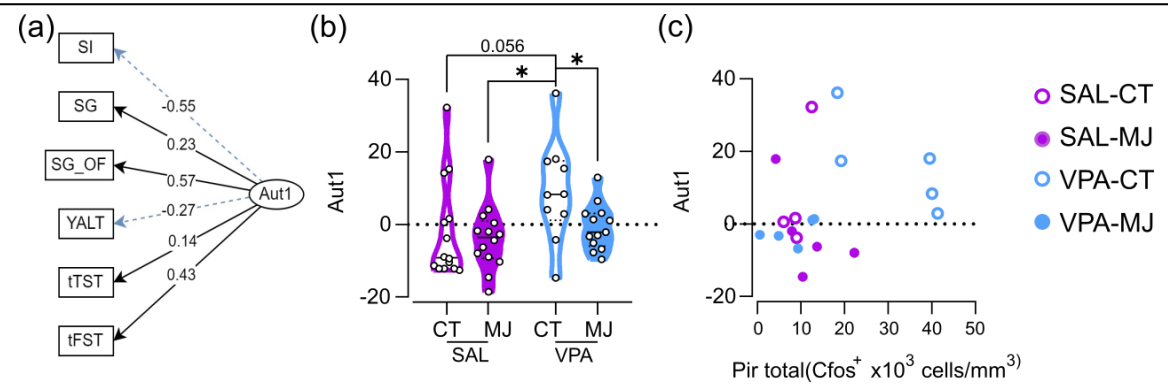




previamente que ambas partes son funcionalmente heterogéneas (Bekkers and Suzuki 2013; Litaudon et al. 2003), se realizó un análisis más exhaustivo de la aPir y la pPir por separado. Se encontraron interacciones significativa entre los tratamientos prenatal y juvenil en ambas porciones de la Pir [aPir:  $F(1, 4.914) = 16.137$ ,  $p = 0.010$ ; Figuras 3.5c,d; pPir:  $F(1, 8.547) = 14.185$ ,  $p = 0.004$ ; Figuras 3.5e,f]. En las comparaciones *post hoc* de ambos análisis se observó que los animales expuestos prenatalmente a VPA presentaron una mayor actividad neuronal y que este aumento fue revertido mediante el procedimiento de manipulación juvenil.

#### 3.4.6. Factor *Aut1*

Para evaluar el comportamiento de cada animal a lo largo de todos los ensayos realizados, llevamos a cabo un análisis factorial donde se analizaron seis variables (índice de sociabilidad, tiempo de acicalamiento en el ensayo de auto-acicalamiento, tiempo de auto-acicalamiento en el ensayo de campo abierto, porcentaje de alternancias en el ensayo de laberinto en Y, tiempo inmóvil en el TST y tiempo inmóvil en el FST) y se extrajo un solo factor al que denominamos *Aut1* (Figura 3.6a). Luego, se analizó el factor *Aut1* obtenido y observamos un efecto significativo de los tratamientos prenatal y juvenil [tratamiento prenatal:  $F(1, 24.629) = 4.389$ ,  $p = 0.046$ ; tratamiento juvenil:  $F(1, 25.188) = 5.780$ ,  $p = 0.023$ ; Figura 3.6b]. Los análisis *post hoc* revelaron que los animales VPA-CT presentan valores de *Aut1* más altos que los tratamientos SAL-MJ y VPA-MJ. Además, observamos que el factor *Aut1* y la actividad neuronal estimada mediante la inmunohistoquímica anti-cFos permiten distinguir a los animales VPA-CT de los animales control (Figura 3.6c). Asimismo, los animales VPA-MJ presentan valores de estos parámetros similares a los animales control, siendo indistinguibles en dicho gráfico.



**Figura 3.6: Efecto del VPA y de la manipulación juvenil en un factor de “Autismo” (Aut1).** (a) Valores de carga de cada uno de los comportamientos en el factor Aut1. Índice de sociabilidad (SI) del ensayo de interacción social, tiempo de acicalamiento del ensayo de auto-acicalamiento (SG), tiempo de acicalamiento en el ensayo de campo abierto (SG\_OF), porcentaje de alternancias en el ensayo de laberinto en Y (YALT), tiempo inmóvil en el ensayo de suspensión por la cola (tTST) y tiempo inmóvil durante los últimos 4 minutos en el ensayo de natación forzada (tFST). (b) Los animales VPA-CT presentan valores de Aut1 mayores a los grupos SAL-MJ y VPA-MJ. Modelo lineal mixto seguido de comparaciones *post hoc* de Tukey, \*  $p < 0.05$ . Los datos se muestran como valores individuales (puntos) y gráfico de violín.  $N_{SAL-CT} = 14$ ,  $N_{SAL-MJ} = 14$ ,  $N_{VPA-CT} = 10$ ,  $N_{VPA-MJ} = 13$ . (c) Los animales VPA muestran una mayor cantidad de marca cFos y valores más altos de Aut1 que los otros grupos. Cada animal está representado por un punto.  $N = 4-5$  por grupo.

### 3.5. Discusión

En este capítulo se observó que los animales expuestos prenatalmente a VPA presentaron alteraciones en la sociabilidad, un aumento en los comportamientos repetitivos, y un incremento en los comportamientos de desesperanza en el ensayo de natación forzada. Se demostró también que el procedimiento de manipulación juvenil fue suficiente para revertir las alteraciones mencionadas en los animales VPA. Esto es trascendente en dos sentidos: por un lado, para generar mayor conciencia y cuidado a la hora de diseñar experimentos que requieran manipulación en edades tempranas y, por otro lado, la identificación de los días P22 a P34 como un período sensible para la modulación y determinación de los niveles de sociabilidad en los animales adultos. Además, en este estudio se pudo identificar a la corteza piriforme como una estructura candidata a mediar las alteraciones en los comportamientos reportados, ya que se observó que los animales VPA presentaron una mayor activación neuronal en la corteza piriforme, mientras que los animales VPA que fueron manipulados durante el período juvenil presentaron niveles de activación neuronal similares a los controles en la Pir. Finalmente, se pudo observar que las alteraciones comportamentales generadas por la exposición a VPA y el rescate observado en los animales VPA-MJ, se vieron reflejados en el factor Aut1, ya que los animales VPA presentaron valores de Aut1 más altos que los controles, mientras que los animales VPA que fueron manipulados presentaron valores de Aut1 similares a los controles.

Previamente nuestro laboratorio demostró que el enriquecimiento social a partir de P21 es suficiente para rescatar las alteraciones en sociabilidad en ratones expuestos prenatalmente a VPA (Campolongo et al. 2018). En este estudio se destetó a los animales VPA con animales SAL, conformando, de esta manera, jaulas mixtas y un ambiente social enriquecido para los animales VPA. Con este modelo, se pudo identificar un período crítico entre el destete y la adultez, cuando comienzan a hacerse los ensayos comportamentales. Lo novedoso de los resultados de este capítulo es que se logró acortar este período previamente señalado como crítico a sólo dos semanas. Previamente, otros estudios señalaron a las semanas cuatro y cinco como un período crítico para las conductas relacionadas a autismo, ya que se observó que animales sometidos a aislamiento durante este período muestran alteraciones en los comportamientos sociales respecto a los controles (Bicks et al. 2020). Por un lado, se reportó que los animales aislados durante el período juvenil mostraron frecuencias de transición diferentes entre comportamientos sociales activos (comportamiento de interacción social iniciada por el ratón experimental) y pasivos (comportamiento de interacción social iniciada por el ratón estímulo) en el ensayo de interacción recíproca. En este mismo trabajo encontraron que las interneuronas parvalbúmina-positivas de la corteza prefrontal muestran distintos patrones

de actividad tanto en los ensayos de interacción recíproca como en el ensayo de interacción social de tres cámaras, respecto a los controles, lo que implica un rol crucial de la experiencia juvenil en el acoplamiento de la actividad de estas neuronas con el acercamiento social activo. Por otro lado, en otro trabajo también se reportó que animales que fueron aislados durante el período juvenil presentaron niveles reducidos en la sociabilidad junto con alteraciones en la mielinización en la corteza prefrontal, donde los oligodendrocitos presentaron una morfología más simple que en los ratones control (Makinodan et al. 2012). Por último, nosotras encontramos alteraciones en la mielinización en la amígdala basolateral y en la corteza piriforme en ratones VPA, pero no en la corteza prefrontal (Graciarena et al. 2019), por lo que la mielinización podría estar contribuyendo a las alteraciones en la conducta observada en los animales VPA. Dados los resultados mencionados, esperaríamos que la manipulación juvenil resulte en alteraciones en la mielinización en la corteza prefrontal y/o revierta las alteraciones en la mielinización resultantes de la exposición prenatal a VPA en las áreas cerebrales mencionadas. Cabe resaltar, sin embargo, que estos estudios no nos permiten descartar si la exposición a un ambiente enriquecido en otros períodos podría también rescatar las alteraciones sociales observadas en los animales VPA.

El protocolo de manipulación proviene de los primeros trabajos de Seymour Levine, en los cuales se observó que manipular los animales durante 2-3 minutos entre los días P2 a P20 conlleva a cambios a largo plazo en la tarea de aprendizaje de evitación (Levine 1956) y en la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) frente a distintos estímulos (Erskine, Stern, and Levine 1975; Levine et al. 1967). Luego, a partir de estos trabajos fundacionales, se publicaron protocolos modificados de manipulación postnatal que consistían en intervenciones de mayor o menor duración, o de menos cantidad de días. Actualmente se refiere a los protocolos de manipulación cuando las crías son separadas de sus madres por períodos breves (de 3 a 15 minutos), generalmente durante el período pre-destete; en cambio, cuando los períodos de separación son más largos (de 3 a 24 horas) se lo suele llamar paradigma de separación materna (Madruga et al. 2006). Cabe destacar que muchos trabajos se refieren tanto a la manipulación postnatal mencionada como a la separación materna como “manipulación postnatal”, por lo que se debe tener cuidado cuando se interpretan resultados ya que existe una amplia variedad de protocolos bajo el mismo nombre. Si bien existen múltiples y variados reportes de los efectos a largo plazo de la manipulación de las crías previa al destete, existe cierto consenso en que los animales manipulados de esta manera presentan menor ansiedad inducida por estrés cuando adultos (Bilbo et al. 2007; Luchetti et al. 2015; Meerlo et al. 1999; Sternberg and Ridgway 2003; Vallée et al. 1997). Se reportó también que la manipulación

postnatal disminuye la sensibilidad al dolor (Sternberg and Ridgway 2003) y mejora la memoria y el aprendizaje espacial (Bilbo et al. 2007).

A diferencia de lo que ocurre con los protocolos de manipulación postnatales, los protocolos de manipulación post-destete se refieren generalmente a los usados para habitar a los animales al operador o la operadora, antes de llevar a cabo un ensayo comportamental, y hay muy poco publicado respecto a los efectos de esta manipulación sobre distintos comportamientos. Se observó que la manipulación en adultos redujo los comportamientos relacionados a la ansiedad en el ensayo de laberinto elevado en cruz y aumentó el número de alternancias en el ensayo de laberinto en Y (Ueno et al. 2020). Se observó, también, que distintos tipos de manipulación, como cambiar los animales de jaula tomándolos de la cola, utilizando un fórceps o transportándolos en un tubo, tuvieron efectos sobre los comportamientos agresivos, donde los animales que fueron transportados tomados de la cola no presentaron eventos de agresión a diferencia de las otras manipulaciones (Mertens et al. 2019). En ese mismo trabajo encontraron, además, que los ratones que fueron transportados con un tubo transcurrieron más tiempo cerca del estímulo social que los animales que fueron transportados entre jaulas mediante un fórceps.

En este capítulo observamos que la manipulación juvenil fue suficiente para rescatar el fenotipo de disminución en la sociabilidad generado por el VPA prenatal. Esto coincide con resultados previos, donde se observó que el enriquecimiento social rescata los niveles de sociabilidad en los animales VPA y en animales BTBR (Campolongo et al. 2018; Yang et al. 2011), y que el ambiente enriquecido durante cuatro semanas, a partir de la cuarta semana de edad, restaura los niveles de sociabilidad en animales VPA (Yamaguchi et al. 2017). Por lo contrario, otro estudio reportó que la manipulación adulta no afecta los comportamientos sociales, cuando la manipulación se lleva a cabo a partir de la décima semana de edad, y no en el período que en este capítulo señalamos como crítico (Ueno et al. 2020).

Otro síntoma relevante para el autismo es la presencia de patrones repetitivos en la conducta. Como se reportó anteriormente (Campolongo et al. 2018), observamos que los animales VPA exhibieron comportamientos repetitivos en el ensayo de auto-acicalamiento. También observamos que los animales sometidos a MJ mostraron una disminución en los comportamientos repetitivos tanto en el ensayo de auto-acicalamiento como en el ensayo de campo abierto. Es interesante observar que un trabajo previo, el enriquecimiento social no fue suficiente para revertir esta alteración (Campolongo et al. 2018). Esto podría deberse a que la interacción con la experimentadora afecta vías diferentes a las que activa la interacción social

entre pares, por lo que el resultado en la manifestación de conductas repetitivas es diferente. Si bien no hay trabajos previos en que se investiguen los efectos de la manipulación post-destete en las conductas repetitivas, se observó que la manipulación pre-destete aumenta la latencia a acicalarse y disminuye el tiempo de acicalamiento en los ensayos de laberinto elevado en cruz, tablero de agujeros e hiponeofagia (Steimer et al. 1998).

Cuando analizamos los comportamientos relacionados a la depresión, observamos que la manipulación juvenil fue suficiente para revertir los niveles aumentados de inmovilidad en el FST observados en animales VPA. Este resultado replica parcialmente un estudio anterior donde se observó que los animales VPA transcurren inmóviles más tiempo que los controles (Campolongo et al. 2018), pero en el cual el enriquecimiento social no revirtió este efecto. Esto puede deberse a lo mismo que discutimos en el párrafo anterior: que se activen vías diferentes con la manipulación juvenil y con el enriquecimiento social. Cabe destacar que hay trabajos previos de manipulación pre-destete donde se observó que este tratamiento, por el contrario, no afecta la inmovilidad en el FST (Papaioannou et al. 2002), lo que pone en evidencia la importancia de analizar con cuidado cada momento en el desarrollo ya que, si bien las ventanas críticas se encuentran temporalmente muy cercanas, la manipulación en los distintos períodos puede devenir en resultados diferentes. Por último, existe otro trabajo donde no vieron alteraciones en el FST luego de la manipulación en adultos (Ueno et al. 2020), lo que resalta nuevamente la importancia del período que señalamos como crítico en la modulación de los comportamientos estudiados.

Es importante discutir que, a diferencia del FST, no encontramos efectos significativos de los tratamientos prenatal o juvenil sobre la inmovilidad en el TST. Un estudio previo demostró que la manipulación en adultos no afecta los comportamientos en el TST (Ueno et al. 2020). Si bien el TST y FST están conceptualmente relacionados, dado que en los dos ensayos se representa una situación de estrés de la cual el animal tiene la opción de intentar escapar o permanecer inmóvil (Porsolt, Le Pichon, and Maurice Jalfre 1977; Steru et al. 1985), probablemente estos ensayos difieran respecto al substrato biológico que subyace a este comportamiento (Cryan et al. 2005). Otra diferencia entre ambos ensayos es que el TST se ve más afectado por la variabilidad inter-individuos, por lo que en general se recomienda utilizar un número de 15 animales por grupo experimental, mientras que para el FST se recomienda un número de 10 animales por grupo. Esto sugiere que quizás no estemos viendo efectos del tratamiento postnatal en el TST por la cantidad de animales que utilizamos en este ensayo (10-15 por grupo), aunque es de notar que tampoco se evidencian tendencias en este sentido. Por último, se ha reportado que ambos ensayos presentan sensibilidades diferentes a distintos

antidepresivos en su efectividad para reducir el tiempo en el que los animales transcurren inmóviles (Cryan et al. 2005), evidenciando diferente sensibilidad farmacológica del FST y el TST. Estas evidencias previas hacen que no sea sorprendente que la MJ haya afectado la inmovilidad en el ensayo de FST, pero no en el TST.

El comportamiento social está regulado por varias estructuras cerebrales que están alteradas en el TEA: el área fusiforme (media la percepción de la identidad de una persona), el giro frontal inferior (permite imitar expresiones faciales), el surco temporal posterior inferior (responsable de la percepción de las expresiones faciales y la mirada), el giro frontal superior (sustrato de la teoría de la mente) y la amígdala (involucrada en el procesamiento de las emociones) (Misra 2014). Además de las áreas mencionadas, que son las que conforman el “cerebro social”, hay otras áreas que se ven alteradas en individuos con autismo. En particular, el autismo está caracterizado por un comportamiento sensorial atípico, por ejemplo, una disminución en los valores de discriminación olfativa (Wicker, Monfardini, and Royet 2016). Estas alteraciones pueden ser explicadas por la distrofia en los axones serotoninérgicos ubicados en la Pir en individuos con TEA (Azmitia et al. 2011). Por otro lado, en roedores sucede que las estructuras cerebrales que subyacen a los comportamientos sociales están muy ligadas al sistema olfatorio. Una de las áreas corticales más grandes del sistema olfatorio en roedores es la corteza piriforme (Haberly 2001). Ésta recibe inervaciones de las células mitrales del bulbo olfatorio y envía proyecciones a otras áreas corticales, tales como la corteza prefrontal, la amígdala y las cortezas perirrinal y entorrinal (Haberly 2001). Previamente se observó un aumento en la expresión de cFos en la Pir en ratones luego de un encuentro social (Ferguson et al. 2001), y un estudio reportó que la liberación de oxitocina en la Pir regula el aprendizaje social (Choe et al. 2016). En esta tesis se pudieron replicar resultados anteriores (Campolongo et al. 2018), ya que observamos un aumento en la actividad neuronal en la Pir en los animales VPA. Además, demostramos que la manipulación juvenil es capaz de revertir los efectos del VPA, resultando en niveles de actividad neuronal en la Pir similares a los de los animales control.

Respecto al factor Aut1 que se extrajo del análisis factorial, se obtuvieron valores altos para los animales VPA-CT y valores significativamente más bajos para los animales VPA que fueron manipulados entre P22 y P34. Este análisis le suma importancia a toda la batería de ensayos, en donde quizás cada ensayo por separado no termina de dar una idea clara de la presencia/ausencia de los fenotipos relacionados al autismo, mientras que, con este factor, se le asigna un valor a cada animal, que da cuenta de la severidad del fenotipo del ratón en los distintos dominios comportamentales. Cabe destacar que, como en el caso del autismo en humanos, los modelos de autismo en roedores no presentan un marcador biológico que facilite

de una manera clara distinguir entre un animal tratado con VPA y un control. Esto se resuelve parcialmente con el factor Aut1, donde, como vemos en la figura 3.6c, la distribución de los animales VPA-CT se ubica mayormente en el cuadrante de arriba a la derecha. Finalmente, este factor cobra importancia también porque es posible hacer correlaciones entre Aut1, que reúne los fenotipos comportamentales, y variables moleculares o celulares de interés que podrían ser candidatas clave en la regulación de los comportamientos relacionados al autismo que se ven alterados en el modelo (como los niveles de expresión de cFos en la corteza piriforme, en este trabajo).

En conclusión, se demostró que es muy importante tener consciencia y cuidado en los diseños experimentales cuando éstos incluyen manipulaciones tempranas, ya que pueden afectar los resultados del análisis de animales adultos. Por otro lado, se logró identificar la ventana temporal en el desarrollo durante la cual es posible actuar sobre el cerebro en desarrollo de forma de afectar la expresión de comportamientos relacionados al autismo en animales adultos. Por último, se observó que la manipulación postnatal pudo revertir las alteraciones observadas en los comportamientos sociales, repetitivos y relacionados a la depresión generados por la exposición prenatal al VPA.



# 4. La exposición temprana al estradiol masculiniza comportamientos relevantes para el TEA en ratones hembra

#### 4.1. Introducción

Si bien las causas de autismo son heterogéneas, como se mencionó en la introducción un factor de riesgo importante es el sexo del individuo, dado que entre 3 y 4 niños se ven afectados por cada niña que presenta este desorden (Elsabbagh 2020; Elsabbagh et al. 2012; Loomes et al. 2017). Los mecanismos que subyacen a esta diferencia entre sexos no son del todo claros, si bien se han propuesto mecanismos genéticos, hormonales e inmunológicos (Ferri, Abel, and Brodtkin 2018; McCarthy and Wright 2017; Schaafsma and Pfaff 2014). En este sentido, se han asociado al autismo con mutaciones y alteraciones transcripcionales en genes localizados en cromosomas sexuales (Nguyen et al. 2020; Schaafsma and Pfaff 2014), con la exposición perinatal a esteroides sexuales (Baron-Cohen et al. 2020; Geier et al. 2012) y a factores inmunológicos (Depino 2013, 2018; Estes and McAllister 2016), y con alteraciones en la expresión de genes involucrados en la función glial e inmune (Voineagu et al. 2011; Werling et al. 2016). En línea con esta evidencia, en roedores se han abordado estos enfoques en distintos modelos de TEA y se han comenzado a desentrañar los mecanismos que subyacen a la diferencia entre sexos en los comportamientos relacionados con el autismo, tales como alteraciones hormonales, alteraciones genéticas en cromosomas sexuales y el papel de las moléculas inmunológicas en la programación del comportamiento adulto (McCarthy and Wright 2017; Schwarz and Bilbo 2012).

Como ya se desarrolló en la introducción, una de las principales diferencias entre los mamíferos hembras y machos es que los machos están expuestos a altos niveles de testosterona y estradiol, producto de la aromatización de testosterona, durante el desarrollo (McCarthy and Wright 2017). Estos esteroides modifican el curso del desarrollo del cerebro ya que alteran la neurogénesis, la muerte celular, la migración, la diferenciación celular, el crecimiento sináptico, la sinaptogénesis y la poda sináptica (McCarthy, 2008). Estas alteraciones, en conjunto, organizan el cerebro de los machos y es lo que se denomina “masculinización del cerebro”. Este proceso es esencial para que los animales muestren un comportamiento sexual apropiado en presencia de una hembra receptiva en la adultez (McCarthy, 2008). Si el gen Sry no se expresa, los animales desarrollan ovarios, por lo que no se producen esteroides sexuales durante el período perinatal y el cerebro se organiza para responder a la presencia cíclica de estrógenos y progesterona en la adultez. Esta organización del cerebro lleva a que las hembras receptoras muestren un comportamiento sexual típico frente al macho.

Hasta la fecha, se sabe muy poco acerca de los efectos de la exposición temprana a estradiol en comportamientos no sexuales. En machos, el tratamiento con estradiol entre P5 y P15, tiene efectos negativos sobre la sociabilidad y los comportamientos repetitivos (Filice et al.

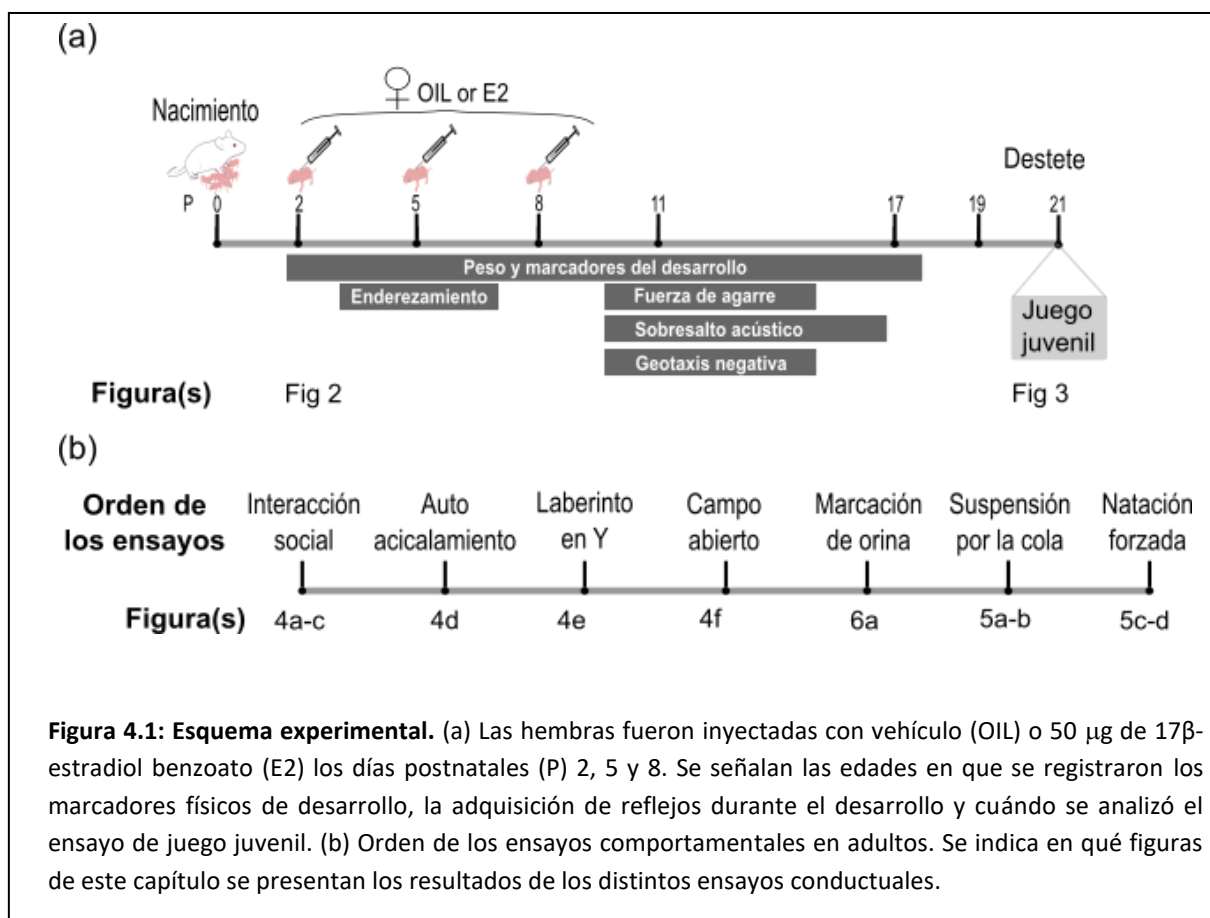
2018). También se reportó que machos inyectados con estradiol en la cisterna magna a P5, muestran un peso reducido en la adultez, una alteración en la reversión de una tarea aprendida y un mayor interés por una novedad social (Macrì et al. 2010). Además, la desregulación de la vía prostaglandina-estradiol durante la segunda semana postnatal afecta el comportamiento juvenil, pero sólo en machos (Hoffman, Wright, and McCarthy 2016). Estos trabajos no sólo han identificado comportamientos que se vieron afectados por la exposición a esteroides perinatales, sino que también han llevado a descubrir redes neurales que se ven afectadas por estas hormonas, como por ejemplo el cerebelo (Hoffman et al. 2016).

Nuestros **objetivos** en este capítulo fueron estudiar las diferencias ligadas al sexo en los comportamientos relevantes para el autismo y evaluar el rol de la masculinización del cerebro en estos comportamientos a través de un modelo de exposición neonatal a estradiol en hembras. Proponemos que, si vemos afectados estos comportamientos, la exposición neonatal a estradiol puede volverse un modelo preclínico relevante para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a este efecto. Además, estos estudios podrían contribuir a aclarar los mecanismos relacionados al sexo que se encuentran alterados en los niños con TEA y/o el mecanismo que lleva a las niñas a ser más resilientes a este desorden.

Para este objetivo, se inyectaron ratonas hembra con 17 $\beta$ -estradiol benzoato (E2) a P2, P5 y P8, un protocolo que se utiliza para masculinizar el cerebro (Villa et al. 2018). Se compararon estos animales con hembras control (OIL) y machos (M) respecto a su desarrollo postnatal y su desempeño en ensayos que evalúan sociabilidad y comportamientos repetitivos, ya que éstos componen los síntomas principales del TEA. Por último, evaluamos los comportamientos relacionados a la ansiedad y la depresión que tienen alta comorbilidad con el TEA (Hofvander et al. 2009; van Steensel, Bögels, and Perrin 2011).

#### 4.2. Diseño experimental

Se utilizaron dos cohortes en este capítulo. La cohorte 1 constó de 8 camadas, de las cuales se eligieron aleatoriamente 4 hembras (2 OIL y 2 E2) y 2 machos, como máximo, por camada para realizar los ensayos postnatales; 8 OIL, 10 E2 y 7 machos (M) fueron evaluados para el juego juvenil; y 12 OIL, 19 E2 y 8 M fueron evaluados en la adultez. De la segunda cohorte, que consistió en 8 camadas, se eligió un macho de cada camada, con los cuales se realizó el ensayo de juego juvenil para sumar individuos a los resultados de la primera cohorte. Los días en los que se llevó a cabo cada tratamiento, así como el orden de los ensayos conductuales en adultos se muestran en la Figura 4.1.



### 4.3 Estadística

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con la ayuda de GraphPad Software (Prism 8, San Diego, EEUU). Para los comportamientos postnatales, realizamos un ANOVA con medidas repetidas con la corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de una prueba LSD de Fisher para realizar las comparaciones múltiples, o ajustamos un modelo mixto con el animal como un factor aleatorio cuando teníamos datos faltantes. Para evaluar la preferencia por el lado social en el ensayo de interacción social, realizamos pruebas t de Student pareadas. Para evaluar si las hembras ciclaban o no, realizamos una prueba de chi cuadrado. Para el resto de los experimentos realizamos un ANOVA de un factor, seguido de la prueba LSD de Fisher para las comparaciones múltiples. En todos los casos se asumió significancia estadística cuando el  $p < 0.05$ . Los datos de este capítulo están disponibles en la base Open Science Foundation: [https://osf.io/ur4mn/?view\\_only=34d9176268594c3caf43293555760cf0](https://osf.io/ur4mn/?view_only=34d9176268594c3caf43293555760cf0).

#### 4.4. Resultados

##### 4.4.1. Comportamiento postnatal

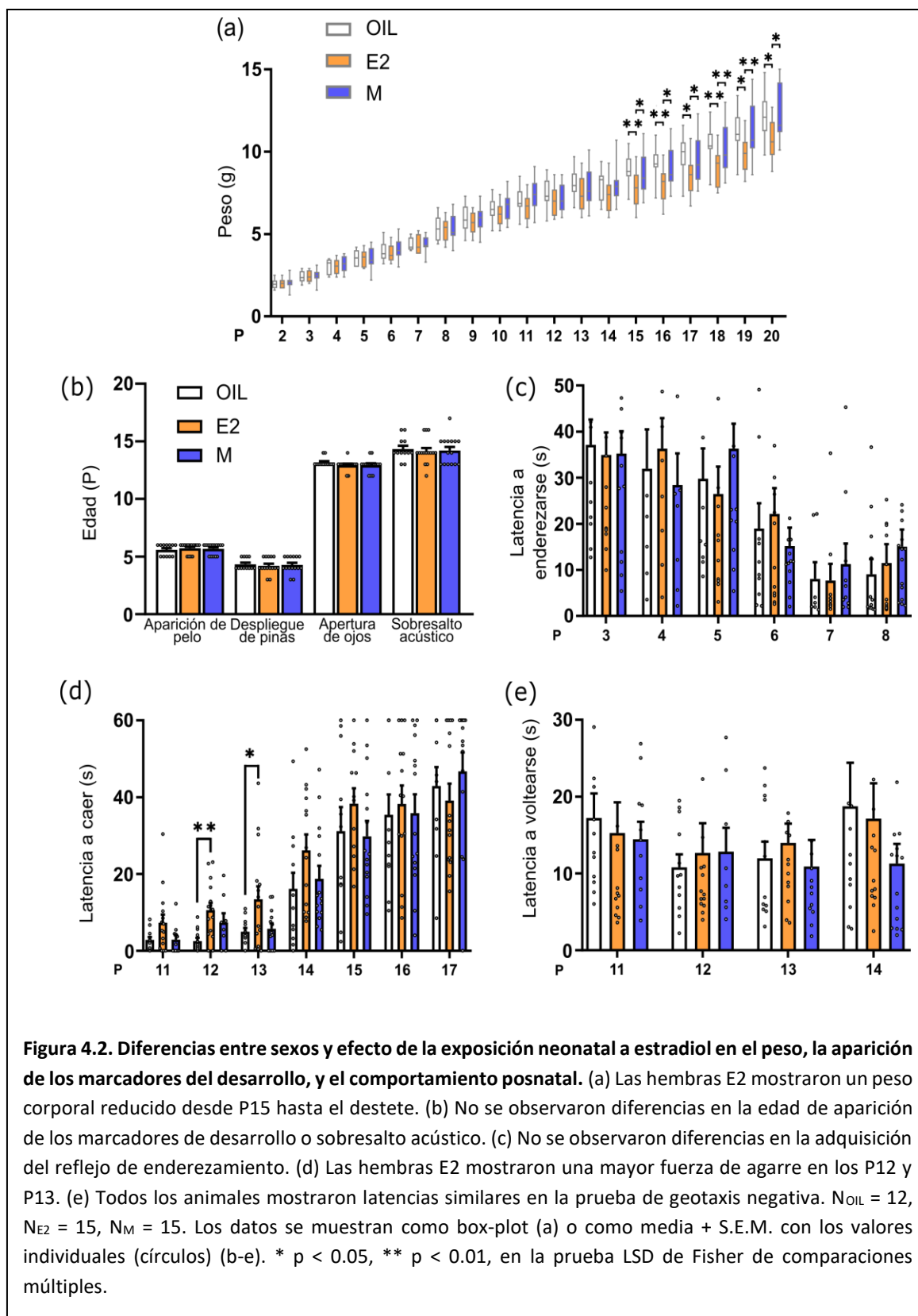
Para evaluar las diferencias debido al sexo en el desarrollo postnatal y los efectos tempranos del E2, primero se pesaron los animales diariamente desde P2 hasta el destete (P21). Se observó un efecto de la edad [ $F(1.21, 41.9) = 1519, p < 0.001$ ] y una interacción entre los grupos y la edad [ $F(36, 625) = 6.19, p < 0.001$ ]. Los análisis *post hoc* arrojaron que las hembras E2 son significativamente más livianas que las hembras control y que los machos entre P15 y P20 (Figura 4.2a). También se determinó la edad en la que aparecieron los principales marcadores del desarrollo, pero no se encontraron diferencias entre los grupos (Figura 4.2b). Todas las crías mostraron aparición de pelo alrededor de P6 [ $F(2, 39) = 0.318, p = 0.729$ ], desplegaron sus orejas en torno a P4 [ $F(2, 39) = 0.145, p = 0.865$ ], y abrieron sus ojos alrededor de P13 [ $F(2, 39) = 0.954, p = 0.394$ ].

Se realizaron ensayos comportamentales para evaluar si había diferencias debido al sexo en la adquisición de varios reflejos, y si el E2 podía tener algún efecto en estos comportamientos. Se observó que todos los animales fueron capaces de oír alrededor de P14 [ $F(2, 39) = 0.108, p = 0.897$ ; Figura 4.2b]. Otro reflejo clave es el reflejo de enderezamiento, que medimos entre los días P3 y P8, ya que se reportó previamente que éste es el período en el que comúnmente se manifiesta este reflejo en CF1 (Kazlauskas et al. 2016). Encontramos que todos los grupos tuvieron latencias similares a enderezarse [ $F(2, 39) = 0.053, p = 0.949$ ] y no observamos interacción entre el tratamiento y la edad [ $F(10, 155) = 0.519, p = 0.875$ ]. Todos los animales aprendieron a enderezarse en el período en que se realizó el testeo, lo cual puede evidenciarse como una disminución de la latencia a medida que crecen [efecto de la edad:  $F(3.86, 120) = 13.8, p < 0.001$ ]; todas las crías alcanzaron las latencias más cortas entre P6 y P8 (Figura 4.2c).

En el análisis de la fuerza de agarre entre P11 y P17 se observó un efecto de la edad [ $F(3.89, 139) = 57.3, p < 0.001$ ; Figura 4.2d], alcanzando las latencias máximas alrededor de P15. En cambio, no se observó un efecto del tratamiento ni del sexo, ni tampoco se observó una interacción entre los grupos y la edad [ $F(12, 214) = 0.838, p = 0.611$ ]. Sin embargo, el análisis *post hoc* arrojó que en los días P12 y P13 las hembras E2 presentaron una mayor latencia a caer que las hembras control.

Finalmente, se midió la latencia a voltearse en el ensayo de geotaxis negativa (Figura 4.2e), donde no se encontró un efecto significativo de la edad [ $F(2.42, 80.6) = 1.12, p = 0.338$ ]

ni diferencias entre los grupos [ $F(2, 38) = 0.388$ ,  $p = 0.681$ ]. La mayoría de los animales voltearon antes de los 20s en este ensayo, lo que sugiere que adquieren esta habilidad antes de P11.



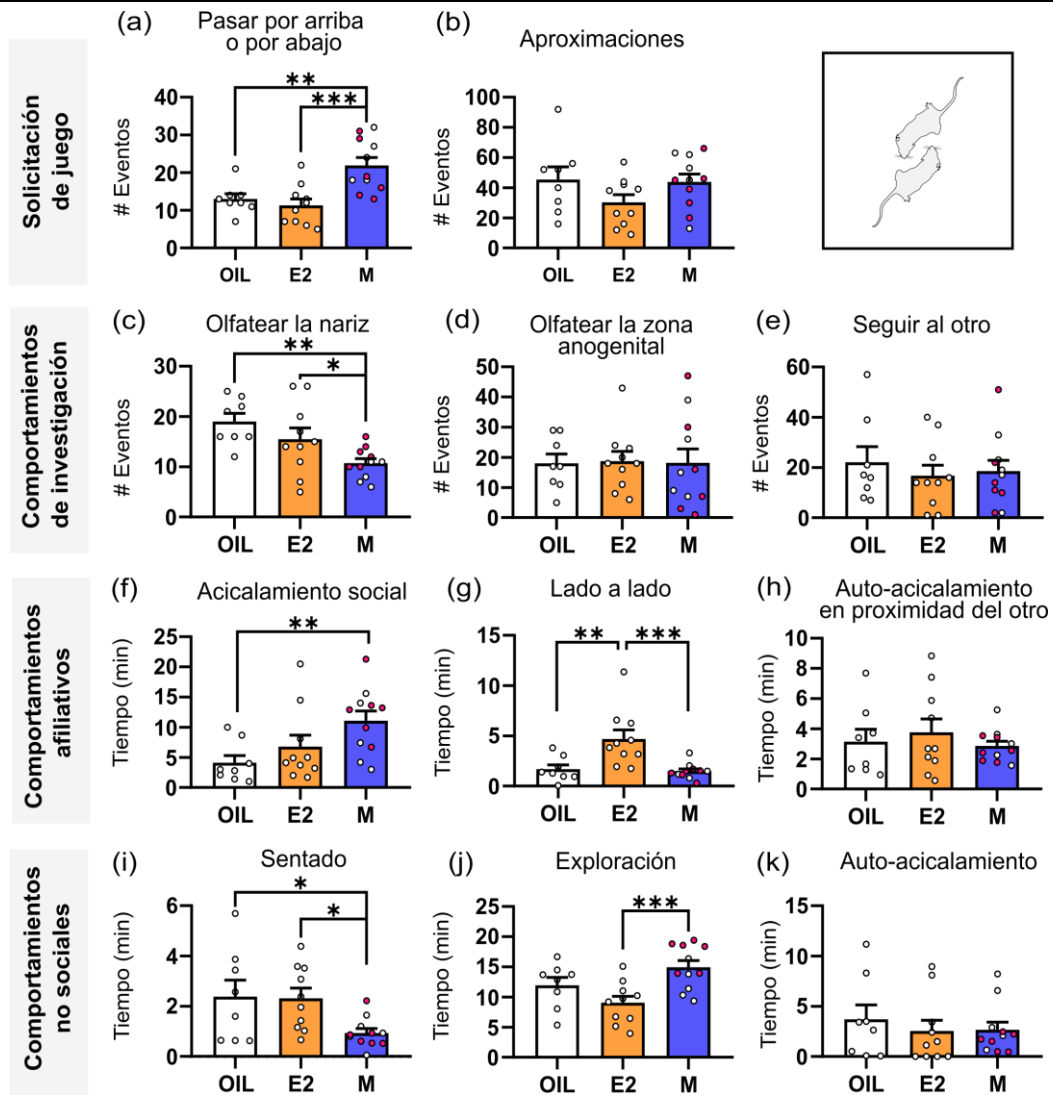
Estos resultados demuestran que la exposición neonatal a estradiol conduce a una disminución en el peso corporal en hembras lactantes, a pesar de que no se observaron diferencias entre sexos.

#### *4.4.2. Juego juvenil*

Para evaluar las diferencias debidas al sexo y el efecto del tratamiento con estradiol neonatal en animales jóvenes, analizamos la interacción entre dos animales de un mismo tratamiento, en P21 y en un campo abierto, cuantificando 11 comportamientos individuales. Respecto a los comportamientos típicos de solicitud de juego, encontramos diferencias significativas entre los grupos en el comportamiento de pasar por arriba o por abajo del compañero [ $F(2, 26) = 10.30, p < 0.001$ ], donde los machos presentaron más eventos de este comportamiento que los demás grupos (Figura 4.3a). Sin embargo, todos los animales mostraron números similares de eventos de aproximación [ $F(2, 26) = 1.873, p = 0.174$ ; Figura 4.3b]. También encontramos diferencias debido al sexo en los comportamientos de investigación debido a que los machos huelen menos la nariz de su compañero que las hembras [ $F(2, 26) = 6.171, p = 0.006$ ; Figura 4.3c]. Por el contrario, no encontramos diferencias entre los grupos en la cantidad de eventos de olfateo anogenital [ $F(2, 26) = 0.008, p = 0.991$ ; Figura 4.3d] y tampoco encontramos diferencias en la cantidad de veces que siguieron a su compañero [ $F(2, 26) = 0.308, p = 0.742$ ; Figura 4.3e].

Respecto a los comportamientos afiliativos, encontramos diferencias entre los sexos y efecto del estradiol. En particular, encontramos diferencias significativas entre los tiempos que los animales se involucraron en acicalamiento social [ $F(2, 26) = 4.330, p = 0.024$ ], observando que los machos pasan más tiempo acicalando a sus compañeros que las hembras OIL (Figura 4.3f). Además, encontramos un efecto significativo del tratamiento en el tiempo en que las parejas transcurren lado a lado [ $F(2, 26) = 9.486, p < 0.001$ ], donde las hembras E2 pasan más tiempo sentadas una al lado de la otra que las hembras OIL y que los machos (Figura 4.3g). Finalmente, todos los animales transcurrieron cantidades de tiempo similares auto-acicalándose en la proximidad de sus compañeros [ $F(2, 26) = 0.489, p = 0.619$ ; Figura 4.3h].

Por último, también encontramos diferencias debidas al sexo en los comportamientos no sociales. Encontramos un efecto del sexo en el tiempo en que los animales transcurren sentados solos [ $F(2, 26) = 4.214, p = 0.026$ ], debido a que los machos estuvieron menos tiempo involucrados en este comportamiento que los dos grupos de hembras (Figura 4.3i). También observamos un efecto significativo del tratamiento en la exploración [ $F(2, 26) = 7.108, p =$



**Figura 4.3: Diferencias entre sexos y efecto de la exposición neonatal a estradiol en el juego juvenil en el día 21 posnatal.** Solicitación de juego: (a) Los machos (M) presentaron más eventos de pasar por arriba o por abajo del compañero que las hembras control (OIL) y las hembras estradiol (E2), y (b) No se observaron diferencias en el número de aproximaciones. Comportamientos de investigación: (c) Los machos presentaron menos eventos de olfateo nasal que las hembras, y todos los animales mostraron cantidades similares de (d) olfateo de la zona anogenital y (e) eventos de seguimiento. Comportamientos afiliativos: (f) Los machos mostraron un mayor acicalamiento social que las hembras control, (g) Las hembras E2 pasaron más tiempo lado a lado que las hembras y los machos de control, y (h) Todos los animales transcurrieron una cantidad similar de tiempo acicalándose a sí mismos en cercanía de sus compañeros. Comportamientos no sociales: (i) Los ratones macho pasaron menos tiempo sentados solos que las hembras, y (j) más tiempo explorando que los animales E2, mientras que (k) todos los ratones pasaron una cantidad similar de tiempo acicalándose.  $N_{OIL} = 8$ ,  $N_{E2} = 10$ ,  $N_M = 11$ . \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  en la prueba LSD de Fisher de comparaciones múltiples. Los datos se muestran como media + S.E.M. y valores individuales (círculos). Los puntos rojos son los valores de los machos de la segunda cohorte. Arriba a la derecha se observa un diagrama de la prueba de juego juvenil.



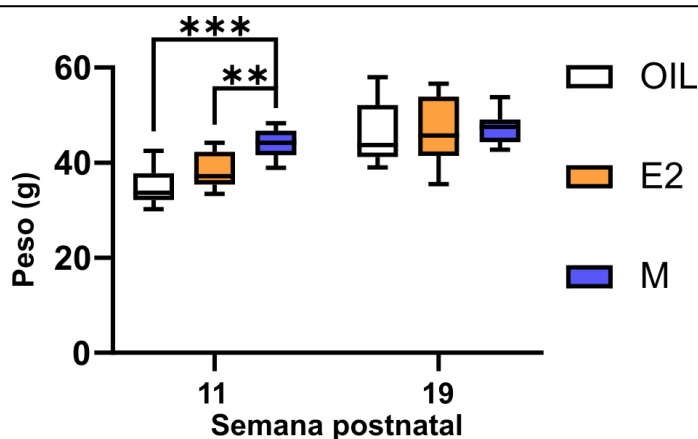
0.003], ya que los machos pasan más tiempo explorando que las hembras E2 (Figura 4.3j). Todos los grupos transcurrieron cantidades de tiempo similares involucrados en el comportamiento de auto-acicalamiento [ $F(2, 26) = 0.328$ ,  $p = 0.722$ ; Figura 4.3k].

Estos resultados muestran que los ratones presentan diferencias debido al sexo en el comportamiento social al momento del destete, y que el E2 neonatal sólo presenta efectos sutiles en este comportamiento.

#### 4.4.3. Ensayos comportamentales en adultos

##### Control de pesos

Para controlar el normal desarrollo de los animales, todos los ratones fueron pesados luego del primer ensayo comportamental (semana postnatal 11) y luego del último (semana postnatal 19) (Figura 4.4). Encontramos una interacción significativa entre las semanas postnatal analizadas y el sexo [ $F(2, 36) = 7.54$ ;  $p = 0.002$ ] ya que cuando se evaluó el primer ensayo comportamental en adultos, las hembras pesaban menos que los machos, mientras que en la semana 19, todos los grupos presentan pesos similares. De esta manera, las hembras E2, que en el destete pesaban menos que los demás grupos, ya no mostraron bajo peso en la adultez, lo que significa que el estradiol no presentó consecuencias a largo plazo en este parámetro.



**Figura 4.4:** Las diferencias debidas al sexo en el peso corporal al comienzo de los ensayos comportamentales en adultos se pierden al final de los experimentos. Los animales se pesaron después del ensayo de interacción social y después de las pruebas de natación forzada. \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$  en la prueba LSD de Fisher de comparaciones múltiples.  $N_{OIL} = 12$ ,  $N_{E2} = 19$ ,  $N_M = 8$ . Los datos se muestran como diagrama de caja con bigotes.

### **Comportamientos sociales**

Para estudiar a fondo las diferencias entre sexos en los comportamientos relevantes al autismo, así como también el efecto del estradiol postnatal, se llevó a cabo una batería de ensayos comportamentales en animales adultos (Figura 4.1b). Primero evaluamos los parámetros relacionados con la sociabilidad (Figuras 4.5a-c). Todos los animales mostraron niveles similares de exploración durante la fase de habituación [ $F(2, 73) = 1.985$ ,  $p = 0.145$ ], y no mostraron preferencia por ninguno de los lados durante esta fase [Prueba *t* de *Student* pareada, OIL:  $t(11) = 1.046$ ,  $p = 0.318$ ; E2:  $t(17) = 0.579$ ,  $p = 0.570$ ; M:  $t(7) = 1.462$ ,  $p = 0.187$ ; Figura 4.5a]. Durante la fase social del ensayo de interacción social, todos los animales prefirieron el estímulo social por sobre el objeto [Prueba *t* de *Student* pareada, OIL:  $t(11) = 6.054$ ,  $p < 0.001$ ; E2:  $t(17) = 8.373$ ,  $p < 0.001$ ; M:  $t(7) = 7.514$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 4.5b]. Además, no se encontraron diferencias significativas en el índice de sociabilidad [ $F(2, 35) = 0.671$ ,  $p = 0.518$ ; Figura 4.5c].

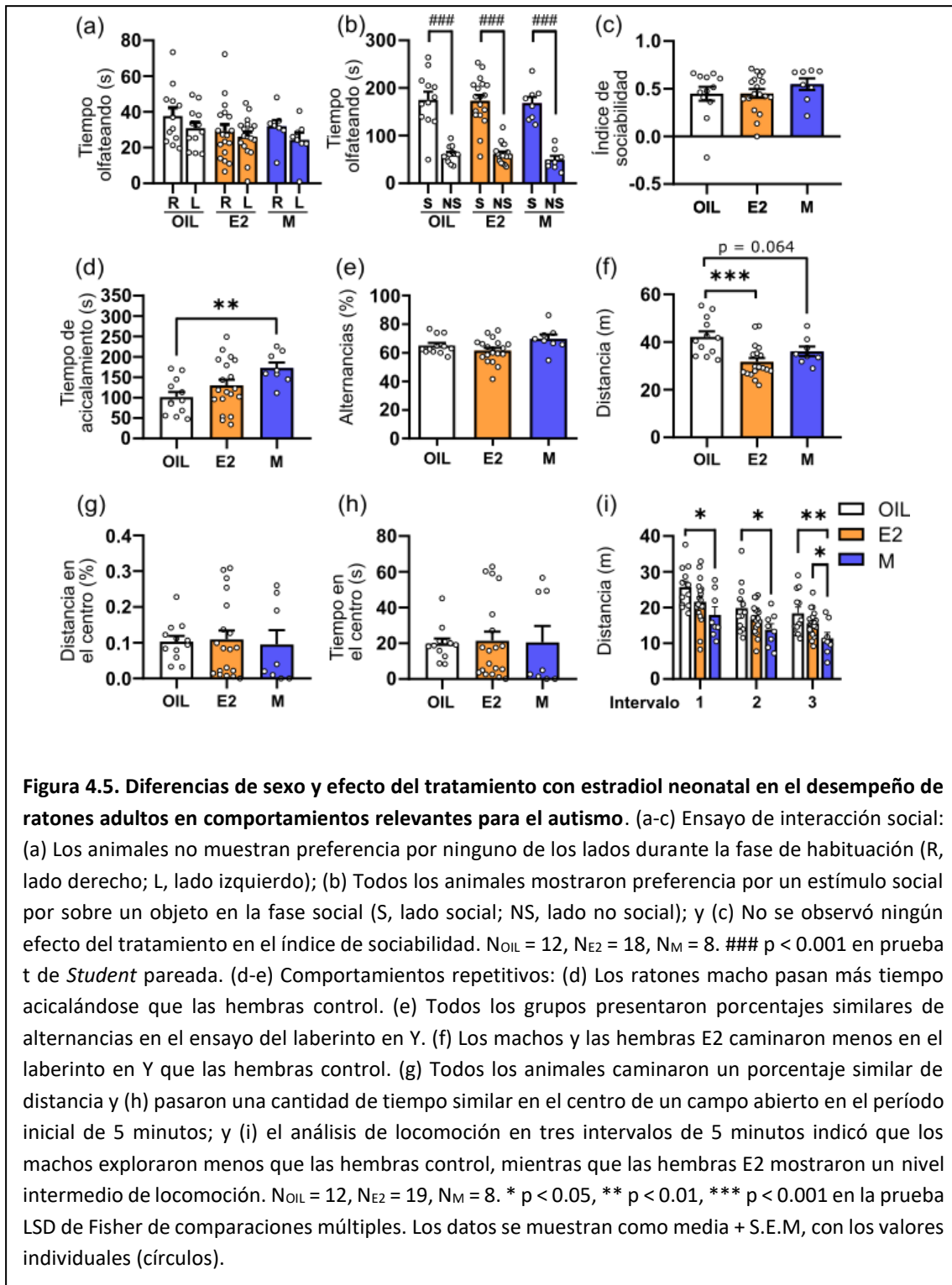
### **Patrones repetitivos en la conducta**

Luego se evaluaron las diferencias debidas al sexo en la expresión de patrones repetitivos en la conducta, utilizando los ensayos de auto-acicalamiento y de laberinto en Y. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en el tiempo en que los ratones transcurrieron acicalándose [ $F(2, 36) = 4.355$ ,  $p = 0.020$ ; Figura 4.5d]. En la comparación *post hoc* se observó que los machos pasaron más tiempo acicalándose que las hembras control, mientras que las hembras E2 presentaron niveles intermedios para este comportamiento. En el análisis del porcentaje de alternancias en el ensayo de laberinto en Y, el ANOVA, si bien presentó una tendencia, no fue significativo [ $F(2, 36) = 3.087$ ,  $p = 0.058$ ]. También observamos diferencias entre tratamientos en la distancia total recorrida en el ensayo de laberinto en Y [ $F(2, 36) = 8.748$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 4.5e], donde el análisis *post hoc* arrojó que las hembras E2 recorrieron menor distancia que las hembras OIL y se observó una tendencia en los machos a recorrer menos distancia que las hembras control. Estos resultados muestran que los machos presentaron patrones repetitivos en la conducta, y que el estradiol postnatal tiende a masculinizar este comportamiento en las hembras.

### **Comportamientos relacionados a la ansiedad**

Para evaluar los comportamientos relacionados a la ansiedad, llevamos a cabo el ensayo de campo abierto. Durante los primeros 5 minutos, todos los ratones mostraron similares porcentajes de distancia recorrida en el centro [ $F(2, 36) = 0.064$ ,  $p = 0.937$ ; Figura 4.5g] y

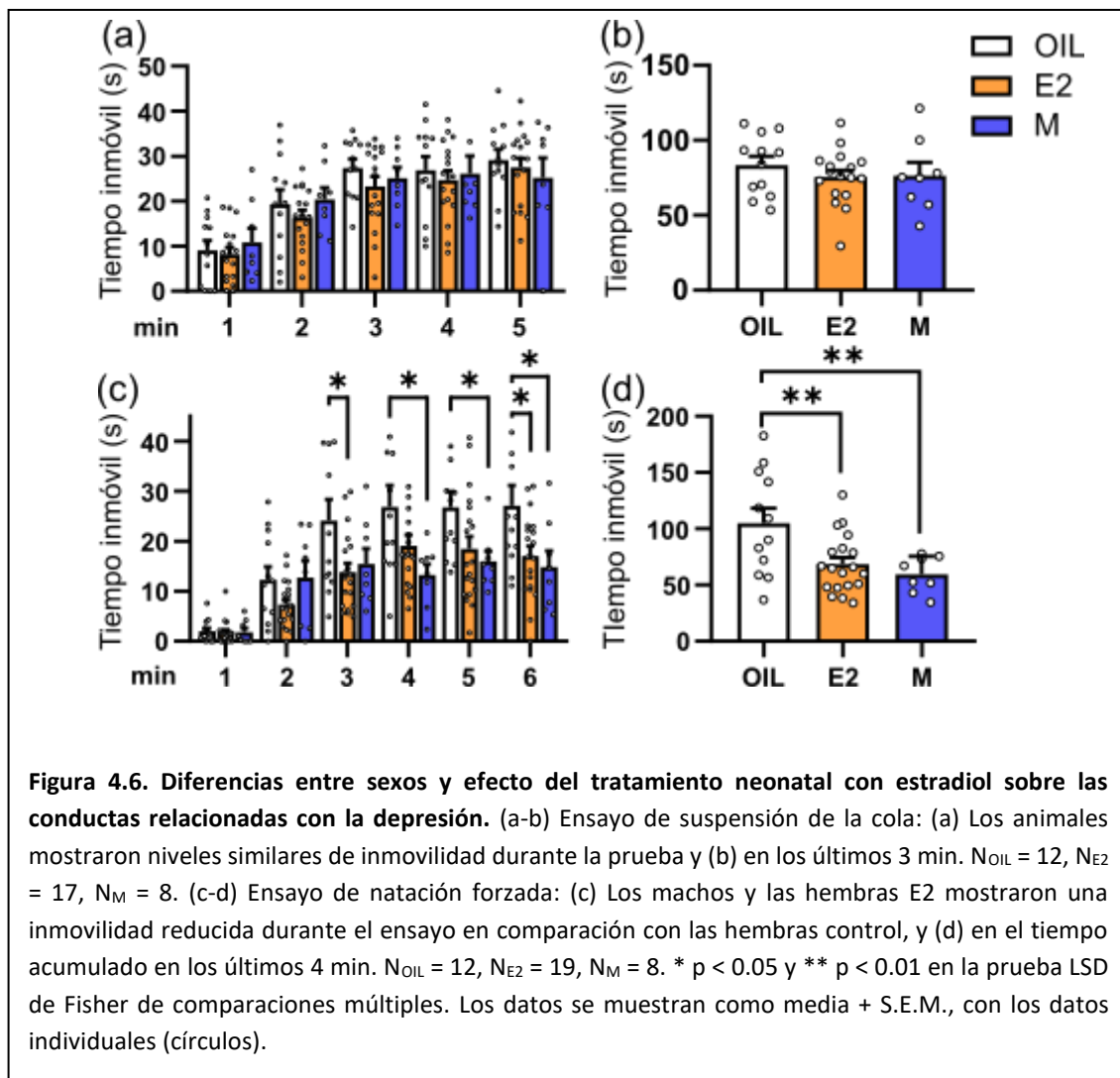
transcurrieron similares cantidades de tiempo en el centro de la arena [ $F(2, 36) = 0.023$ ,  $p = 0.977$ ; Figura 4.5h]. Se encontró un efecto del sexo en la distancia total recorrida a lo largo de los 15 minutos del ensayo de campo abierto [ $F(2, 36) = 4.840$ ,  $p = 0.013$ ; Figura 4.5i] donde los machos caminaron menos que las hembras control en todos los intervalos de 5 min. Las hembras E2 caminaron niveles intermedios en los primeros dos intervalos mientras que en el último intervalo exploraron significativamente más que los machos. Finalmente, todos los animales se



habituaron al campo abierto, ya que se obtuvo un efecto significativo del tiempo [ $F(1.54, 55.5) = 65.2, p < 0.001$ ] y no se observó una interacción entre los grupos y el tiempo [ $F(4, 72) = 0.504, p = 0.733$ ]. Estos resultados, junto con los del laberinto en Y, demuestran que los machos exploran menos que las hembras y que se pudo masculinizar este comportamiento con el estradiol neonatal.

### **Conductas relacionadas a la depresión**

Para evaluar conductas relacionadas con la depresión, se llevaron a cabo los ensayos de natación forzada (FST) y de suspensión por la cola (TST) mencionados en el capítulo anterior. En el TST, todos los animales permanecieron inmóviles cantidades de tiempo similares (Figura 4.6a) y se observó un efecto del tiempo, donde todos los animales aumentaron el tiempo que transcurrieron inmóviles a lo largo del ensayo [ $F(3.347, 113.8) = 37.930, p < 0.001$ ], pero no se encontró una diferencia significativa entre los grupos [ $F(2, 34) = 0.576, p = 0.568$ ] ni una interacción entre el tratamiento y el tiempo [ $F(8, 136) = 0.441, p = 0.894$ ]. Además, no se observaron diferencias entre los grupos en el período final de 3 a 5 minutos [ $F(2, 34) = 0.577, p = 0.567$ ; Figura 4.6b]. Por el contrario, en el FST no sólo encontramos un efecto del tiempo [ $F(3.77, 136) = 32.2, p < 0.001$ ], sino también una diferencia significativa entre los grupos [ $F(2, 36) = 5.820, p = 0.007$ ] y una interacción entre los grupos y el tiempo [ $F(10, 180) = 2.040, p = 0.031$ ]. En el análisis *post hoc* se observó que los machos pasan menos tiempo inmóviles que las hembras control, mientras que las hembras E2 muestran un comportamiento de desesperanza similar al de machos (Figura 4.6c). También encontramos un efecto del tratamiento en el tiempo en que los animales transcurrieron inmóviles durante los últimos 4 minutos del ensayo [ $F(2, 36) = 6.341, p = 0.004$ ; Figura 4.6d], ya que los machos y las hembras E2 se movieron menos que las hembras control. Todos estos datos, en conjunto, muestran que los ratones presentaron diferencias debidas al sexo en el FST, pero no en el TST, y que la exposición neonatal a E2 masculinizó este comportamiento en las hembras.



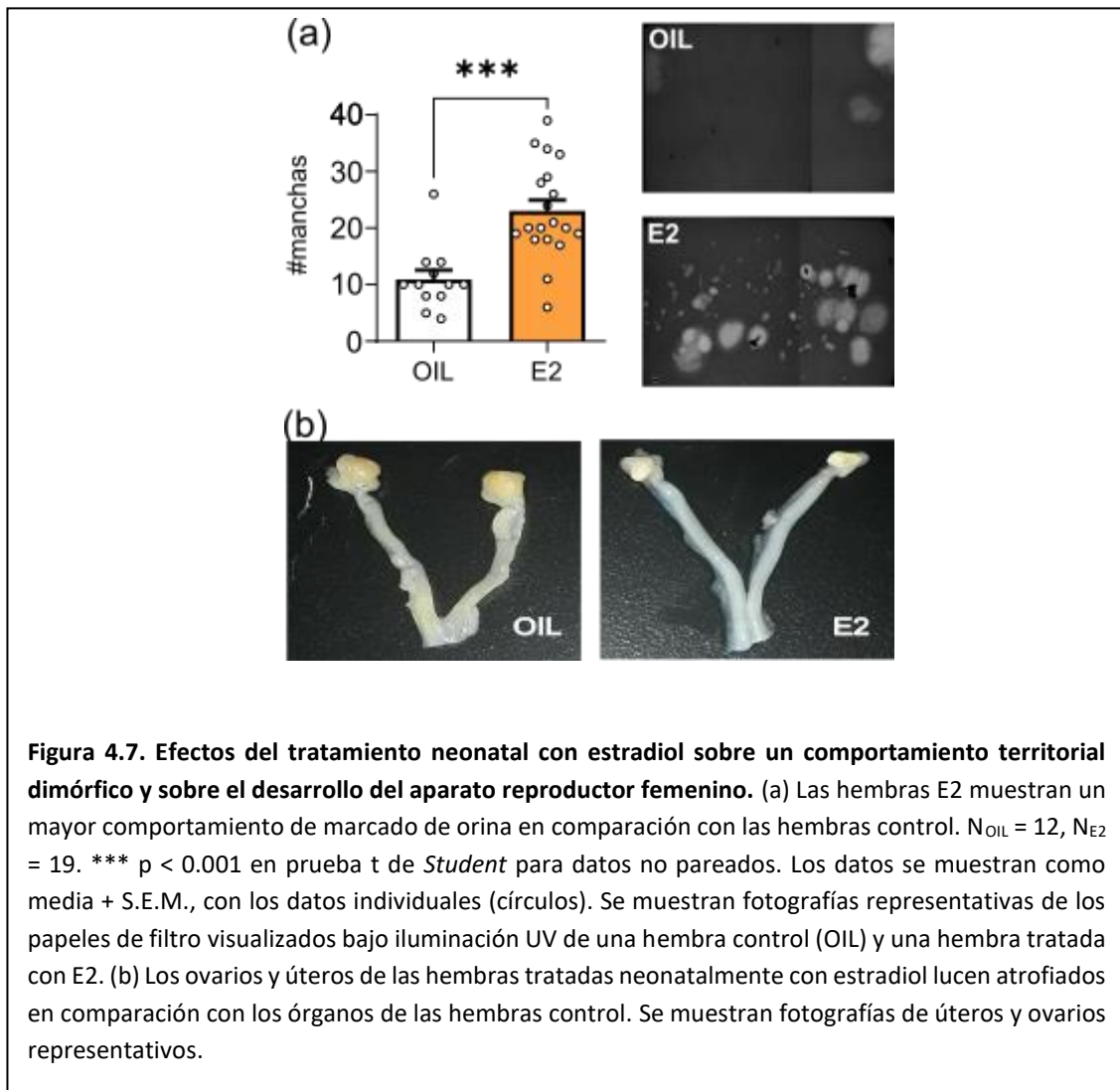
#### 4.4.4. Efecto del E2 neonatal en la masculinización

Finalmente evaluamos si el protocolo neonatal de exposición a E2 conduce a la masculinización del cerebro y si altera el desarrollo de los órganos reproductivos femeninos. Para este objetivo, llevamos a cabo el ensayo de marcación de orina dentro de la batería de ensayos que se llevaron a cabo en los animales adultos (Figura 4.1b). Este ensayo permite evaluar el comportamiento de territorialidad. Además, para estudiar el efecto del E2 sobre el desarrollo del sistema reproductor evaluamos el ciclo estral y el desarrollo de los ovarios y el útero luego de 5 días de terminados los ensayos conductuales.

En el comportamiento territorial se pudo observar que las hembras E2 esparcieron muchas gotas de orina por todo el piso de la jaula, mientras que las hembras OIL orinaron principalmente cerca del perímetro de la jaula [ $t(29) = 4.378$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 4.7a].

Además, las hembras E2 exhibieron un ciclo estral alterado (hembras ciclando: OIL, 8 de 12; E2, 1 de 18; prueba exacta de Fisher:  $p < 0.001$ ) y sus ovarios se observaban atrofiados, de color pálido y más pequeños, que los de las hembras OIL (Figura 4.7b).

Estos resultados muestran que el estradiol neonatal lleva a que las hembras se masculinicen en cuanto a su comportamiento territorial, y que el desarrollo de su función reproductora se vea profundamente afectado.



#### 4.5. Discusión

Los resultados de este capítulo muestran diferencias debido al sexo en los comportamientos relacionados al autismo, la exploración y conductas relacionadas a la depresión. Resulta interesante que estas diferencias se reducen cuando las hembras son tratadas con E2 en el período neonatal. En particular, la exposición neonatal de las hembras a estradiol resultó en un aumento en los comportamientos repetitivos, redujo la exploración y aumentó la inmovilidad en el ensayo de natación forzada, mientras que la sociabilidad y los comportamientos relacionados a la ansiedad no se vieron alterados. También se comprobó que el tratamiento neonatal con estradiol es suficiente para que las hembras masculinicen su comportamiento territorial y para que su sistema reproductivo se altere.

Hemos demostrado previamente que la exposición prenatal a VPA reduce la sociabilidad en roedores, pero sólo en los machos (Kazlauskas et al. 2019). A partir de este resultado se quisieron investigar las diferencias entre los sexos en los comportamientos relacionados con el autismo y qué mecanismos subyacen a este sesgo. Dado que el proceso de masculinización es necesario para que los machos muestren una conducta sexual apropiada en adultos y, por el contrario, la ausencia de la exposición a hormonas gonadales lleva a que las hembras exhiban lordosis cuando adultas, se apuntó a analizar el impacto de las hormonas gonadales en los comportamientos relacionados al autismo.

Encontramos que el comportamiento social fue similar entre machos y hembras, y que la exposición a E2 tampoco afectó este comportamiento. Sin embargo, sí observamos que los machos presentaron más solicitud de juego en el comportamiento juvenil (Figura 4.3a). Este resultado se condice con trabajos previos en donde se analiza el juego juvenil en ratas [revisado en (Auger and Olesen 2009)]. Sin embargo, en ratones, el comportamiento social juvenil es heterogéneo ya que depende, en gran medida, de la cepa analizada. Por ejemplo, en la cepa C57BL/6J se encontró que los machos presentan menor solicitud de juego que las hembras (Cox and Rissman 2011), mientras que en los ratones Swiss CD-1 las hembras mostraron niveles más altos de interacción social y de juego (Terranova, Laviola, and Alleva 1993). Más allá de la heterogeneidad reportada en las distintas cepas, es interesante notar que hay diferencias debidas al sexo en el juego juvenil en todas las cepas estudiadas, sugiriendo un rol de las hormonas gonadales y/o de los cromosomas sexuales en estos comportamientos.

Para distinguir entre los efectos hormonales y/o de cromosomas sexuales, Cox y Rissman (Cox and Rissman, 2011) evaluaron los comportamientos sociales juveniles en un modelo de 4 genotipos (*Four-core genotype*) y encontraron que los machos XY presentaron una mayor solicitud de juego que los demás grupos, sugiriendo un rol importante tanto del genotipo

sexual como de la exposición perinatal a hormonas gonadales. Nuestro trabajo evidencia que el tratamiento con E2 no es suficiente para que las hembras se comporten como los machos en los comportamientos de solicitud de juego. De la misma manera, en otros comportamientos en donde los machos se comportaron distinto a las hembras (Figuras 4.3c, 4.3f y 4.3i), las hembras E2 se comportaron más parecido a las hembras OIL que a los machos. Esto podría significar que el E2 neonatal no determina el comportamiento social juvenil. Sin embargo, no podemos descartar que esta falta de efecto se deba a la baja dosis de E2 (5µg) utilizada en estos experimentos. De hecho, en otros trabajos no se observaron efectos en el juego juvenil cuando las ratas fueron inyectadas con 5 µg de 17β-estradiol benzoato en P1 y P2 (Meaney and Stewart 1981). Por el contrario, las ratas hembra tratadas con dosis más altas de estradiol (100µg) mostraron niveles masculinizados en el juego juvenil (Olesen et al. 2005). En línea con estos resultados, se observó que el tratamiento neonatal con propionato testosterona (Hotchkiss et al. 2003; Thor and Holloway 1986) o con un agonista del receptor de estrógeno, el bisfenol A (Dessi-Fulgheri, Porrini, and Farabollini 2002), devinieron en niveles de juego masculinizados en ratas. Asimismo, la exposición a antagonistas del receptor de andrógeno, como la vinclozolina y la flutamida (Hotchkiss et al. 2003; Meaney et al. 1983) resultó en una reducción en el juego en machos. Toda esta evidencia sugiere que la organización del juego social involucra tanto receptores de andrógenos como de estrógenos, y se presume que existe un umbral o un período ventana en el cual los esteroides sexuales exógenos afectan el comportamiento social juvenil.

Además de presentar alteraciones en la sociabilidad, otro fenotipo clave del autismo es la expresión de comportamientos estereotipados y repetitivos, y la presencia de intereses restringidos (Silverman, Yang, et al. 2010). En roedores, se ha reportado previamente que los animales expuestos prenatalmente a VPA transcurren más tiempo acicalándose en el ensayo de auto-acicalamiento y alternan menos en el laberinto en Y que los ratones control (Campolongo et al. 2018). De la misma manera, en otros modelos de autismo se observó también la presencia de comportamientos repetitivos (Kirsten et al. 2012; Naviaux et al. 2014; Peça et al. 2011; Silverman, Tolu, et al. 2010). En este capítulo encontramos que los machos transcurrieron acicalándose más tiempo que las hembras control, mientras que las hembras E2 exhibieron niveles intermedios de acicalamiento. El acicalamiento es un comportamiento innato que es relevante para distintos procesos fisiológicos y se ve aumentado en distintos modelos del TEA [revisado en (Kalueff et al. 2016)]. En ratas, se ha observado un aumento en el comportamiento de acicalamiento en machos respecto a las hembras (Moore 1986a; Thor et al. 1988), pero el efecto de la exposición neonatal a esteroides sexuales no está muy estudiado. Nuestros resultados muestran que el sexo afecta los niveles de acicalamiento en adultos, ya que los



machos pasan más tiempo acicalándose que las hembras OIL. Nuestros resultados también sugieren que hay una contribución parcial del E2 neonatal en la diferencia observada entre sexos en este comportamiento, ya que las hembras E2 muestran tiempos de auto-acicalamiento intermedios (Figura 4.5d). Sin embargo, la administración de 500 µg de testosterona propionato a hembras en P0 no tuvo efecto en el tiempo de acicalamiento (Moore 1986b), por lo cual este resultado debe ser estudiado en más profundidad. En resumen, la exposición neonatal a E2 puede afectar los circuitos cerebrales involucrados en las conductas repetitivas y el estudio de este mecanismo podría echar luz sobre los mecanismos que subyacen a patologías que presentan comportamientos repetitivos, como el TEA, el trastorno obsesivo compulsivo o el síndrome de Tourette.

A diferencia del TEA, la depresión tiene una mayor prevalencia en mujeres que en hombres (American Psychological Association (APA) 2013). Sin embargo, las diferencias entre sexos en los modelos animales de depresión siguen siendo controvertidas, y los niveles de depresión parecieran depender de la especie, la cepa estudiada, el ensayo que se utiliza y la fase del ciclo estral durante la cual se evalúa el comportamiento. En este capítulo llevamos a cabo dos ensayos que evalúan comportamientos relacionados con la depresión y que son sensibles a los tratamientos antidepresivos y ansiolíticos: el ensayo de suspensión por la cola (TST) y el ensayo de natación forzada (FST) (Nagatani et al. 1987; Porsolt, Bertin, et al. 1977; Porsolt, Le Pichon, and M Jalfre 1977; Steru et al. 1985). Encontramos diferencias entre sexos en el tiempo transcurrido inmóvil en el FST, pero no en el TST. Nuestros resultados siguen la línea de trabajos previos (Gómez et al. 2014) en donde encontró una mayor inmovilidad en ratas macho en el FST, aunque también se ha informado una mayor inmovilidad en ratas hembra (Kokras et al. 2012). Curiosamente, el tratamiento con E2 neonatal no tuvo ningún efecto en el desempeño de las ratonas en el TST, pero sí masculinizó los niveles de inmovilidad en el FST. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de efectos del E2 neonatal sobre los comportamientos relacionados con la depresión en adultos, si bien existen trabajos previos donde se evaluó la conducta de desesperanza en animales tratados perinatalmente con testosterona propionato (TP). En línea con nuestros resultados, dichos trabajos muestran que el tratamiento neonatal con TP no fue suficiente para masculinizar el comportamiento de los ratones hembra en el TST (Goel and Bale 2008), mientras que las ratas hembra masculinizadas con TP mostraron una reducción de la inmovilidad en el FST, pero sólo si los animales eran gonadectomizados (Gómez et al. 2014). En comparación con nuestros resultados, la importancia de la gonadectomía para observar diferencias en el FST podría deberse a diferencias en los protocolos de masculinización utilizados. La dosis baja de TP utilizada (60 µg/rata solamente en P5) podría masculinizar

parcialmente las estructuras cerebrales involucradas en el comportamiento de desesperanza y/o dejar los ovarios parcialmente funcionales. Además, en roedores, el E2 puede ser más efectivo para masculinizar el cerebro que TP, debido a las diferentes vías que subyacen a la activación de los receptores de andrógenos y estrógenos, mediada por aromatasa [revisado en (McCarthy, 2008)]. Por último, no podemos descartar que esta diferencia se deba a que los experimentos fueron llevados a cabo en especies distintas.

También encontramos diferencias ligadas al sexo en la locomoción, ya que los machos caminaron menos que las hembras control en el laberinto en Y y en el campo abierto. Estos resultados van en la misma línea que otros estudios previos donde se observó que las hembras son más activas que los machos en el campo abierto (Masur, Schutz, and Boerngen 1980; Palanza 2001; Ponzi et al. 2020) y en el ensayo de interacción social (Johnston and File 1991). Asimismo observamos que las hembras tratadas con E2 masculinizaron los niveles de exploración, un efecto que también se observó en estudios previos (Gioiosa et al., 2007, Quadagno et al., 1972).

Cabe destacar que las diferencias observadas en exploración no se correlacionan con alteraciones en los niveles de ansiedad, ya que no se observaron diferencias entre los grupos en el porcentaje de distancia recorrida en el centro, ni en el tiempo que los animales pasan en el centro del campo abierto. Estos resultados confirman trabajos previos en los cuales demostraron que la exposición temprana a TP no afecta los comportamientos relacionados a la ansiedad en el ensayo de preferencia por luz/oscuridad (Goel and Bale 2008), ni en los comportamientos exploratorios espontáneos (Heredia et al. 2014).

Finalmente, no observamos diferencias entre los sexos en los comportamientos postnatales, si bien observamos un efecto transitorio del E2 neonatal sobre la ganancia de peso, ya que las hembras E2 presentaron un peso menor que los demás grupos al momento del destete. Estos resultados difieren de un estudio previo donde se muestra que la inyección de 100 µg de E2 en P1 da como resultado un peso corporal bajo de larga duración en ratones macho C57BL/6J, pero no afecta el peso corporal de las hembras (Connelly et al. 2015). Consideramos que la diferencia puede radicar en las inyecciones posteriores realizadas en nuestro estudio (en P5 y P8) y/o en la cepa utilizada.

En resumen, los resultados presentados aquí muestran que existen diferencias entre los sexos en comportamientos relacionados con el TEA y que el tratamiento con E2 neonatal puede masculinizar algunos de estos comportamientos. Esta evidencia es relevante para nuestra comprensión de los procesos biológicos afectados en el TEA y respalda algunas hipótesis sobre

el papel de la exposición perinatal a los esteroides sexuales en el desarrollo del TEA (Baron-Cohen et al. 2020). Además, dado que muchos disruptores endócrinos actúan como agonistas del receptor de estradiol (por ejemplo, el bisfenol A y los fitoestrógenos), nuestros resultados respaldan un posible papel de estos compuestos en el desarrollo de trastornos psiquiátricos. Cabe mencionar que nuestros resultados también sugieren que la resiliencia femenina al TEA y su mayor susceptibilidad a la depresión pueden depender de la falta de exposición neonatal a los esteroides sexuales. Estudios futuros apuntarán a identificar los mecanismos neuronales que subyacen a estos efectos, una búsqueda que podría ayudar a comprender la fisiopatología de estos trastornos y desarrollar nuevos tratamientos.

# 5. Efectos de la exposición combinada de ácido valproico prenatal y estradiol postnatal sobre la conducta de animales hembras

## 5.1. Introducción

En el capítulo anterior encontramos que la exposición neonatal de las hembras a esteroides sexuales resultó en un aumento en los comportamientos repetitivos, redujo la exploración y aumentó la desesperanza, mientras que la sociabilidad y los comportamientos relacionados a la ansiedad no se vieron alterados. Si bien no se observaron cambios en la sociabilidad y la presencia de fenotipos relacionados con el autismo no fueron muy robustos, el capítulo anterior nos permitió demostrar que las hormonas gonadales pueden regular comportamientos relevantes para el TEA, como por ejemplo los comportamientos repetitivos.

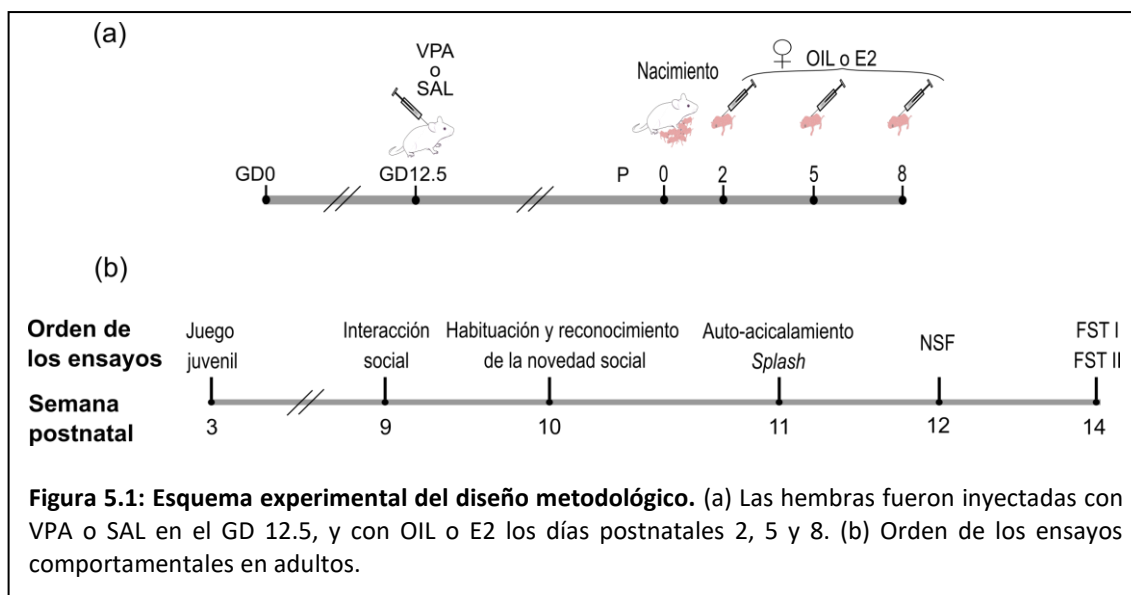
Por otro lado, demostramos previamente que la exposición prenatal en el día de gestación 12.5 a 600 mg/kg de VPA da como resultado una disminución de la sociabilidad de la descendencia masculina, mientras que las hermanas de la misma camada expresan niveles normales de interacción social (Kazlauskas et al. 2019). Un resultado que recapitula el sesgo hacia los varones que se observa en el TEA.

En esta tesis nos interesa entender y echar luz sobre los mecanismos biológicos involucrados en este impacto diferencial del TEA entre sexos, para lo cual nos basamos en el modelo de convergencia de masculinización del cerebro e inflamación (McCarthy and Wright 2017) para entender el sesgo fenotípico del VPA en ratones machos y hembras. Nos propusimos entonces evaluar cuál es el papel de la masculinización en la manifestación de los fenotipos relacionados al autismo luego de la exposición al VPA. Nuestra **hipótesis** es que la masculinización del cerebro es necesaria para que la exposición prenatal al VPA afecte los comportamientos relacionados con el autismo, las alteraciones neuronales y la gliosis. Para probar esta hipótesis, estudiamos el efecto de la exposición postnatal a E2 en ratones hembra que fueron expuestas a VPA en el día de gestación 12.5.

## 5.2. Diseño experimental

Para llevar a cabo los experimentos incluidos en este capítulo se utilizó una cohorte de 19 camadas, de las cuales a 9 hembras preñadas se les inyectó vehículo (SAL) y a 10 hembras preñadas se les inyectó VPA. De cada camada se eligieron aleatoriamente hasta 6 hembras, a las cuales se las dividió aleatoriamente en dos grupos: la mitad fueron inyectadas con aceite de sésamo (OIL) y la otra mitad con 17 $\beta$ -estradiol benzoato (E2). En la adultez analizamos la conducta de los animales de los cuatro grupos experimentales: 13 SAL-OIL, 17 SAL-E2, 12 VPA-

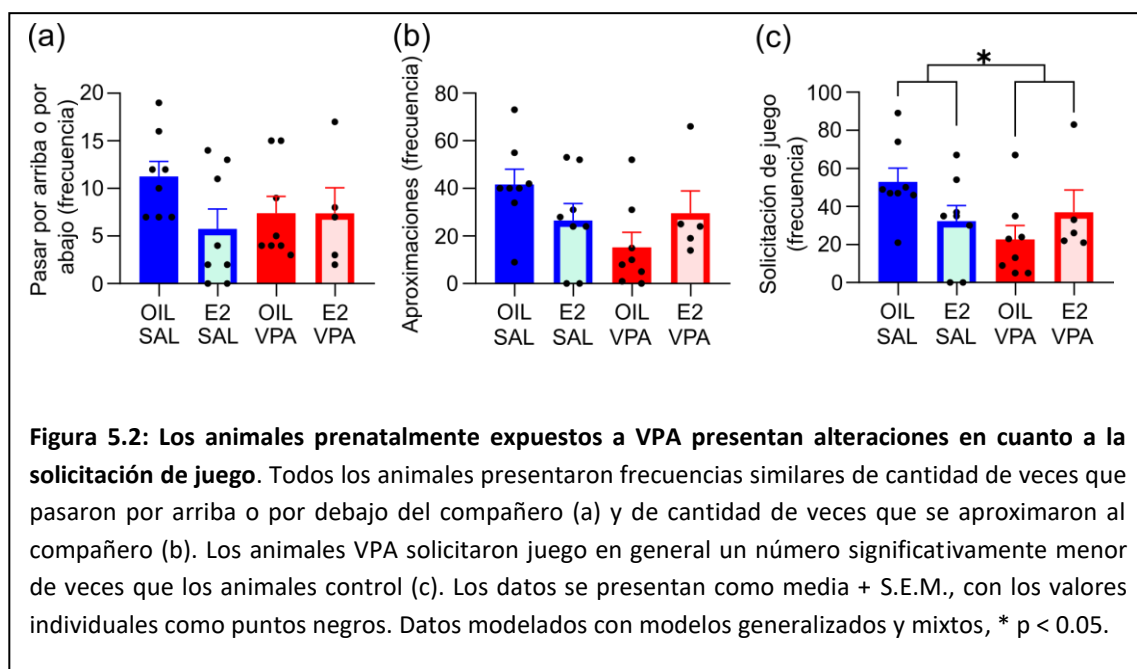
OIL y 14 VPA-E2. Los días exactos de cada inyección se muestran en la figura 5.1a y el orden en que los ensayos conductuales fueron llevados a cabo se muestran en la figura 5.1b.



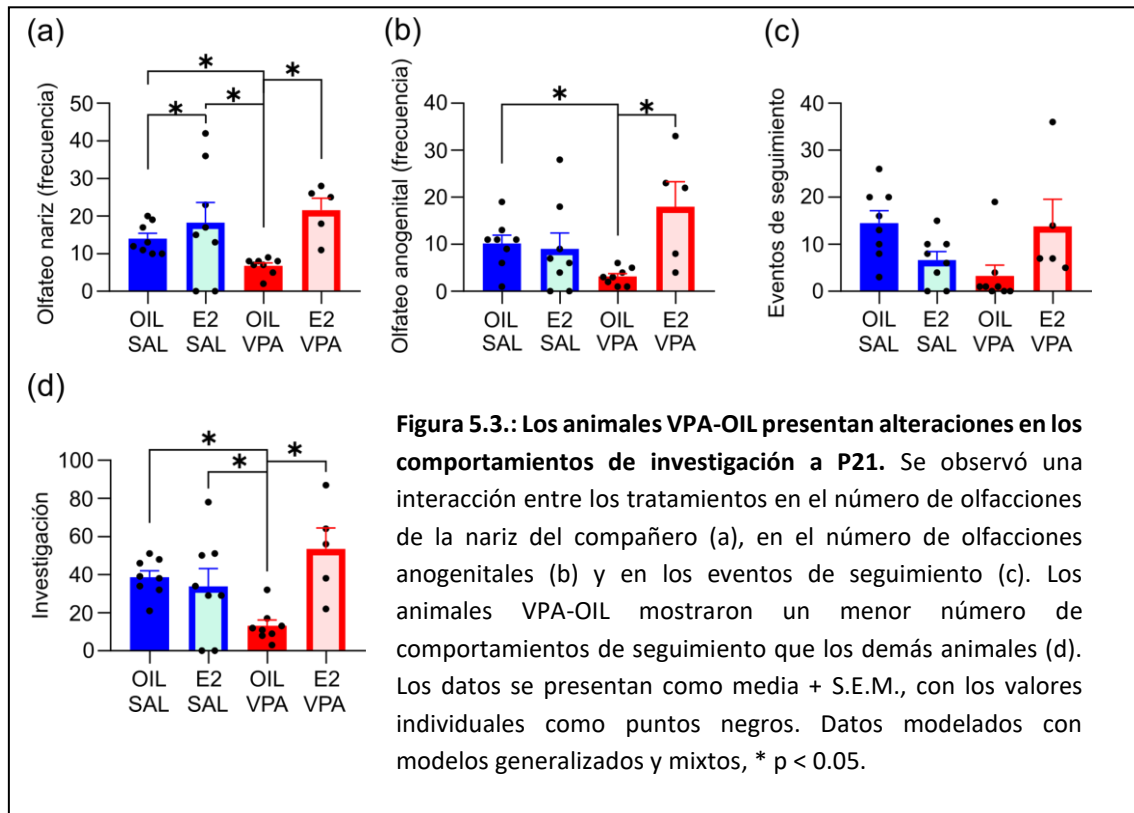
### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Juego juvenil

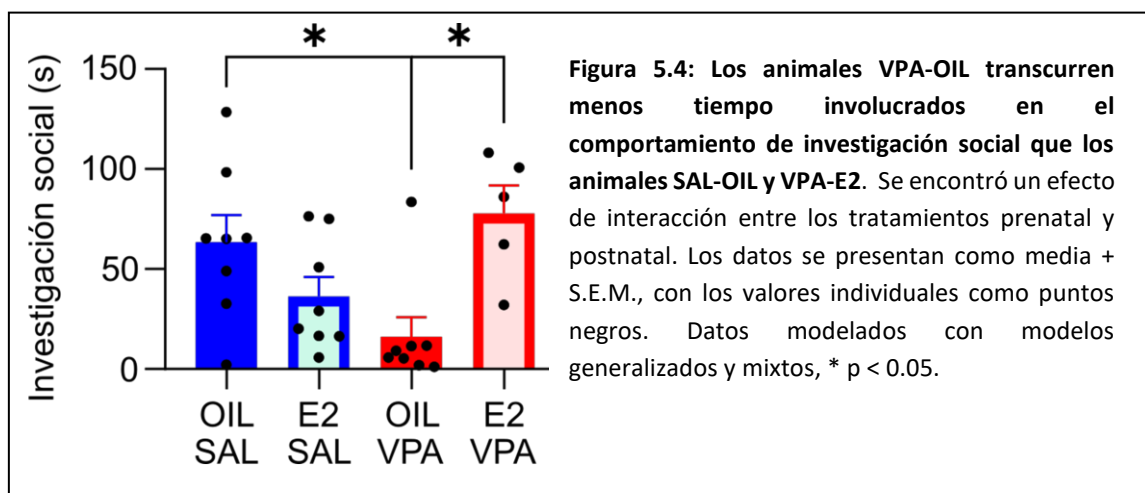
Para evaluar el efecto del tratamiento prenatal con VPA y del tratamiento postnatal con E2 en la sociabilidad juvenil, analizamos la interacción entre dos animales jóvenes (P21) de un mismo tratamiento en un campo abierto, cuantificando 11 comportamientos individuales. Respecto a los comportamientos que se consideran como solicitud de juego, en el comportamiento de pasar por arriba y pasar por abajo del compañero todos los grupos presentaron frecuencias similares de eventos [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 29) = 0.687$ ,  $p = 0.407$ ; tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 29) = 0.414$ ,  $p = 0.519$ ; Figura 5.2a]; y, cuando se analizaron los eventos de aproximación, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 29) = 0.252$ ,  $p = 0.112$ ; tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 29) = 0.003$ ,  $p = 0.955$ ; Figura 5.2b]. Sin embargo, al analizar estos últimos dos comportamientos en conjunto, observamos un efecto significativo del tratamiento prenatal [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 29) = 8.071$ ,  $p = 0.004$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 29) = 0.156$ ,  $p = 0.692$ ; Figura 5.2c], debido a que las hembras VPA presentaron menos frecuencia de eventos de solicitud de juego.



En este mismo ensayo también analizamos los comportamientos de investigación, donde se incluyen los eventos de olfateo de la nariz del compañero, de la zona anogenital y los eventos de seguir al compañero. Encontramos un efecto de interacción en la cantidad de veces en que los animales huelen la nariz del compañero [ $\chi^2(1, N = 29) = 4.422, p = 0.035$ ; Figura 5.3a]. Luego, el análisis *post hoc* reveló que los animales VPA-OIL olieron menos la nariz del compañero que los demás grupos, y también observamos que los animales SAL-E2 olieron más la nariz del compañero que el grupo SAL-OIL. Respecto a los eventos de olfateo anogenital encontramos una interacción significativa entre los tratamientos [ $\chi^2(1, N = 29) = 11.532, p < 0.001$ ; Figura 5.3b] y en el análisis *post hoc* se observó que el grupo VPA-OIL presentó una menor frecuencia de eventos de olfateo anogenital que los grupos VPA-E2 y SAL-OIL. En los eventos de seguir al compañero encontramos una interacción entre los tratamientos [ $\chi^2(1, N = 29) = 6.345, p < 0.011$ ; Figura 5.3c], sin embargo, la prueba *post hoc* de Tukey no arrojó ninguna diferencia entre los grupos. Finalmente, combinando los distintos comportamientos de investigación encontramos una interacción significativa entre tratamientos [ $\chi^2(1, N=29) = 15.913, p < 0.001$ ; Figura 5.3d], debido a que los animales del grupo VPA-OIL presentaron menor frecuencia de eventos de investigación que el resto de los animales.

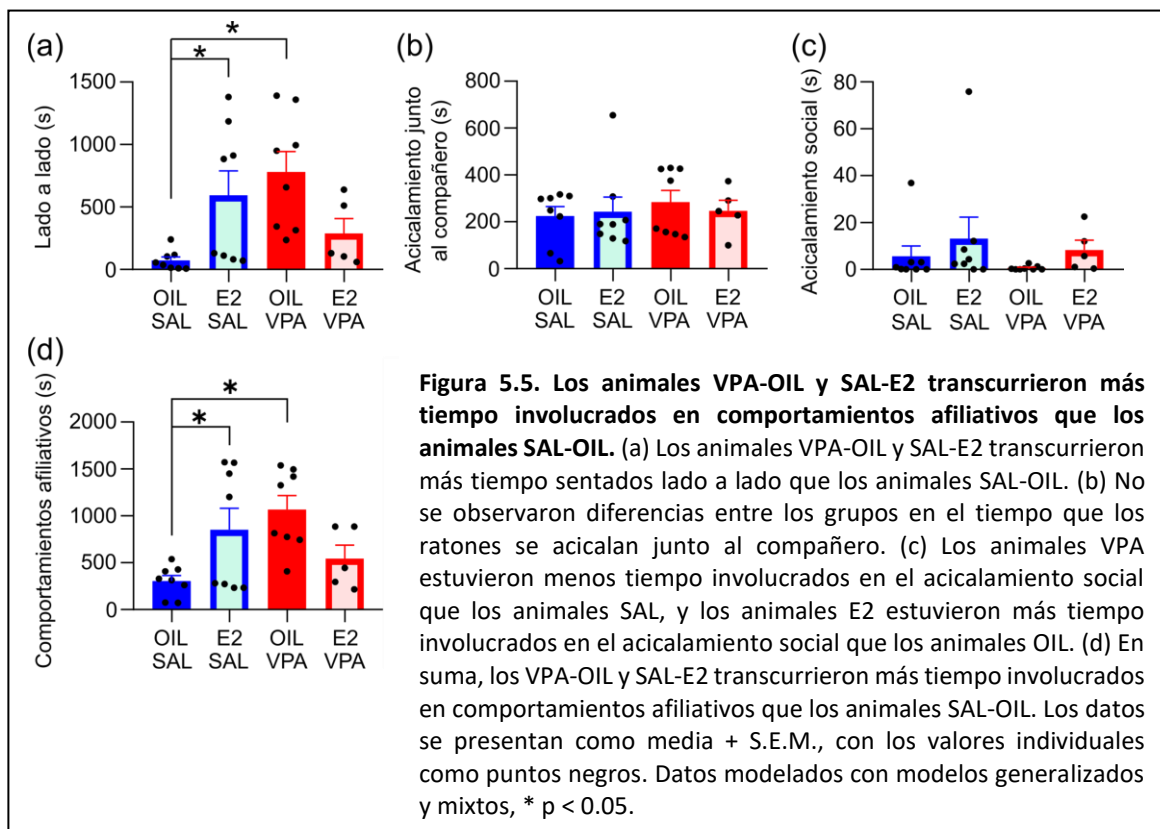


Dentro de los comportamientos de investigación, se incorporó una nueva variable respecto a publicaciones previas del grupo, que consiste en el tiempo en que el animal transcurre investigando al compañero cuando no está olfateando la nariz o el ano. A este comportamiento nos referimos como investigación social y encontramos una interacción entre los tratamientos [ $\chi^2$  (1,  $N = 29$ ) = 10.396,  $p = 0.001$ ; Figura 5.4]. El análisis *post hoc* arrojó que los animales VPA-OIL transcurren menos tiempo involucrados en este comportamiento que los animales SAL-OIL y VPA-E2.

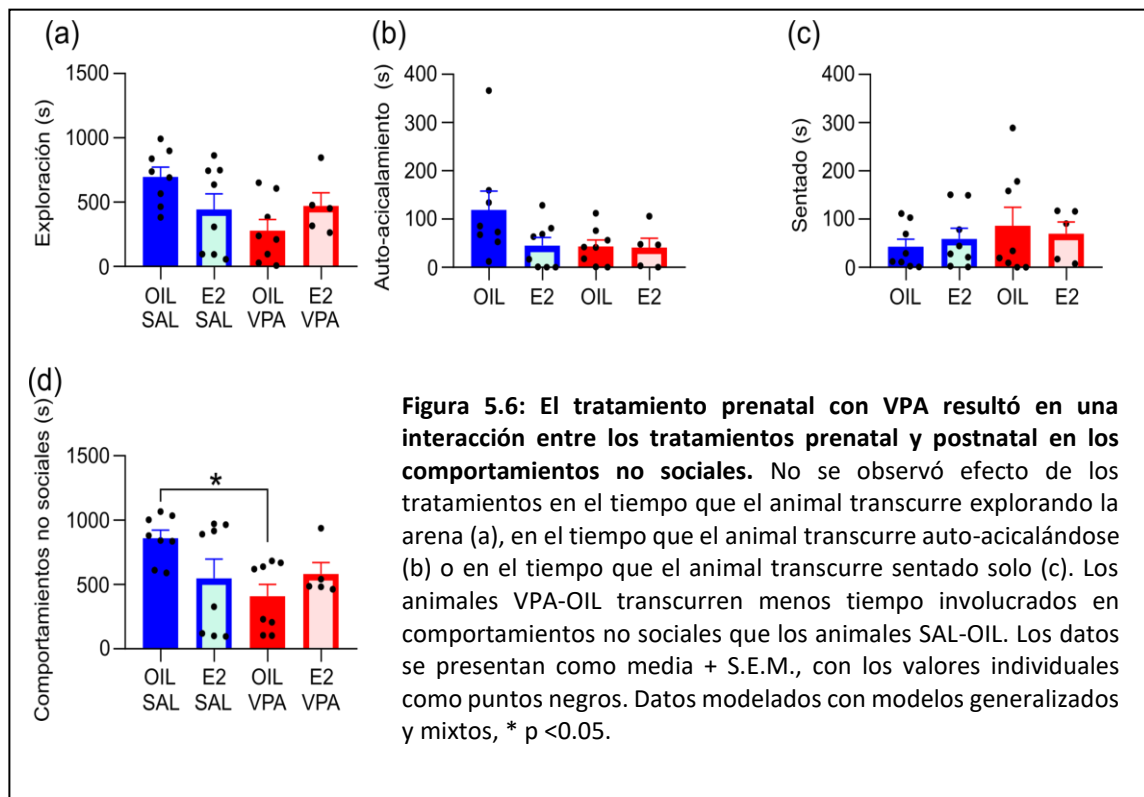




Por otro lado, los comportamientos afiliativos incluyen el tiempo que los ratones transcurren sentados lado a lado, el tiempo que el ratón transcurre acicalándose al lado del compañero y el tiempo que el ratón acicala al compañero (acicalamiento social). El tiempo que los ratones transcurrieron sentados al lado del compañero arrojó una interacción entre los tratamientos [ $\chi^2$  (1, N = 29) = 20.008,  $p < 0.001$ ; Figura 5.5a] y el análisis *post hoc* reveló que los animales VPA-OIL y los animales SAL-E2 transcurrieron más tiempo al lado del compañero que los animales SAL-OIL. Cuando se analizó el tiempo que los animales transcurrieron acicalándose al lado del compañero, no se observaron diferencias entre los grupos [tratamiento prenatal:  $\chi^2$  (1, N = 29) = 0.512,  $p = 0.474$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2$  (1, N = 29) = 0.007,  $p = 0.9311$ ; Figura 5.5b]. Luego, el análisis del acicalamiento social arrojó un efecto significativo de los tratamientos prenatal [ $\chi^2$  (1, N = 29) = 3.999,  $p = 0.045$ ] y postnatal [ $\chi^2$  (1, N = 29) = 5.071,  $p = 0.024$ ; Figura 5.5c], donde los animales VPA estuvieron menos tiempo involucrados en el acicalamiento social que los animales SAL, y los animales E2 estuvieron más tiempo involucrados en el acicalamiento social que los animales OIL. El análisis de todos los comportamientos afiliativos en conjunto presentó una interacción de los tratamiento prenatal y postnatal [ $\chi^2$  (1, N = 29) = 13.254,  $p < 0.001$ ; Figura 5.5d] debido a que los animales VPA-OIL y SAL-E2 transcurrieron más tiempo involucrados en comportamientos afiliativos que los animales SAL-OIL.



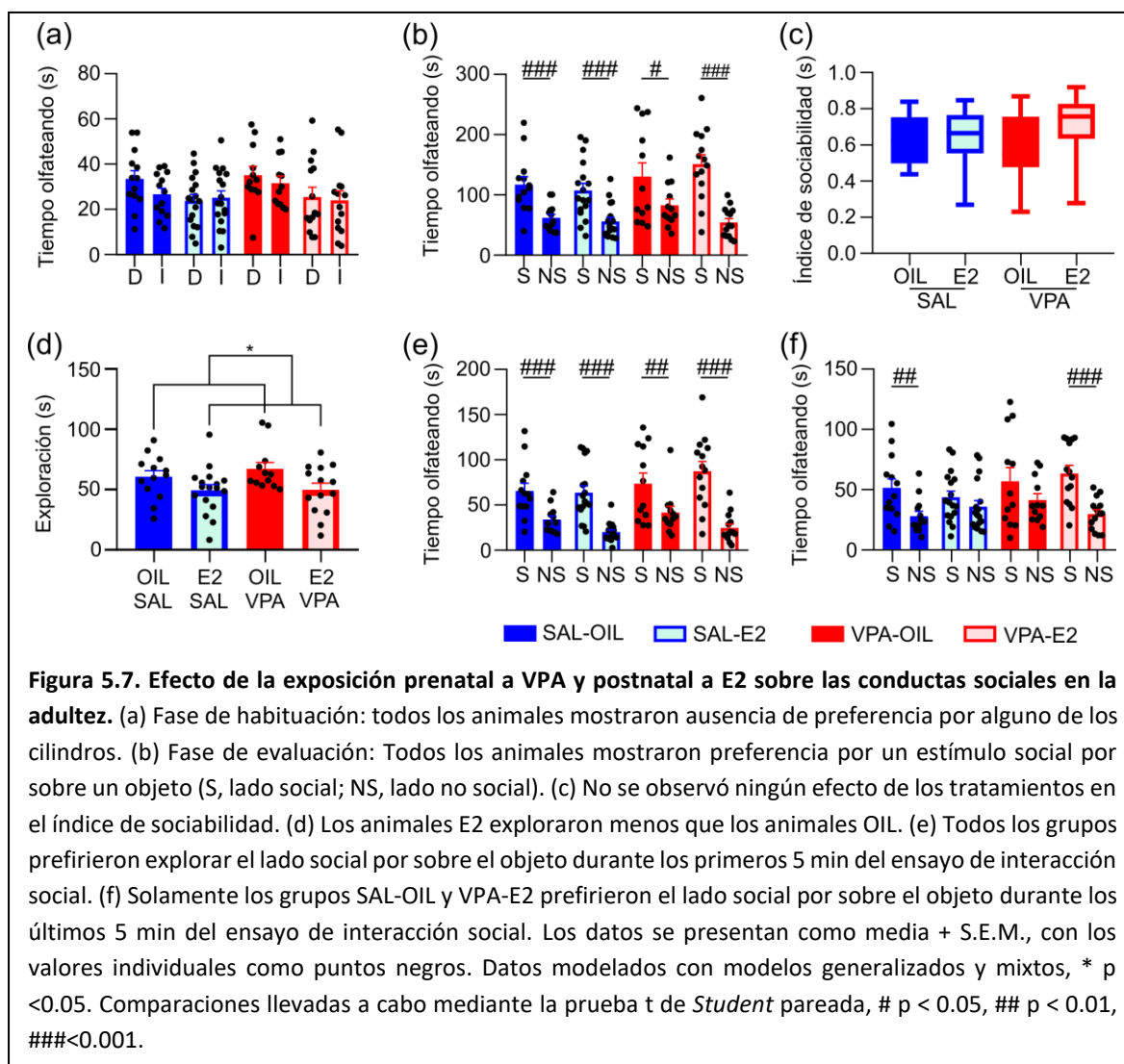
Los comportamientos no sociales incluyen a la exploración, el auto-acicalamiento y cuando el ratón se encuentra sentado solo. No se observaron efectos de los tratamientos en el tiempo que el animal transcorre explorando la arena [tratamiento prenatal:  $\chi^2$  (1, N = 29) = 2.808,  $p$  = 0.093; tratamiento postnatal:  $\chi^2$  (1, N = 29) = 0.007,  $p$  = 0.933; Figura 5.6a], en el tiempo que el animal transcorre auto-acicalándose [tratamiento prenatal:  $\chi^2$  (1, N = 29) = 1.478,  $p$  = 0.224; tratamiento postnatal:  $\chi^2$  (1, N = 29) = 1.309,  $p$  = 0.252; Figura 5.6b], ni en el tiempo que el animal transcorre sentado solo [tratamiento prenatal:  $\chi^2$  (1, N = 29) = 0.853,  $p$  = 0.355; tratamiento postnatal:  $\chi^2$  (1, N = 29) = 0.036,  $p$  = 0.848; Figura 5.6c]. Sin embargo, el análisis de la suma de estos comportamientos, los comportamientos no sociales, arrojó una interacción entre los tratamientos prenatal y postnatal [ $\chi^2$  (1, N = 29) = 5.383,  $p$  = 0.020; Figura 5.6d], donde los animales VPA-OIL transcurren menos tiempo involucrados en este tipo de comportamiento que los animales SAL-OIL.



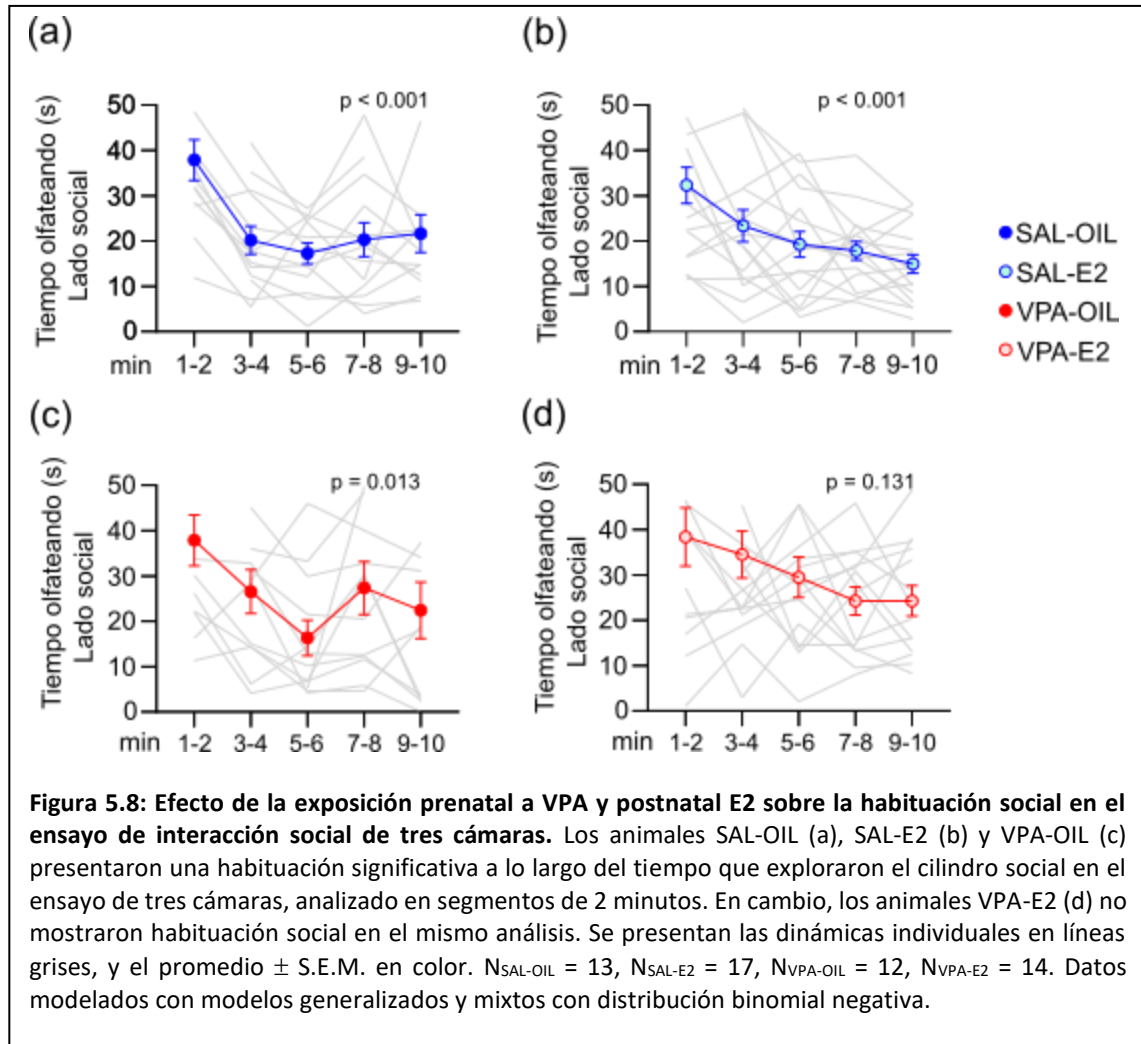
### 5.3.2. Comportamientos sociales

En la adultez, realizamos el ensayo de interacción social para los animales de los cuatro grupos experimentales. En la primera fase de habituación se observó que en ningún grupo los animales mostraron preferencia por ninguno de los cilindros [SAL-OIL:  $\chi^2$  (1, N = 13) = 3.049,  $p < 0.080$ ; SAL-E2:  $\chi^2$  (1, N = 17) = 0.092,  $p = 0.761$ ; VPA-OIL:  $\chi^2$  (1, N = 12) = 0.468,  $p = 0.493$ ; VPA-E2:  $\chi^2$  (1, N = 14) = 0.066,  $p = 0.796$ ; Figura 5.7a]. A continuación, en la fase de evaluación del ensayo de interacción social en tres cámaras, observamos que todos los animales prefirieron el lado social por sobre el lado no social [SAL-OIL:  $\chi^2$  (1, N = 13) = 19.948,  $p < 0.001$ ; SAL-E2:  $\chi^2$  (1, N = 17) = 17.546,  $p < 0.001$ ; VPA-OIL:  $\chi^2$  (1, N = 12) = 4.842,  $p = 0.027$ ; VPA-E2:  $\chi^2$  (1, N = 14) = 38.407,  $p < 0.001$ ; Figura 5.7b]. El índice de sociabilidad, calculado como: lado social/ (lado social + lado no social), fue aproximadamente el mismo para todos los grupos [tratamiento prenatal:  $\chi^2$  (1, N = 56) = 0.2238;  $p = 0.636$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2$  (1, N = 56) = 3.416;  $p = 0.064$ ; Figura 5.7c]. Luego, cuando se analizó la exploración durante la fase de habituación, que fue calculada como la sumatoria de los tiempos de exploración de ambos cilindros, se observó que los animales E2 exploraron menos tiempo que los animales OIL [ $\chi^2$  (1, N = 56) = 5.658;  $p = 0.017$ ; Figura 5.7d], mientras que no se observó un efecto del tratamiento prenatal [ $\chi^2$  (1, N = 56) = 0.242;  $p = 0.622$ ].

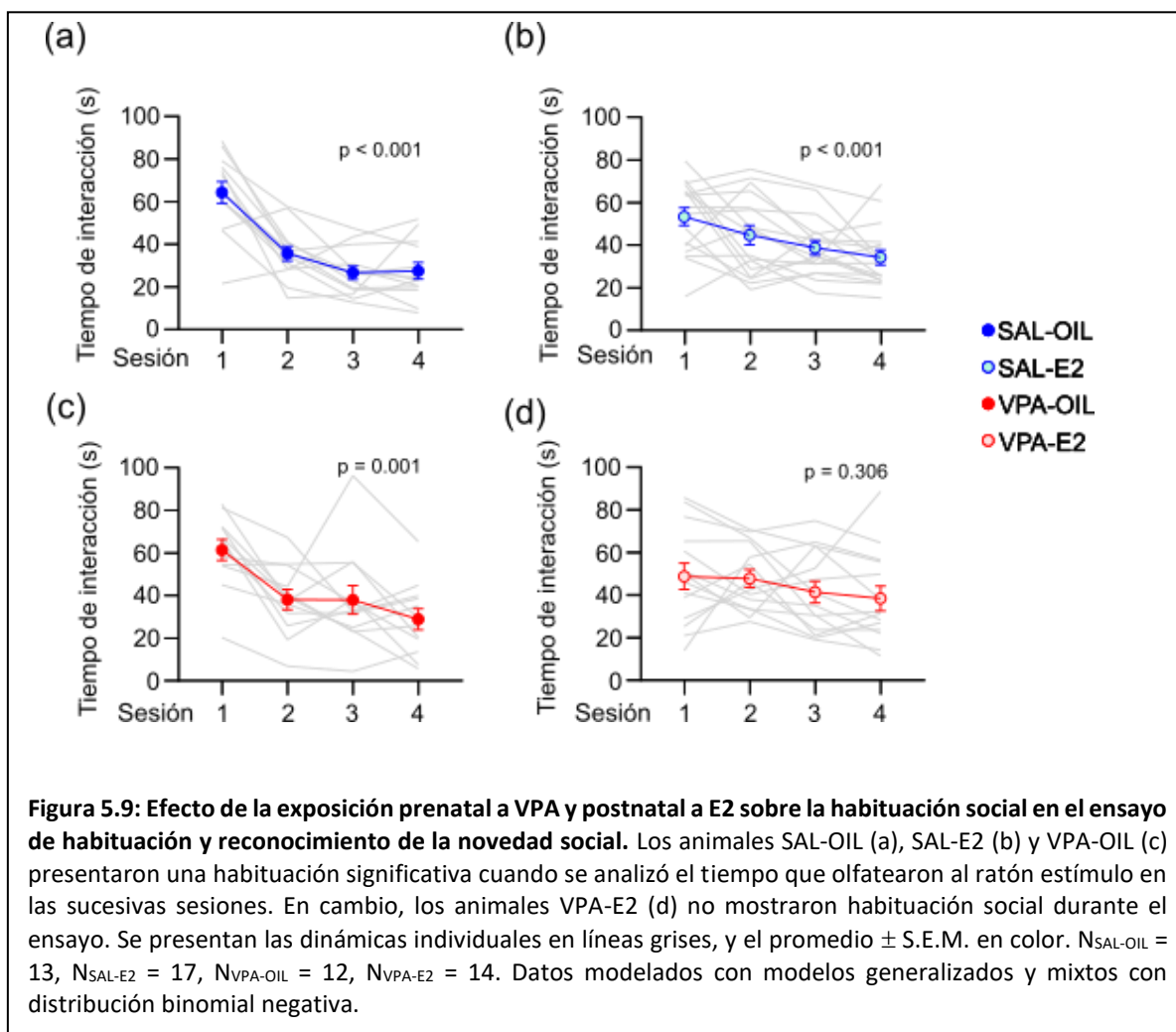
Para estudiar más en detalle este resultado, se analizó la dinámica temporal del ensayo de sociabilidad, para lo cual se separó el ensayo de sociabilidad en dos períodos de 5 minutos cada uno. Durante los primeros 5 minutos se observó que todos los grupos prefirieron el lado social [SAL-OIL:  $\chi^2$  (1, N = 13) = 16.12,  $p < 0.001$ ; SAL-E2:  $\chi^2$  (1, N = 17) = 44.175,  $p < 0.001$ ; VPA-OIL:  $\chi^2$  (1, N = 12) = 7.241,  $p = 0.007$ ; VPA-E2:  $\chi^2$  (1, N = 14) = 38.068,  $p < 0.001$ ; Figura 5.7e], mientras que, en la segunda mitad, los grupos que siguen prefiriendo el lado social son los grupos SAL-OIL [ $\chi^2$  (1, N = 13) = 9.922,  $p = 0.001$ ] y VPA-E2 [ $\chi^2$  (1, N = 14) = 21.241,  $p < 0.001$ ], mientras que los otros grupos no muestran preferencia por ninguno de los dos lados [SAL-E2:  $\chi^2$  (1, N = 17) = 1.3223,  $p = 0.250$ ; VPA-OIL:  $\chi^2$  (1, N = 12) = 12.571,  $p = 0.171$ ; Figura 5.7f].



Luego de observar que pareciera que hay dinámicas de sociabilidad diferentes entre los grupos, se quiso ahondar más en cómo responden los animales a través del tiempo en el ensayo de interacción social. Para ello, se analizó dicho ensayo en segmentos de a dos minutos. Observamos que todos los grupos habitúan a lo largo del tiempo, exceptuando al grupo VPA-E2 [SAL-OIL:  $\chi^2$  (4, N = 56) = 23.309,  $p < 0.001$ , Figura 5.8a; SAL-E2:  $\chi^2$  (4, N = 56) = 26.59,  $p < 0.001$ , Figura 5.8b; VPA-OIL:  $\chi^2$  (4, N = 56) = 12.571,  $p = 0.013$ , Figura 5.8c; VPA-E2:  $\chi^2$  (4, N = 56) = 7.0918,  $p = 0.131$ , Figura 5.8d].

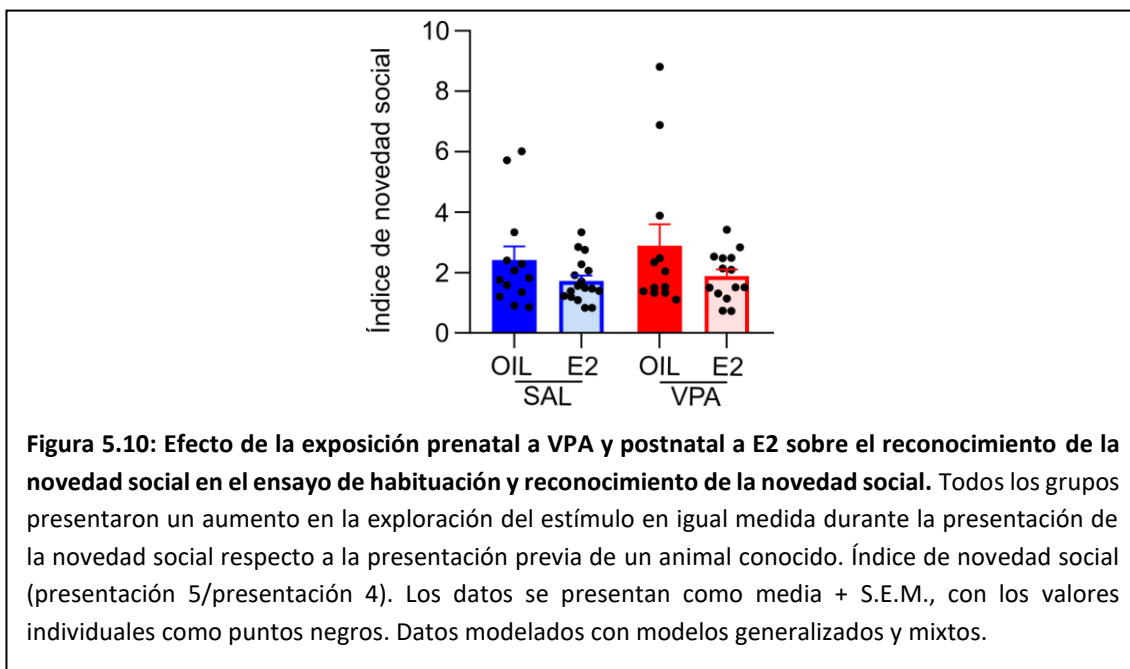


Como observamos que el análisis clásico del ensayo de interacción social no arrojó diferencias, pero se encontró una alteración en la dinámica social a través del tiempo, se llevó a cabo un ensayo más específico para evaluar dinámicas sociales a través del tiempo: el ensayo de habituación y reconocimiento de la novedad social. Con este ensayo observamos que todos los grupos habituaron al estímulo social, disminuyendo el tiempo de interacción con el estímulo social a lo largo del ensayo, a excepción del grupo VPA-E2 [ $\text{SAL-OIL}$ :  $\chi^2(4, N = 56) = 41.124$ ,  $p < 0.001$ , Figura 5.9a;  $\text{SAL-E2}$ :  $\chi^2(4, N = 56) = 19.818$ ,  $p < 0.001$ , Figura 5.9b;  $\text{VPA-OIL}$ :  $\chi^2(4, N = 56) = 15.811$ ,  $p = 0.001$ , Figura 5.9c;  $\text{VPA-E2}$ :  $\chi^2(4, N = 56) = 3.6137$ ,  $p = 0.306$ , Figura 5.9d].



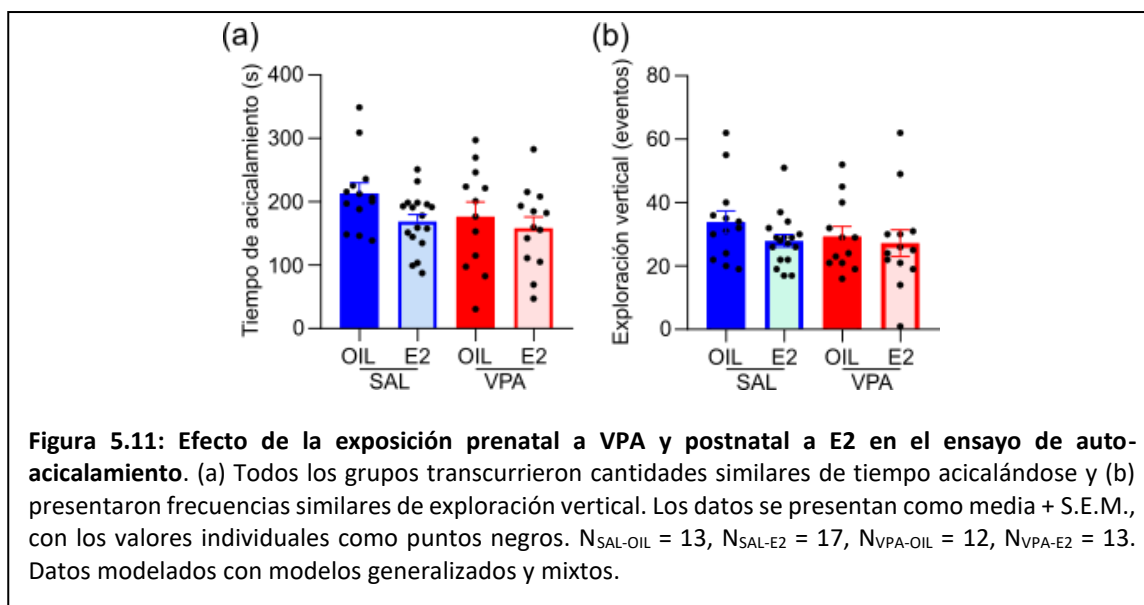
Para evaluar la novedad social en el ensayo de habituación y reconocimiento de la novedad social, se analizó el índice de novedad social (tiempo de interacción con el ratón estímulo en la quinta presentación/tiempo de interacción con el estímulo novedoso en la fase 4 del ensayo). Se observó que todos los animales incrementaron el tiempo de interacción cuando se les presentó la novedad social [tratamiento prenatal:  $F(1, 17.76) = 1.150$ ,  $p = 0.297$ ; tratamiento postnatal:  $F(1, 41.38) = 0.387$ ,  $p = 0.536$ ; Figura 5.10].

Estos resultados en conjunto sugieren que los animales VPA-E2 presentan una dinámica alterada en la sociabilidad que se observó tanto en el ensayo de interacción social en tres cámaras como en el ensayo de habituación y reconocimiento de la novedad social.



### 5.3.3. Comportamientos repetitivos

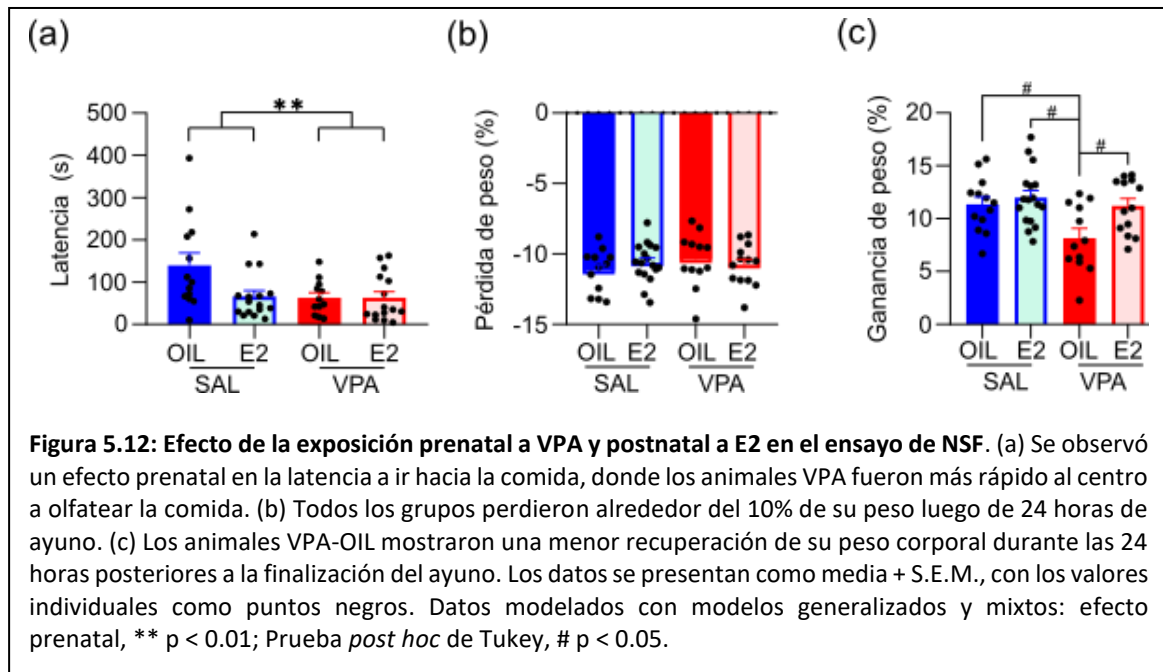
Otra característica clave relacionada al autismo es la presencia de patrones repetitivos en la conducta. En los roedores el auto-acicalamiento en exceso es una medida de comportamientos repetitivos análogos a los observados en pacientes con TEA. Se evaluó en el ensayo de auto-acicalamiento si alguno de los grupos presentaba patrones repetitivos en la conducta, y se observó que todos los grupos presentaron niveles similares de este comportamiento [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 1.384$ ,  $p = 0.239$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 2.888$ ,  $p = 0.089$ ; Figura 5.11a]. En este ensayo también se evaluó la exploración vertical y no se encontraron diferencias entre los grupos [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.594$ ,  $p = 0.441$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 1.681$ ,  $p = 0.195$ ; Figura 5.11b].



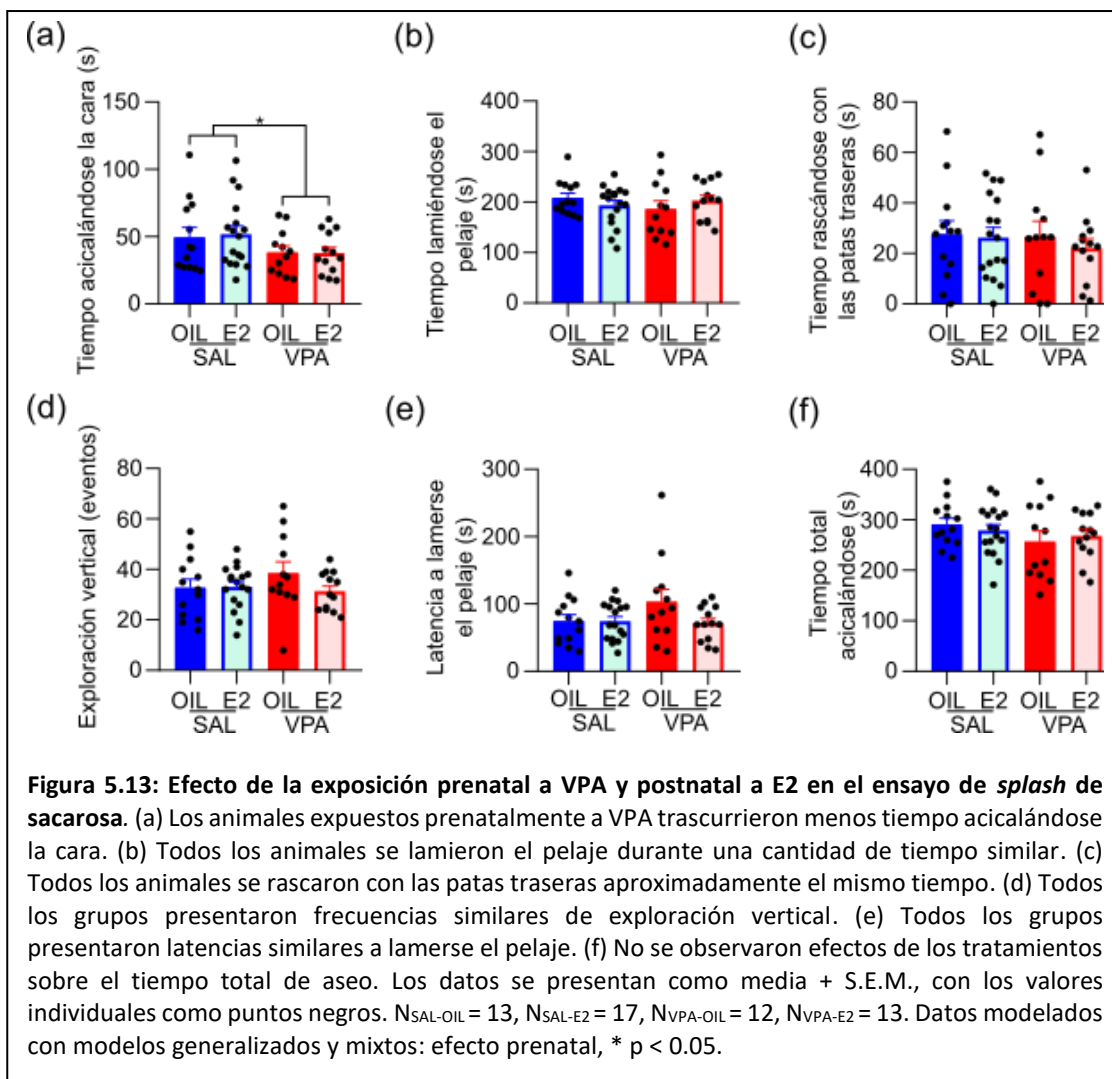
#### 5.3.4. Comportamientos relacionados a la ansiedad y la depresión

Los comportamientos relacionados a la ansiedad, así como los relacionados a la depresión, tienen alta comorbilidad con el TEA. Evaluamos estos comportamientos mediante el ensayo de alimentación suprimida por la novedad (NSF). Ésta es una prueba basada en un conflicto, ya que un animal que ha sido privado de comida durante un día entero se enfrenta a la opción de acercarse y consumir un pellet de comida en el centro de una arena abierta, novedosa y bien iluminada, o quedarse a un lado para evitar el centro de este ambiente ansiogénico (Samuels and Hen 2011). Este ensayo además es sensible al tratamiento crónico con drogas antidepresivas, pero no es afectado por el tratamiento agudo con ellas, por lo que suele ser utilizado para estudiar los efectos de dichos tratamientos crónicos y los diversos mecanismos que median la respuesta antidepresiva. En este ensayo observamos un efecto del tratamiento prenatal sobre la latencia a ir al centro a olfatear la comida [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 7.633$ ,  $p = 0.005$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 1.749$ ,  $p = 0.186$ ], donde los animales VPA presentaron una menor latencia que los grupos SAL [Figura 5.12a]. Como control, evaluamos la pérdida de peso debida al ayuno, y observamos que todos los grupos perdieron alrededor del 10% de su peso corporal luego de 24 horas de ayuno [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.438$ ,  $p = 0.507$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.095$ ,  $p = 0.757$ ; Figura 5.12b]. Llamativamente, al evaluar la ganancia de peso luego de 24 horas de la interrupción del ayuno, se observó una interacción entre los tratamientos prenatal y postnatal [ $\chi^2(1, N = 55) = 4.881$ ,  $p = 0.027$ ], donde el análisis *post hoc* arrojó que los animales VPA-OIL recuperaron un menor porcentaje de su peso en 24 horas (Figura 5.12c).



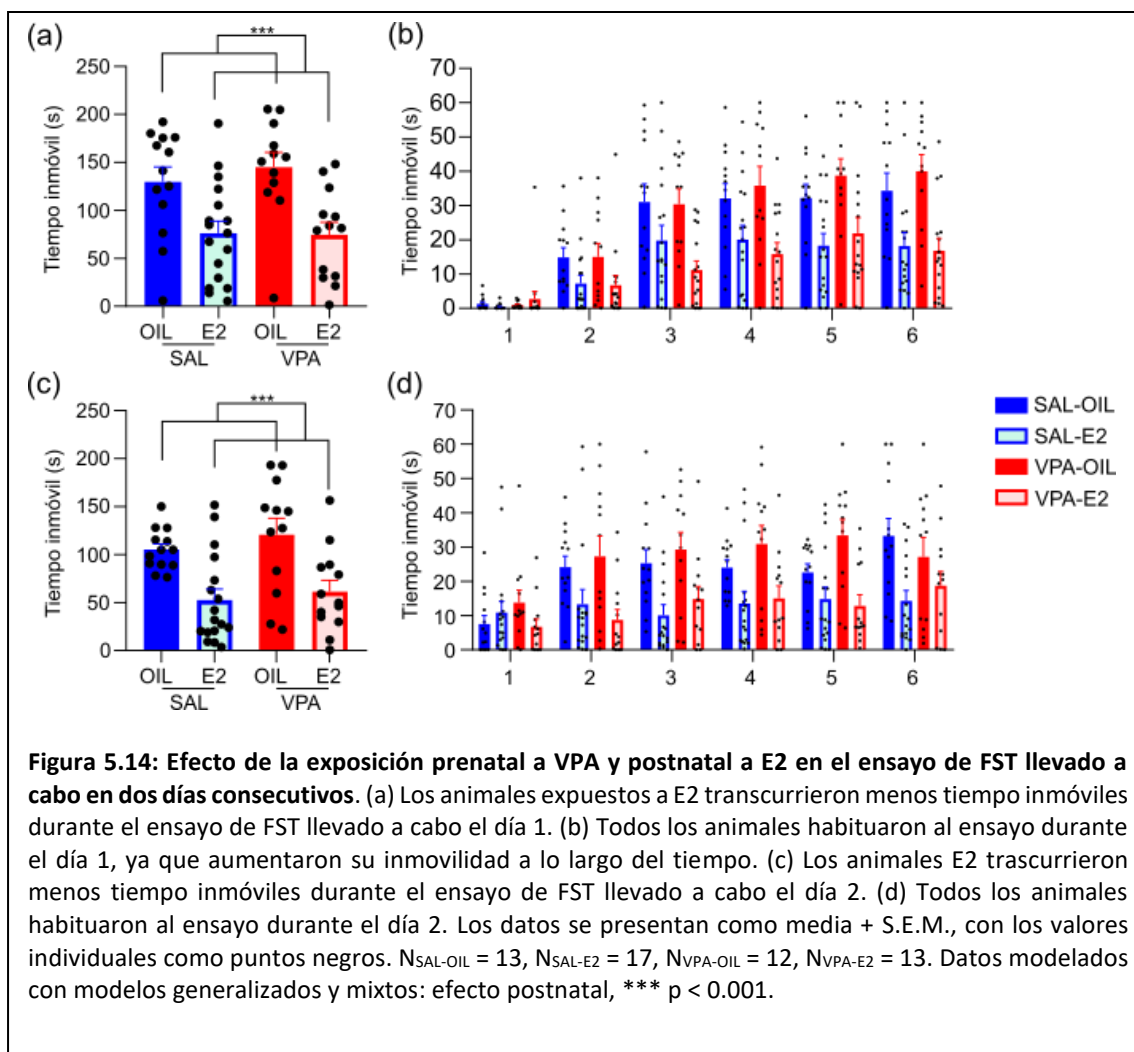


Para evaluar comportamientos relacionados con la depresión se realizó también el ensayo de *splash* de sacarosa. Esta prueba evalúa el comportamiento de acicalamiento, definido como la limpieza del pelaje ya sea lamiendo o rascando, después de la aplicación de una solución de sacarosa al 10% en el pelaje dorsal del ratón. La viscosidad de la solución impulsa a los ratones a iniciar un comportamiento de aseo. En ratones con un fenotipo relacionado a la depresión se espera que presenten una mayor latencia a acicalarse (tiempo de inactividad entre la pulverización y el inicio del aseo) y una disminución del tiempo dedicado al aseo (D'Audiffret et al. 2010). En este ensayo se encontró un efecto del tratamiento prenatal en el tiempo que los ratones transcurren acicalándose la cara con las patas delanteras [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 5.788$ ,  $p = 0.016$ ; tratamiento postnatal  $\chi^2(1, N = 55) = 0.022$ ,  $p = 0.882$ ; Figura 5.13a]. No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros medidos: el tiempo lamiéndose el pelaje [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.1842$ ,  $p = 0.667$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 55) < 0.001$ ,  $p = 0.986$ ; Figura 5.13b], el tiempo rascándose con las patas traseras [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.574$ ,  $p = 0.4487$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.827$ ,  $p = 0.363$ ; Figura 5.13c], la cantidad de eventos de exploración vertical [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.147$ ,  $p = 0.700$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.703$ ,  $p = 0.401$ ; Figura 5.13d], la latencia a lamerse el pelaje [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.430$ ,  $p = 0.511$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 1.583$ ,  $p = 0.208$ ; Figura 5.13e] y el tiempo total de aseo [tratamiento prenatal:  $\chi^2(1, N = 55) = 1.693$ ,  $p = 0.193$ ; tratamiento postnatal:  $\chi^2(1, N = 55) < 0.123$ ,  $p = 0.724$ ; Figura 5.13f].



Otro ensayo que también responde al tratamiento con antidepresivos es el ensayo de natación forzada (FST), en el cual disminuyen el tiempo en que los animales transcurren inmóviles (Porsolt, Le Pichon, and M Jalfre 1977; Steru et al. 1985). Realizamos el FST en dos días consecutivos, ya que se ha reportado que la re-exposición a un ambiente estresante induce que los animales transcurran más tiempo inmóviles que lo que se observa durante el día 1 (Bielajew et al. 2003) y, de esta manera, esperábamos ver mayor contraste entre los grupos. Sin embargo, solamente se encontró un efecto del tratamiento postnatal en el tiempo de inmovilidad durante los últimos 4 minutos del ensayo tanto en el día 1 [ $\chi^2(1, N = 55) = 20.143$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 5.14a] como en el día 2 [ $\chi^2(1, N = 55) = 17.198$ ,  $p < 0.001$ ; Figura 5.14c], sin interacción con el tratamiento prenatal [día 1:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.478$ ,  $p = 0.489$ ; día 2:  $\chi^2(1, N = 55) = 0.002$ ,  $p < 0.961$ ]. Cuando se analizó el ensayo a lo largo de los minutos, se encontró que todos los ratones aumentan su inmovilidad a lo largo del tiempo, tanto en el día 1 [ $\chi^2(5, N = 55) = 351.001$ ,  $p <$

0.001, Figura 5.14b] como en el 2 [ $\chi^2$  (5, N = 55) = 20.219,  $p$  = 0.001; Figura 5.14d], y no se encontró interacción de los tratamientos con el tiempo [día 1:  $\chi^2$  (5, N=55) = 8.655,  $p$  = 0.123; día 2:  $\chi^2$  (5, N=55) = 7.4208,  $p$  = 0.191].



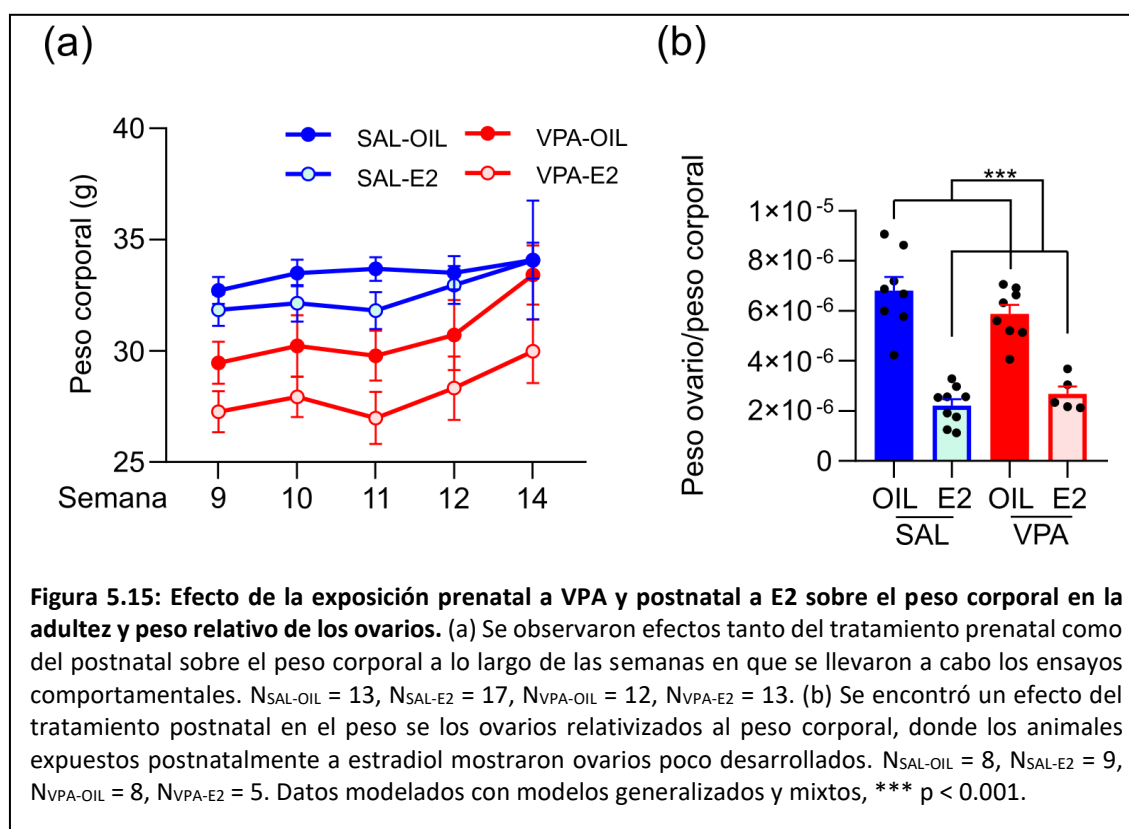
**Figura 5.14: Efecto de la exposición prenatal a VPA y postnatal a E2 en el ensayo de FST llevado a cabo en dos días consecutivos.** (a) Los animales expuestos a E2 transcurrieron menos tiempo inmóviles durante el ensayo de FST llevado a cabo el día 1. (b) Todos los animales habituaron al ensayo durante el día 1, ya que aumentaron su inmovilidad a lo largo del tiempo. (c) Los animales E2 transcurrieron menos tiempo inmóviles durante el ensayo de FST llevado a cabo el día 2. (d) Todos los animales habituaron al ensayo durante el día 2. Los datos se presentan como media + S.E.M., con los valores individuales como puntos negros.  $N_{\text{SAL-OIL}} = 13$ ,  $N_{\text{SAL-E2}} = 17$ ,  $N_{\text{VPA-OIL}} = 12$ ,  $N_{\text{VPA-E2}} = 13$ . Datos modelados con modelos generalizados y mixtos: efecto postnatal, \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.3.5. Control de pesos y de masculinización

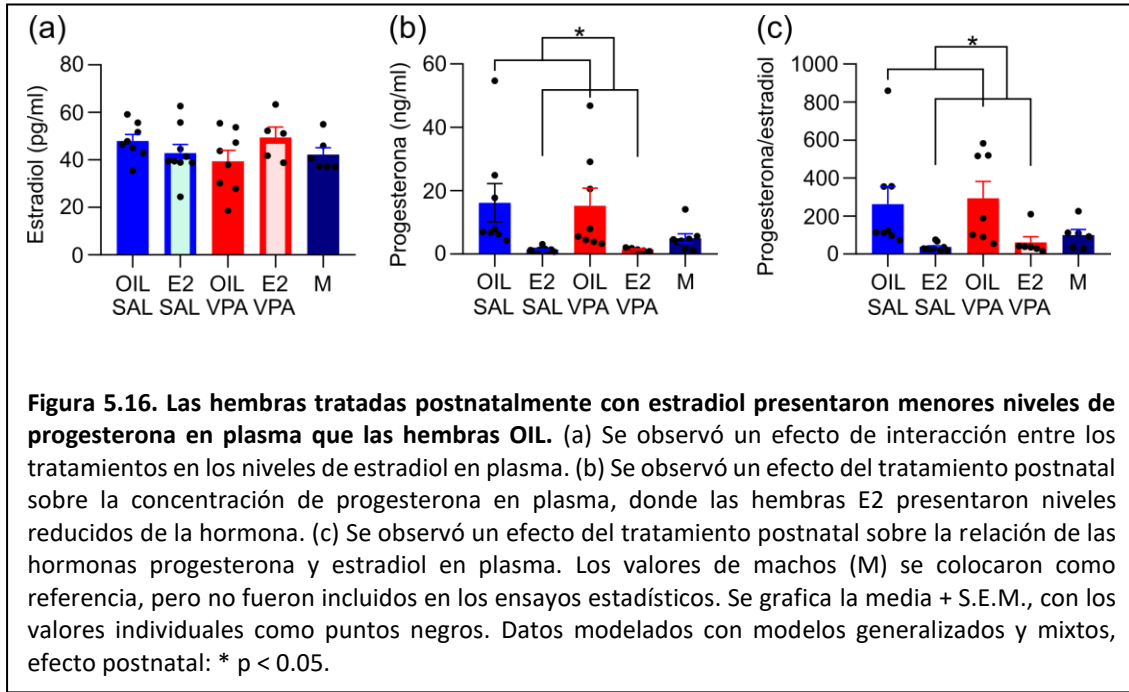
A medida que se fueron realizando los ensayos comportamentales en ratones adultos, se fue controlando el peso y se observó que todos los grupos aumentaron de peso a lo largo de los ensayos [ $\chi^2$  (4, N = 55) = 70.011,  $p < 0.001$ ; Figura 5.15a]. Además, encontramos un efecto de los tratamientos prenatal [ $\chi^2$  (1, N = 55) = 20.336,  $p < 0.001$ ] y postnatal [ $\chi^2$  (1, N = 55) = 5.125,  $p$  = 0.235], sin interacción [ $\chi^2$  (4, N = 55) = 0.3544,  $p$  = 0.986], donde los animales VPA pesaron menos que los animales SAL y los animales E2 pesaron menos que los animales OIL.

Por último, para evaluar si el tratamiento farmacológico postnatal fue suficiente para alterar el desarrollo gonadal de las hembras, pesamos los ovarios de los animales y se relativizó

ese valor al peso corporal del propio animal. Se encontró un efecto del tratamiento postnatal [F (1,26) = 98.765,  $p < 0.001$ ; Figura 5.15b] donde, como se esperaba, los ovarios de las hembras tratadas con estradiol eran más livianos.



Para controlar si el tratamiento con estradiol durante el período postnatal afecta el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, medimos la concentración de las hormonas estradiol y progesterona en plasma. Encontramos una interacción entre los tratamientos en la concentración de estradiol en plasma [F (1, 26) = 5.429,  $p = 0.027$ ; Figura 5.16a], sin embargo, el análisis *post hoc* no arrojó ninguna diferencia entre los tratamientos. Respecto a la concentración de progesterona en plasma, encontramos un efecto del tratamiento postnatal [F(1, 26) = 10.273,  $p = 0.003$ ; Figura 5.16b], sin efecto del tratamiento prenatal [F (1,26) = 0.126,  $p = 0.725$ ], donde las hembras E2 presentaron una menor concentración de progesterona en plasma. Por último, el cociente entre progesterona y estradiol arrojó un efecto significativo del tratamiento postnatal, donde al igual que con la variable progesterona, las hembras E2 presentaron menores niveles de la relación progesterona/estradiol que las hembras OIL [F (1, 26) = 12.518,  $p = 0.002$ ; Figura 5.16c], mientras que no hubo efecto del tratamiento prenatal [F (1,26) = 0.432,  $p = 0.516$ ].



Estos resultados verifican el efecto del E2 postnatal sobre el desarrollo de los ovarios y sobre el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.

#### 5.4. Discusión

Los resultados de este capítulo muestran que las hembras VPA presentan una disminución en los comportamientos sociales a P21, mientras que el tratamiento con estradiol durante el período neonatal revierte este efecto del VPA. En cambio, cuando adultas, las hembras VPA-E2 presentan una alteración en la habituación a un estímulo social respecto a los controles, tanto en el ensayo de interacción social como en el ensayo de habituación y reconocimiento de la novedad social. Observamos también que las hembras VPA-OIL presentaron una menor latencia a olfatear la comida en el centro de una arena iluminada y ansiogénica, un fenómeno que no habíamos evaluado previamente en el modelo VPA. Se encontró también que las hembras VPA se acicalaron la cara por menos tiempo en el ensayo de *splash* de sacarosa. Por último, en el ensayo de natación forzada se observó que las hembras tratadas con E2 pasaron menos tiempo inmóviles que los animales OIL en los dos días consecutivos en los que fueron testeadas.

Cabe destacar que es la primera vez que en nuestro laboratorio se evalúa juego juvenil en hembras en el modelo VPA, un fenómeno que sí habíamos evaluado en las crías VPA macho. Es interesante que, si bien como se mencionó previamente las hembras VPA adultas no muestran la disminución en la sociabilidad que muestran los machos VPA adultos (Kazlauskas et al. 2019), los resultados presentados en este capítulo ponen en evidencia que el VPA sí afecta el comportamiento social de las hembras juveniles. En particular, encontramos que las hembras VPA presentaron menor frecuencia de solicitud de juego. Estos resultados concuerdan con un trabajo previo en el cual se reportó que, en la adolescencia, tanto las ratas macho como las hembras expuestas a VPA mostraron patrones atípicos de comportamiento en el juego social, mientras que sólo los machos, pero no las hembras, expuestos a VPA mostraron déficits sociales a largo plazo cuando se les evaluó en la edad adulta en la prueba de tres cámaras (Melancia et al., 2018). En cambio, estos resultados difieren de un reporte previo en ratas hembras expuestas a VPA que no mostraron diferencias en la duración total de juego respecto a las ratas inyectadas con vehículo, aunque los machos sí se vieron afectados (Gziel et al. 2020). Estas discrepancias podrían deberse a diferencias de especie, ya que en dicho trabajo reportaron diferencias entre sexos debidas a que los machos juegan más que las hembras, mientras que en el capítulo anterior demostramos que en el caso de los ratones CF1 sólo se evidencian diferencias entre machos y hembras en el comportamiento de pasar por arriba o por abajo del compañero, en olfatear la nariz del compañero y en el acicalamiento social, pero no en los demás comportamientos analizados. Un resultado que parece contradictorio es que los animales del grupo VPA-OIL, si bien en general estuvieron menos involucrados en comportamientos sociales,

también presentaron altos niveles de comportamientos afiliativos. El análisis más detallado de estos resultados muestra que este grupo pasa gran parte del tiempo sentado lado a lado del compañero, por lo que no estuvieron involucrados en los comportamientos de investigación, de investigación social y en comportamientos no sociales. Consideramos estos resultados muy interesantes, ya que sugieren que los niveles de sociabilidad de las hembras son de hecho afectados por la exposición prenatal a VPA, pero que eso es observable sólo en el período juvenil.

Al analizar el efecto del protocolo de masculinización, encontramos una interacción entre los tratamientos prenatal y postnatal en distintos comportamientos analizados. Por un lado, las hembras VPA-OIL presentaron una menor frecuencia de comportamientos de investigación, y el E2 revierte este efecto. Por otro lado, la interacción entre los tratamientos prenatal y postnatal sobre los comportamientos afiliativos revela un efecto diferencial del E2 en las hembras SAL que en las hembras VPA: los animales SAL-E2 pasan más tiempo en estos comportamientos que las hembras SAL-OIL, pero en las hembras VPA el E2 tiene el efecto opuesto. Sería interesante en futuros experimentos explorar en más detalle estos comportamientos y los efectos de los tratamientos sobre ellos, por ejemplo evaluando la exploración de objetos novedosos y la preferencia por estímulos sociales como por ejemplo aserrín o un hisopo con orina de ratón.

En la adultez, las hembras VPA-E2 muestran un patrón de respuesta a un estímulo social diferente a los otros grupos experimentales, ya que no habitúan al estímulo social como sí lo hacen los animales control, tanto en el ensayo de interacción social como en el de habituación y reconocimiento de la novedad social. Así, aunque no es evidente una disminución de la sociabilidad como se observa en los machos VPA (Kazlauskas et al. 2019), los resultados presentados evidencian un efecto combinado del VPA prenatal y el estradiol neonatal sobre la sociabilidad. En base a estos resultados, proponemos que la feminización del cerebro y/o el normal funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, son necesarios para que las hembras muestren resiliencia a las alteraciones inducidas por el VPA prenatal en la sociabilidad en la adultez. Dicho de otra manera, podemos evidenciar alteraciones a largo plazo en la sociabilidad adulta de hembras expuestas prenatalmente a VPA, cuando las mismas son expuestas neonatalmente a estradiol.

Esta resiliencia en las hembras no es observada en los machos, ya que el tratamiento prenatal con VPA en machos genera alteraciones sociales permanentes (tanto en juveniles como en adultos). Pero también es necesario resaltar que los efectos del VPA sobre la sociabilidad, tanto juvenil como adulta, no son iguales en hembras y machos, o en hembras masculinizadas y

machos, respectivamente, sugiriendo que pueden estar afectando circuitos neuronales diferentes y/o que pueden existir otros factores ligados al sexo, como los genes presentes en el cromosoma Y, que participen en esta vulnerabilidad y afecten el desarrollo de las conductas sociales.

En humanos, los fenotipos de niñas y niños no son los mismos y se discute si los criterios de diagnóstico para TEA deberían ser iguales para niñas que para niños. De hecho, una teoría para explicar el sesgo en el diagnóstico es que, en niñas, la presentación del autismo es cualitativamente diferente a la típica presentación masculina (teoría del fenotipo autista). Esta teoría se basa en que el autismo femenino presenta una expresión diferencial de las características fundamentales subyacentes del autismo. Se ha reportado que, aunque las niñas parecen tener el mismo tipo de déficit de comunicación social, su motivación social y deseo de ser apreciadas por sus compañeros es mayor que la de los niños [revisado en (Young et al., 2018)]. Las niñas con autismo exhiben mejor los llamados comportamientos expresivos (conversación recíproca, compartir intereses, integración de comportamiento verbal/no verbal, imaginación, ajuste del comportamiento según la situación), y presentan problemas en la amistad de manera diferente (una mejor iniciación pero un mantenimiento problemático) que los niños con autismo (Hiller, Young, and Weber 2014).

Una característica clave en el fenotipo femenino del TEA es la capacidad de "camuflar" las dificultades sociales en situaciones sociales. El camuflaje se refiere al uso de estrategias conscientes o inconscientes, que pueden aprenderse explícitamente o desarrollarse implícitamente, para minimizar la aparición de características autistas dentro de un entorno social (Lai et al. 2011). Las niñas y mujeres con autismo intentan ocultar sus déficits y muestran una gran determinación para aprender las normas y matices sociales (Bargiela, Steward, and Mandy 2016). Un concepto similar que se ha propuesto recientemente es el de compensación (Livingston and Happé 2017): la compensación describe el uso de estrategias cognitivas alternativas para superar dificultades sociocognitivas o conductuales específicas en el autismo. Se ha reportado que el contexto social femenino apoya este mecanismo, donde las niñas con TEA utilizan conductas compensatorias, como permanecer cerca de sus compañeros y entrar y salir de las actividades, que parecen enmascarar sus limitaciones sociales (Dean et al. 2017). En los resultados de este capítulo los mecanismos compensatorios a lo largo del desarrollo en hembras que llevan a que el tratamiento con VPA afecte las conductas en el período juvenil pero no en adultas, estaría orquestado por el esquema organizacional dado por la presencia/ausencia de hormonas en el período perinatal y modulado por la activación de los circuitos por las hormonas durante la pubertad. Será importante ahondar en este fenómeno, afectando por



ejemplo la maduración sexual mediante ovariectomía en la pubertad y evaluando el efecto sobre las hembras VPA en la adultez.

Los síndromes depresivos presentan una comorbilidad incapacitante para muchos niños con TEA (Magnuson and Constantino 2011). Además, las mujeres son más propensas que los varones a presentar depresión. Otro componente clave del fenotipo autista en niñas es que éstas presentan un mayor riesgo de desarrollar problemas de internalización (como ansiedad y depresión) debido a la experiencia repetida de reacciones sociales negativas y a desajustes en la comunicación, a pesar de los esfuerzos compensatorios del camuflaje (Kreiser and White 2014). En este capítulo hicimos una extensa evaluación de los comportamientos relacionados con la depresión. Por un lado, observamos que en el NSF las hembras VPA presentaron una menor latencia a ir al centro de la arena a olfatear la comida. Este resultado es opuesto a resultados previos donde se observó en otro modelo de autismo que las ratonas hembra heterocigotas para *Mecp2<sup>tm1Tam</sup>* tienen una mayor latencia en ir hacia la comida en este test (Kondo et al. 2016). En este caso la diferencia puede deberse a que el nuestro es un modelo farmacológico mientras que el mencionado es un modelo genético. Asimismo, se reportó que el tratamiento con VPA aumenta la latencia a ir a comer al centro en el NSF (Ellenbroek, August, and Youn 2016), pero en este último caso utilizaron una dosis más baja de VPA (400 mg/kg) que la que usamos en esta tesis (600 mg/kg), lo que podría llevar a resultados comportamentales diferentes. Cuando se realiza el NSF, es crítico evaluar la ingesta y ganancia de peso de los animales una vez que la comida es repuesta, para controlar cualquier efecto potencial de la variable independiente del apetito en el comportamiento de alimentación. Observamos que todos los grupos perdieron alrededor del 10% del peso corporal durante el ayuno, que es lo que se registra en la mayoría de las cepas (Samuels and Hen 2011). Sin embargo, cuando evaluamos la ganancia de peso durante las 24 horas subsiguientes al ensayo, notamos que a los animales VPA-OIL les cuesta más recuperar el peso corporal. Esto podría deberse a un componente hedónico bajo, es decir una menor atracción por la comida, aunque no podemos descartar diferencias metabólicas en este grupo. Cabe destacar que el NSF no sólo mide el componente hedónico de afinidad por la comida sino que también demuestra una validez predictiva para los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas en el curso temporal (Dulawa and Hen 2005). Así, en los animales VPA-OIL, la menor latencia a ir hacia la comida no podría explicarse por un mayor componente hedónico, sino que sugiere que estos animales muestran niveles reducidos de ansiedad. Para confirmar esto, sería interesante evaluar en detalle el comportamiento relacionado con la ansiedad, utilizando ensayos específicos como el laberinto elevado en cruz,

el campo abierto, o la caja de luz/oscuridad (Campolongo et al. 2018; Lucchina and Depino 2014).

Por otro lado, para ahondar aún más en los comportamientos relacionados a la depresión, llevamos a cabo los ensayos de splash de sacarosa y el FST. Si bien en el ensayo de splash de sacarosa observamos un efecto del VPA sobre el tiempo de acicalamiento que va en línea con los efectos del VPA sobre comportamientos relacionados con la depresión en machos (Campolongo et al., 2018), los resultados del FST no verifican este resultado. En cambio, en el FST observamos un robusto efecto del tratamiento postnatal sobre la inmovilidad, donde las hembras inyectadas postnatalmente con estradiol permanecen menos tiempo inmóviles que las controles. Este resultado va en línea con los resultados del capítulo anterior (Seiffe et al. 2021), donde observamos el mismo efecto del E2 postnatal. Así, verificamos en un experimento independiente que el protocolo de masculinización utilizado afecta este comportamiento relacionado con la depresión.

A diferencia del capítulo anterior, en este capítulo encontramos que el E2 neonatal tiene efectos a largo plazo en el peso, ya que se observó que las hembras tratadas con E2 mostraron un menor peso durante los ensayos comportamentales en la adultez. Si bien hay muchos estudios respecto al efecto activacional del E2 en hembras y cómo afecta la acumulación de grasas y el metabolismo [revisado en (Brown and Clegg 2010)], poco se sabe acerca de los efectos de las hormonas gonadales en el período perinatal sobre el peso corporal. Estudios previos muestran que los ratones macho inyectados con 1  $\mu$ l de E2 en la cisterna magna en P5 mostraron un peso corporal más bajo que los controles tratados con vehículo (Macrì et al. 2010). Por otro lado, en un estudio donde inyectaron en P1 100 $\mu$ g de E2, observaron que solamente los machos mostraron una disminución de peso en la adultez, y no las hembras (Connelly et al. 2015). El circuito involucrado en las alteraciones observadas necesita ser estudiado más a fondo, pero pareciera no deberse al cambio en la ingesta de la comida, ya que se ha reportado que las hembras a las que se les administró E2 en P5 no mostraron diferencias en la alimentación (Bell 1971), y tampoco parece deberse a que las hembras tratadas con estradiol presenten una mayor actividad física ya que, de hecho, observamos una disminución en la distancia recorrida en el laberinto en Y por parte de las hembras E2 en el capítulo anterior. Por otro lado, observamos que las hembras tratadas con VPA presentan un menor peso corporal que las hembras SAL, un resultado va en la misma línea que trabajos anteriores (Kazlauskas et al. 2016; Schneider and Przewłocki 2005), y parece deberse a un efecto del VPA sobre este parámetro, cuyo mecanismo desconocemos.

Finalmente, observamos un efecto del tratamiento postnatal en el peso de los ovarios. Este resultado confirma el efecto del tratamiento del E2 sobre el desarrollo gonadal, ya que los ovarios de las hembras E2 se mostraron atrofiados. En la misma línea, los animales expuestos postnatalmente a E2 muestran niveles reducidos de progesterona en plasma, demostrando una deficiencia en el funcionamiento gonadal. Es importante resaltar que debido a este resultado no podemos descartar que algunas diferencias comportamentales entre las hembras OIL y E2 no se deban a la falta de esteroides sexuales en las hembras E2 adultas. Así, las diferencias en los niveles circulantes de hormonas podrían afectar tanto los mecanismos de resiliencia (como se mencionó antes) como la expresión de comportamientos específicos en la vida adulta. Necesitamos realizar otros estudios, por ejemplo realizando reemplazo hormonal u ovariectomía, para distinguir entre estos efectos.

En conclusión, estos resultados confirman que la exposición a hormonas gonadales durante el desarrollo vuelve a las hembras más vulnerables a los efectos del VPA prenatal, ya que la exposición a VPA más la exposición a E2 condujo a una alteración en la habituación social. Este modelo planteado es muy interesante porque explica la vulnerabilidad observada en machos frente al estímulo único del VPA y apunta a que alteraciones en los mismos circuitos, como el de la masculinización, pueden llevar a fenotipos diferentes entre machos y hembras. Consideramos que este es un aporte clave para entender la vulnerabilidad diferencial entre sexos al TEA y para entender también los fenotipos diferentes entre niños y niñas autistas.

## 6. Discusión

## 6.1. Diferencias entre sexos en el diagnóstico del autismo

Las teorías principales que explican las razones del sesgo entre sexos son el modelo de diferencias en el cerebro (en inglés: *Brain Differences Model*) (Baron-Cohen, Knickmeyer, and Belmonte 2005), el modelo de mayor variabilidad (en inglés: *Greater Variability Model*) (Wing 1981), el modelo de riesgo/umbral (en inglés: *Liability/Threshold Model*) (Tsai, Stewart, and August 1981), y el modelo de convergencia de masculinización del cerebro e inflamación (McCarthy and Wright 2017).

Dentro de la teoría de diferencias en el cerebro, se enmarca la teoría del cerebro masculino extremo, y propone que los cerebros masculinos y femeninos están cableados de manera diferente, lo que resulta en que los varones presenten mayor facilidad para la sistematización y las mujeres presenten mayor facilidad para empatizar [revisado en (Baron-Cohen, 2002)]. Teniendo en cuenta estas definiciones, el autismo puede ser considerado como un extremo del perfil masculino normal. De acuerdo a esto, los hombres serían más vulnerables para desarrollar TEA dado que los caracteres del TEA constituirían una forma extrema del patrón masculino en el neurodesarrollo, mientras que las mujeres son menos susceptibles a presentar TEA por sus habilidades sociales y comportamientos de empatía basalmente mayores.

La teoría de mayor variabilidad (Wing 1981) radica en que los niños presentan una mayor variabilidad dentro del espectro autista, mientras que las niñas presentan características del TEA debido a patologías determinadas. Esto lleva a que exista una mayor prevalencia, pero una menor gravedad del fenotipo, en varones en comparación con las mujeres. De esta manera, si se tienen en cuenta a los niños con un coeficiente intelectual (IQ) mayor a 50, el cociente niños:niñas es 15 veces mayor que si se tiene en cuenta al total de la población con autismo que incluyeron en ese estudio. Este modelo está explicado por la presencia de condiciones orgánicas en las hembras, y más defectos de nacimientos en las mismas, mientras que los varones presentan una mayor variabilidad genética. Queda por establecer cuál sería la causa de la mayor variabilidad en varones.

El modelo riesgo/umbral sugiere que las hembras presentan mecanismos de compensación que disminuyen la probabilidad de presentar rasgos de autismo. Este modelo propone que las mujeres y los varones presentan las mismas probabilidades de presentar TEA, pero que el umbral para ser diagnosticadas con autismo es más alto en mujeres. En otras palabras, las mujeres necesitan una dosis mayor de expresión de genes de riesgo para verse afectadas fenotípicamente. Esta teoría se complementa con la teoría de Wing, ya que las mujeres afectadas por TEA presentan un autismo más severo. En un estudio plantearon que si

las mujeres están más protegidas, deberían tener una mayor carga etiológica para manifestar el mismo grado de severidad de autismo que los varones (Robinson et al. 2013). De acuerdo con esto, en este trabajo reportaron que las mujeres con autismo presentan más probabilidad de tener hermanos con rasgos autistas que los varones, y esto probablemente se deba a que las mujeres presentan una mayor expresión de genes de riesgo requeridos para la manifestación del TEA. En la misma línea, como ya se mencionó previamente, otro trabajo reportó que las mujeres con TEA presentan sistemáticamente más variaciones de nucleótido único y variantes en el número de copias de genes que las que presentan los hombres con TEA (Jacquemont et al. 2014).

Por último, la cuarta teoría parte del concepto de que los procesos involucrados en la masculinización del cerebro convergen con los procesos involucrados en inflamación y aumenta la vulnerabilidad masculina al trastorno del espectro autista (McCarthy and Wright 2017). Basada en la investigación en roedores y en evidencia correlacional en humanos, esta teoría propone que las hembras tienen bajos niveles de señalización inflamatoria en el cerebro, mientras que el proceso natural de masculinización aumenta la inflamación en los machos y lleva a los machos más cerca del umbral de vulnerabilidad que puede traspasarse más fácilmente si procesos inflamatorios ocurren durante un período de desarrollo sensible.

Como se dijo previamente, en la teoría de diferencias en el cerebro se enmarca la teoría del cerebro masculino extremo que a su vez asume que el cerebro típico masculino es diferente al cerebro típico femenino. Un enfoque alternativo es que los cerebros típicos de hembra son también típicos de machos, y que la diferencia entre sexos existe solamente en cerebros raros con una frecuencia baja (Joel et al., 2018). En dicho trabajo se analizó la estructura de 2176 cerebros humanos y encontraron, mediante un análisis de detección de anomalías, que es igual de probable clasificar el cerebro de mujeres como un cerebro masculino que como uno femenino. Mediante algoritmos de agrupamiento no supervisados, encontraron que los "tipos" de cerebros comunes (mujer o varón) son igualmente comunes en mujeres y hombres, y que es casi tan probable que un hombre y una mujer tengan el mismo "tipo" de cerebro que dos mujeres o dos hombres. También observaron que las diferencias entre sexo más robustas se daban solamente en los cerebros "raros". Esto último significa que parece que, en lugar de consistir en dos poblaciones distintas de cerebros, es decir, "cerebros masculinos" y "cerebros femeninos", la población de cerebros humanos consiste en muchos "tipos" de cerebros que son igualmente comunes en mujeres y hombres, y en algunos "tipos" raros de cerebros, que son más probables en un sexo que en el otro (se encuentran dentro del mismo continuum, pero son más comunes en un sexo que en otro). Por último, los algoritmos de agrupamiento supervisados

revelaron que los "tipos" cerebrales típicos de una categoría de sexo en una muestra podrían ser típicos de la otra categoría de sexo en otra muestra.

Entonces, ¿existe un cerebro masculino y uno femenino? McCarthy, quien presenta la teoría de convergencia en la masculinización/inflamación, aborda la problemática mediante una revisión de los mecanismos celulares y moleculares básicos mediante los cuales las hormonas establecen las diferencias sexuales en el cerebro en las primeras etapas del desarrollo (Joel and McCarthy 2017). Ella plantea que lo más llamativo en las diferencias sexuales no radica en la diversidad de los mecanismos, sino en la distribución altamente específica en que se encuentran los diferentes mecanismos. Un ejemplo interesante es que el núcleo hipotalámico AVPV es más grande en hembras de ratas debido a la ocurrencia de muerte celular exclusivamente en machos. En este caso, tanto las neuronas dopaminérgicas como las gabaérgicas mueren, pero los mecanismos de muerte celular son muy distintos en cada tipo celular, si bien son desencadenados por la misma molécula, el estradiol (Krishnan et al. 2009; Waters and Simerly 2009). Esto lleva a la conclusión de que no puede haber una masculinización o una feminización uniforme en todo el cerebro. Con tantos puntos diferentes de variabilidad, tanto en las variantes genéticas como en la sensibilidad a factores internos y externos, es inevitable que dentro del cerebro masculino haya algunas regiones fuertemente masculinizadas, mientras que otras estarán menos masculinizadas o incluso feminizadas y viceversa. Por lo tanto, el cerebro de cada hombre y de cada mujer es un mosaico de relativa masculinización y feminización, y el resultado es una gran variabilidad entre los individuos tanto dentro de cada sexo como entre sexos (Joel and McCarthy 2017).

Para plantear las hipótesis y objetivos de esta tesis nos apoyamos sobre la cuarta teoría de sesgo entre sexos, que engloba diversas hipótesis entre las que se enmarcan las diferencias en la estructura del cerebro, en los circuitos cerebrales y en las hormonas. Para abordar y poner a prueba esta teoría, el modelo de exposición prenatal a VPA es muy útil porque recapitula el sesgo entre sexos reportado en humanos. También fuimos capaces de abordar la pregunta desde dos enfoques ya que, por un lado, nos interesaba evaluar si los machos de nuestro modelo presentan comportamientos relacionados al autismo más pronunciados que las hembras, pero sin llegar al punto de la disfunción y, a su vez, si el proceso de masculinización es el responsable de estos comportamientos. Por otro lado, nos interesó evaluar el rol de la exposición a las hormonas gonadales en la mayor susceptibilidad observada en los machos en nuestro modelo. Respecto al primer enfoque, en el cuarto capítulo, encontramos que la exposición neonatal de las hembras a esteroides sexuales resultó en un aumento en los comportamientos

repetitivos, redujo la exploración y disminuyó la desesperanza y, además, lo interesante es que el tratamiento con estradiol llevó a las hembras a comportarse de manera similar a los machos en comportamientos relevantes para el TEA. Luego en el quinto capítulo pudimos obtener resultados que dan sustento a la hipótesis de que los machos son más vulnerables al tratamiento con VPA debido al proceso de masculinización, ya que observamos que las hembras VPA masculinizadas muestran alteraciones en la dinámica social.

## 6.2. Interacción entre el tratamiento con VPA y la masculinización mediante la exposición a estradiol postnatal en ratones.

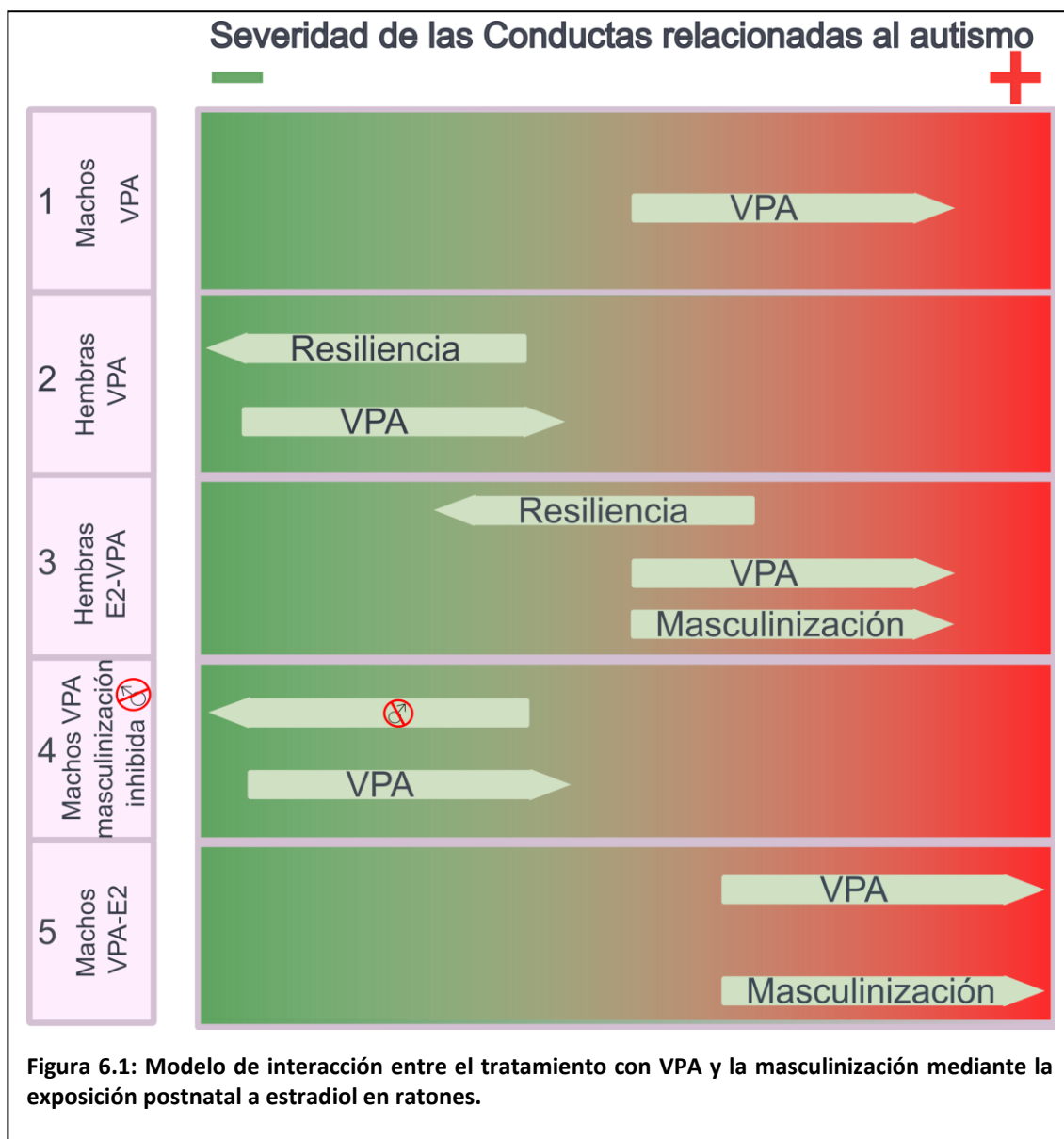
La figura 6.1 muestra un esquema donde se observan nuestras hipótesis acerca de la interacción entre el tratamiento prenatal con VPA y el proceso de masculinización en ratones.

En el caso de los machos que son tratados con VPA, el tratamiento es suficiente para que muestren conductas relacionadas al autismo, como se observó en el capítulo 3, donde los machos VPA mostraron alteraciones en la sociabilidad, un aumento en los comportamientos repetitivos y en los comportamientos de desesperanza en el ensayo de natación forzada. A su vez, en el mismo capítulo se reportó que los animales VPA mostraron una actividad neuronal basal elevada en la corteza piriforme respecto a los controles. De esta manera, el tratamiento con VPA no sólo afectó las conductas relacionadas al autismo, sino también, a nivel celular, una de las alteraciones celulares más robustas y consistentes que observamos en distintas cohortes de animales en nuestro laboratorio.

En el caso de las hembras que fueron tratadas con VPA en el capítulo 5, observamos que no presentaron alteraciones en los comportamientos relacionados al autismo en la adultez, recapitulando resultados previos de nuestro grupo (Kazlauskas et al. 2019). Proponemos entonces, como se observa en el segundo cuadro de la figura 6.1, que el VPA en las hembras se presenta como un estímulo que no es suficiente para provocar alteraciones relacionadas al autismo en adultas, ya que la resiliencia intrínseca que presentan las hembras desplaza al fenotipo hacia la izquierda en el esquema de la figura 6.1, lo que significa que no se observan alteraciones a pesar de la exposición al VPA.

La hipótesis principal del capítulo 5 es que la resiliencia de las hembras está dada por la ausencia de hormonas gonadales durante el período postnatal temprano, por lo que las hembras no atraviesan el proceso de masculinización durante el desarrollo que sería afectado





por el VPA mediante mecanismos epigenéticos o de alteración de los procesos normales de desarrollo de los distintos circuitos neuronales. Si bien desconocemos estos mecanismos, un trabajo previo de nuestro laboratorio reportó que las hembras VPA muestran signos de activación glial en el período entre P21 y P42 en el giro dentado y en la región CA1 en el hipocampo, así como en el lóbulo 7 del cerebelo (Kazlauskas et al. 2016). Podría ser que estas alteraciones observadas en el grupo VPA en el período juvenil también estén contribuyendo a la resiliencia en hembras y a prevenir alteraciones fenotípicas en las ratonas adultas. Queda por analizar si dichas alteraciones gliales observadas en las hembras VPA durante el período juvenil contribuyen efectivamente a la resiliencia, o en realidad son responsables del fenotipo social observado en esta tesis en el juego juvenil. En esta línea, trabajos no publicados del grupo muestran que la aplicación de un estímulo inflamatorio durante el período juvenil resulta en que las hembras VPA muestren una menor sociabilidad en la adultez, sugiriendo que si la

neuroinflamación participa en la resiliencia, lo hace de manera basal, ya que una mayor inflamación puede afectar negativamente la conducta.

En el tercer cuadro de la figura 6.1 se presentan las hembras en las cuales el estímulo del VPA más la masculinización del cerebro mediante la exposición a estradiol resulta en alteraciones relacionadas al autismo a pesar de los mecanismos de resiliencia. Este enfoque fue analizado en el capítulo 5, donde se observó que las hembras prenatalmente expuestas a VPA y a quienes se les inyectó E2 en el período postnatal presentaron una alteración en la habituación a un estímulo social respecto a los controles, tanto en el ensayo de interacción social como en el ensayo de habituación y reconocimiento de la novedad social. En este grupo podemos proponer dos mecanismos posibles de interacción entre tratamientos. Por un lado, hipotetizamos que tanto el VPA como la masculinización empujan el desarrollo de los circuitos relevantes hacia comportamientos relacionados con el TEA, y que la resiliencia de las hembras no es suficiente para evitar que esto ocurra. Por otro lado, planteamos que la masculinización en realidad facilita que el VPA afecte a los circuitos relevantes, y entonces sólo puedan verse los efectos del VPA cuando están ocurriendo los procesos celulares y moleculares típicos de la masculinización.

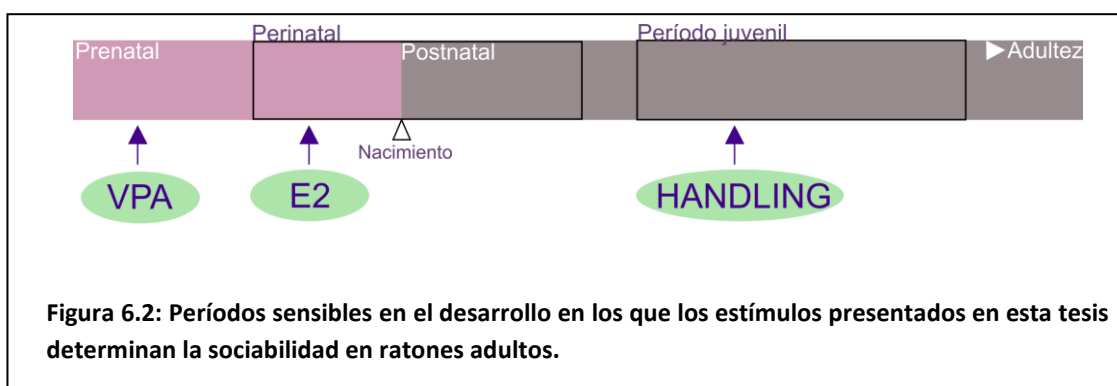
Consideramos que dicha hipótesis podría ponerse a prueba utilizando acercamientos farmacológicos o genéticos que impidan la masculinización en machos, como se muestra en la caja 4 del cuadro (Figura 6.1). Así, si a los machos VPA se les inhibe el proceso de masculinización, no presentarán alteraciones relacionadas al autismo. Para llevar a cabo estos experimentos, proponemos por ejemplo utilizar un inhibidor de la enzima ciclooxygenasa (COX) como la Indometacina, ya que se ha observado que el tratamiento temprano con esta droga altera el comportamiento sexual masculino en machos adultos [en particular, resulta en un aumento en la latencia a montar, a eyacular y a realizar la primera intromisión, así como disminuye la frecuencia de intromisiones y de montar (Amateau and McCarthy 2004)]. Algunos trabajos han demostrado que el mecanismo subyacente a este resultado consiste en que la COX cataliza la formación de un prostanoide intermedio inestable que luego se isomeriza a prostaglandina E2 (PGE2), y que esta molécula, a su vez, estimula la síntesis de estradiol en el cerebelo en desarrollo de rata a través de una mayor actividad de la enzima aromatasa (Hla et al. 1999; Murakami et al. 2002). De esta manera, el mediador inflamatorio, la PGE2, es la molécula de señalización crítica que es necesaria y suficiente para la masculinización (Amateau and McCarthy 2004). Proponemos entonces la hipótesis de que la inhibición del proceso de masculinización en machos VPA resultará en animales que no presenten alteraciones relacionadas al autismo, o que muestren una atenuación en los síntomas.

Finalmente, en el último cuadro del esquema de la Figura 6.1, se plantea que en animales macho VPA que recibieron estradiol durante el período postnatal, esperaríamos observar un fenotipo relacionado al autismo más agravado. Cabe aclarar que podría esperarse que este experimento no funcione como esperamos por un efecto techo, ya que la aromatasa es la enzima limitante en la biosíntesis de estradiol y además, los receptores de estrógeno están distribuidos en el cerebro de manera discreta (Balthazart and Ball 2012). Sin embargo, se ha reportado previamente que el tratamiento con estradiol y testosterona a partir del día P11, estimula la aparición precoz de patrones de comportamiento montantes, intromisivos y, en menor medida, eyaculadores en ratas macho prepuberales (Baum 1972), dejando en evidencia que es posible exacerbar al menos algunos mecanismos de masculinización.

### 6.3. Períodos sensibles en el desarrollo que determinan la sociabilidad en ratones adultos

Un período crítico es el momento durante el desarrollo a lo largo del cual un individuo es mucho más receptivo a un estímulo ambiental que en otros períodos (Sachser et al. 2020). Por ejemplo, en ratones, el estrés crónico durante la adolescencia puede generar un comportamiento relacionado a la ansiedad en adultos, mientras que el mismo estímulo en la adultez no tiene ningún efecto en los comportamientos relacionados a la ansiedad (Yohn and Blendy 2017). Cabe destacar que las experiencias durante diferentes etapas de la vida que tienen diferentes consecuencias en el fenotipo comportamental no son todo o nada, debido a mecanismos de compensación mediante los cuales el organismo intenta compensar la falta de una experiencia temprana relevante. Es por esto que algunos autores prefieren no utilizar el término fase o período 'crítico' y definen un **período sensible** como una etapa específica de la vida durante la cual los estímulos ambientales moldean preferentemente un aspecto o aspectos del desarrollo del comportamiento, y lo hacen de una manera que difiere de los efectos durante otras etapas (Sachser et al. 2020).

Como se menciona anteriormente, en esta tesis hemos identificado tres períodos sensibles que son claves para el desarrollo de la sociabilidad (Figura 6.2), y a continuación discutiremos cada uno de ellos.



### 6.3.1. Período prenatal

En la fase prenatal, el vientre provee un nivel de protección al feto de la influencia de estímulos ambientales, además de poner a disponibilidad todos los nutrientes necesarios y mediar la desintoxicación de los desechos del feto a través del flujo sanguíneo materno. Sin embargo, al mismo tiempo, los factores ambientales puede afectar a la madre y mediante mecanismos maternos modular el desarrollo del feto, resultando a veces en consecuencias a largo plazo para el fenotipo comportamental de las crías (Sachser et al. 2020). Por ejemplo, en el capítulo 3 y en trabajos previos del grupo se reporta que la exposición a VPA prenatal en el día gestacional 12.5 lleva a alteraciones en los comportamientos relacionados al autismo en las crías macho (Campolongo et al., 2018; Seiffe et al., 2022).

El mecanismo propuesto para explicar la acción teratogénica del VPA involucra distintas vías que pueden afectar el desarrollo prenatal. Por un lado, como se mencionó en la introducción, el ácido valproico es un fármaco antiepiléptico y su mecanismo principal se basa en aumentar la concentración de GABA en el cerebro, aunque también se ha demostrado que puede modular canales de sodio dependientes de voltaje (Chomiak, Turner, and Hu 2013). Este mecanismo de acción va en línea con la teoría de que al menos algunas formas de autismo son causadas por un aumento en la relación de excitación/inhibición en los sistemas sensoriales, mnemotécnicos, sociales y emocionales (Pizzarelli and Cherubini 2011; Rubenstein and Merzenich 2003). En esta línea, se han reportado en pacientes con TEA niveles elevados de gama-aminoácido butírico (GABA) en plasma, una disminución de las enzimas del sistema GABAérgico y una disminución de la disponibilidad de GABA en pacientes con autismo [revisado en (van Kooten et al. 2005)]. También se ha observado un porcentaje de pacientes con TEA que presentan mutaciones únicas en genes que codifican para moléculas de adhesión de células

sinápticas de las familias de neurexina (NRXN)-neuroligina (NLG) [revisado en (Geschwind and Levitt 2007)], moléculas de adhesión que contribuyen a mantener un balance inhibitorio/excitatorio apropiado a nivel neuronal. A su vez, la función GABAérgica alterada puede reducir el umbral para desarrollar convulsiones, y esto explicaría la alta comorbilidad entre epilepsia y TEA (Brooks-Kayal 2010). En el modelo VPA en roedores se ha reportado una reducción en el número de neuronas inhibitorias parvalbúmina positivas (Gogolla et al. 2009) y una alteración en el balance excitatorio/inhibitorio en la amígdala lateral (Markram et al. 2008). Es relevante mencionar que, mientras que en el cerebro maduro GABA presenta función inhibitoria, durante el desarrollo, este neurotransmisor presenta función excitatoria (Ben-Ari 2002), así el aumento en la señalización por GABA en ciertas etapas del desarrollo puede desencadenar un aumento en la actividad neuronal que desencadene mecanismos compensatorios que afecten el normal desarrollo del cerebro. Por otro lado, la señalización de calcio mediada por GABA regula una variedad de procesos diferentes durante el desarrollo como la proliferación celular, la migración, la diferenciación, la maduración de sinapsis y la muerte celular (Owens and Kriegstein 2002). Teniendo en cuenta las distintas funciones de GABA, sobre todo durante el desarrollo, no sorprende que la alteración de la señalización GABAérgica pueda dar lugar a un procesamiento de información aberrante, como ocurre en el TEA.

Por otro lado, como se mencionó en la introducción, el VPA es un inhibidor de deacetilasas de histonas (Phiel et al. 2001) y como tal podría alterar el estado epigenético, afectar los programas de expresión génica durante el desarrollo, interrumpir el ciclo celular e inducir apoptosis. De hecho este mecanismo de acción podría explicar los efectos teratogénicos del VPA (Ornøy 2009). De hecho, el inhibidor de la deacetilasa de histonas Tricostatina A, tiene efectos teratogénicos notablemente similares al VPA en embriones de vertebrados, mientras que análogos del VPA que no inhiben la deacetilasa de histonas, como la Valpromida, no tienen efectos teratogénicos (Phiel et al. 2001).

Si bien ambos mecanismos estarán actuando conjuntamente en nuestro modelo VPA, algunos pocos trabajos experimentales sugieren que los efectos relevantes sobre la conducta se deberían al efecto como modulador de las acetilasas de histonas. Por un lado, la exposición a VPA en el GD 12.5 genera un aumento transitorio en los niveles de acetilación en el cerebro embrionario, seguido de un aumento en la apoptosis en la neocorteza y una disminución de la proliferación celular en la eminencia ganglionar (Kataoka et al. 2013). Además, se ha observado que la exposición a Valpromida en el GD 12.5 no resulta en alteraciones en la conducta relacionadas con el autismo (Kataoka et al. 2013), dejando en evidencia que este mecanismo es fundamental.

### 6.3.2. *Período neonatal*

En la mayoría de los mamíferos, el período neonatal es esencialmente una extensión de la gestación. De hecho, hay muchos procesos de maduración que ocurren de manera prenatal en humanos, mientras que en roedores comienzan en etapa prenatal, pero terminan en el período postnatal. Distintos autores consideran que la transición entre el período perinatal y la infancia sucede en roedores entre los días postnatal 4 y 7 [revisado en (Bell, 2018)]. Durante este período, como se dijo anteriormente y entre otros fenómenos que tienen lugar en el sistema nervioso central, se lleva a cabo el período organizacional del proceso de masculinización del cerebro. Así, sólo los machos sufren una exposición a testosterona, lo que, a su vez moldea tejidos reproductivos y neurales durante el desarrollo, y de esta manera, estos circuitos pueden ser activados por hormonas circulantes en períodos más avanzados [revisado en (McCarthy, 2008)]. Entonces, en el período organizacional, uno de los principales factores que diferencian hembras de machos, además de los cromosomas sexuales, son las hormonas gonadales. La liberación de estas hormonas está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, donde el factor de liberación de gonadotropinas liberado en el hipotálamo, estimula la liberación de gonadotropinas en la hipófisis, las que a su vez estimulan las gónadas para producir hormonas sexuales, como el estradiol, la progesterona y la testosterona (Kaprra and Huhtaniemi 2018). De esta manera, en ratones hembras y machos la concentración de estradiol en suero es indetectable durante la primera semana de vida (Dutta et al. 2014; Ferri et al. 2018), mientras que los niveles de testosterona en machos son mucho mayores que en hembras durante el mismo período (Clarkson and Herbison 2016; Corbier, Edwards, and Roffi 1992).

En esta tesis hemos observado que la exposición a hormonas gonadales durante el período postnatal afecta la conducta en adultos (capítulo 4), en particular las conductas de exploración, de desesperanza y estereotipadas se ven afectadas luego del tratamiento con estradiol neonatal. Además, en el capítulo 5, observamos una interacción del tratamiento neonatal con estradiol con la exposición prenatal a VPA, ya que las hembras VPA-E2 no habituaron a un estímulo social en la adultez. Hay otros reportes donde se observó que los comportamientos sociales están influenciados por la exposición a hormonas gonadales, por ejemplo cuando se evalúa el juego juvenil (Cox and Rissman 2011).

Los mecanismos mediante los cuales la exposición neonatal a estradiol, tanto de hembras naive como de hembras expuestas prenatalmente a VPA, pueden afectar el desarrollo de comportamientos relacionados con el TEA necesitan ser explorados. Durante el período organizacional, entre los días P1-3, se desarrolla la barrera hemato-encefálica, continúa

desarrollándose el sistema inmune y ocurre la maduración de oligodendrocitos [revisado en (Semple et al., 2013)]. Muchas de las diferencias entre machos y hembras en el desarrollo del cerebro y del comportamiento son atribuidas a las diferencias entre sexos en las células del sistema inmune en el cerebro inmaduro (Nelson and Lenz 2017), por lo que entender las diferencias entre sexos en el sistema neuroinmune en desarrollo puede ayudar a echar luz sobre los mecanismos que dan sensibilidad al período neonatal y, eventualmente, a la etiología del TEA.

Las células inmunocompetentes que residen en el sistema nervioso central tienen un origen periférico (microglía, mastocitos, y células dendríticas) o derivan de células neurales (astrocitos) y son capaces de secretar mediadores inflamatorios. En particular, la microglía deriva del saco embrionario vitelino y los progenitores de microglía se infiltran en el sistema nervioso central en roedores entre los días de gestación 8 y 9.5, donde proliferan y, alrededor de 4-5 semanas después alcanzan niveles máximos [revisado en (Nelson and Lenz 2017)] , para luego disminuir en un 50% entre la tercera y la sexta semana posnatal debido a un aumento de la apoptosis y la disminución de la proliferación (Nikodemova et al. 2015). La morfología de la microglía en adultos puede ser clasificada en “ramificada”, “intermedia” y “no ramificada”. La microglía no ramificada e intermedia son consideradas como activas o reactivas, mientras que la microglía ramificada se considera quiescente (Doyle et al. 2017; Kreutzberg 1996). Bajo condiciones patológicas, la microglía ramificada retrae sus ramificaciones, adquiere capacidad fagocítica y libera citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. La microglía inmadura en el cerebro en desarrollo presenta la forma activada y secreta altos niveles de mediadores inflamatorios, estos mediadores están implicados en la proliferación celular, la diferenciación, la migración, la muerte celular y el establecimiento del patrón sináptico (Lenz and McCarthy 2015). Resulta interesante resaltar que hay un sesgo entre sexos en la microglía en el cerebro en desarrollo, ya que los machos presentan mayor cantidad de microglía en etapas tempranas en el desarrollo (Lenz and McCarthy 2015). Esta diferencia comienza a manifestarse durante el período organizacional. De hecho, en el área preóptica, donde los machos tienen más microglía y mayor proporción de microglía ameboide que las hembras, cuando las hembras son tratadas con estradiol se observó un aumento en el número y la proporción de microglía ameboide (Lenz et al. 2013). En este mismo trabajo demostraron que las diferencias sexuales de la microglía en el POA son necesarias para el comportamiento sexual dimórfico que los animales exhiben en la adultez.

Resultados previos del grupo han demostrado alteraciones en los animales expuestos prenatalmente a VPA tanto en la microglía y en los astrocitos, como en la respuesta a estímulos

inflamatorios (Kazlauskas et al., 2016; Kazlauskas et al., 2019; Lucchina and Depino, 2014). En base a todos estos antecedentes y a los resultados presentados en esta tesis, consideramos relevante evaluar el rol de la microglía durante el desarrollo, su interacción con la masculinización y cómo afecta a los comportamientos sociales en animales adultos.

### 6.3.3. *Período juvenil*

El período peri-adolescente, que está compuesto por la infancia tardía y la adolescencia, representa un período sensible respecto a los efectos a largo plazo del estrés en el cerebro social (Tzanoulinou and Sandi 2015). Éste incluye la pubertad y la maduración sexual, que se caracterizan por presentar cambios hormonales, fisiológicos y neuronales que hacen que los individuos de este grupo de edad sean únicos en comparación con los miembros más jóvenes o mayores de su especie (Spear 2000). En los seres humanos se puede considerar que la adolescencia oscila entre los 10 o 12 años y los 18 años, mientras que en roedores se ha propuesto que la adolescencia comienza en P28 y termina aproximadamente en P42 (Spear 2000). Durante este período, en humanos, si bien las experiencias positivas o regulares son necesarias para desarrollar y refinar el repertorio conductual futuro, junto con las correspondientes adaptaciones neurobiológicas, las experiencias negativas pueden ser excepcionalmente perjudiciales para el individuo en desarrollo y pueden conducir a una psicopatología (Heim and Binder 2012).

Como se desarrolló en la introducción, los modelos murinos permiten, además del alto grado de control experimental, evaluar con alta especificidad las relaciones entre condiciones tempranas y fenotipos conductuales a largo plazo, junto con los mecanismos neurobiológicos subyacentes. Entre estos modelos se destacan: el aislamiento social a partir del P21, donde se observó que animales sometidos a aislamiento durante la adolescencia mostraron alteraciones en los comportamientos sociales (Bicks et al. 2020; Makinodan et al. 2012); protocolos de estrés a partir de P28, donde las ratas macho sometidas a experiencias de inducción de miedo exhiben tasas altas y sostenidas de aumento de la agresión en la edad adulta (Márquez et al. 2013); modelos de derrota social, donde se observó que los ratones expuestos a un protocolo de derrota social durante 10 días en la etapa adolescente mostraron un índice mayor de evitación social (Zhang et al. 2016); y la manipulación de los animales durante el período juvenil como se desarrolló en el capítulo 3 (Seiffe et al. 2022).

Las experiencias estresantes alteran con frecuencia el "punto de ajuste" del eje HPA, lo que puede provocar cambios permanentes en los niveles de glucocorticoides basales y/o inducidos por el estrés (Sandi and Haller 2015). Las alteraciones inducidas por el estrés pueden



tener efectos inmediatos sobre la función cerebral a través de mecanismos no genómicos, y efectos a largo plazo mediados por cambios en la transcripción de genes [revisado en (Sandi and Haller 2015)]. Lo que presentan en común los modelos murinos mencionados es que los distintos protocolos de estrés llevan a diferentes patrones de alteración en el eje HPA. Entre estos protocolos, se encontró que los machos expuestos a estrés durante el período peripuberal presentaron una disminución de corticosterona en plasma en la adultez (Márquez et al. 2013); también, los machos que fueron sometidos a un protocolo de subyugación social, presentaron menores niveles de cortisol que los controles luego de la derrota social (Wommack et al. 2004); por último, se reportó que el aislamiento social luego del destete, si bien no alteró los niveles de corticosterona basales, indujo una producción de casi el doble de glucocorticoides frente a eventos de agresión (Toth et al. 2011).

Estas alteraciones en la respuesta al estrés podrían resultar de adaptaciones moleculares y celulares dentro de diferentes componentes del eje HPA, así como en las regiones del cerebro que regulan la actividad del eje HPA [revisado en (Sandi and Haller 2015)]. Por ejemplo, el estrés induce cambios en la expresión de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala (De Kloet, Joëls, and Holsboer 2005), así como en el circuito neural que regula la actividad de las neuronas hipotálamicas que expresan la hormona liberadora de corticotropina, que incluye al área preóptica y a otros núcleos hipotálamicos que se proyectan hacia el núcleo periventricular (Lupien et al. 2009).

El estrés es un potente modulador de la estructura y función del cerebro, y la mayoría de las áreas del cerebro que son particularmente vulnerables al estrés (como la amígdala, la corteza prefrontal, el hipocampo y el sistema mesolímbico) presentan alteraciones funcionales y/o estructurales en individuos con conductas sociales alteradas (Sandi and Haller 2015). El análisis de la actividad cerebral ha demostrado un aumento en la actividad neuronal en la amígdala en ratas que fueron aisladas luego del destete (Toth et al. 2011) y que fueron sometidas a protocolos de estrés como olor de zorro y plataforma elevada (Márquez et al. 2013). También, se observó que el modelo de subyugación social conduce a un mayor número de células tirosina hidroxilasa inmunorreactivas en la amígdala media durante la exposición al estrés (Wommack et al. 2004). Además, los animales de este modelo también mostraron una disminución en los niveles de arginina-vasopresina (AVP) en el hipotálamo anterior en paralelo con un aumento en la densidad de varicosidades serotoninérgicas tanto en el septo lateral como en el hipotálamo anterior (Delville, Melloni, and Ferris 1998). Con todo esto, esperaríamos que el mecanismo subyacente a la recuperación de las conductas sociales en los animales sometidos a la manipulación juvenil esté relacionado con el eje HPA. De hecho, nuestro grupo ha reportado

una hiperreactividad del eje HPA en animales VPA, por lo que se puede hipotetizar que la sensibilización del eje por la exposición a VPA interactúa con la manipulación juvenil para modular la conducta en adultos (Lucchina and Depino 2014).

#### 6.4. Conclusiones generales

Esta tesis contribuye a un mejor entendimiento de las diferencias en la vulnerabilidad al autismo entre niños y niñas a través de la utilización de un modelo de TEA en ratón. Entre los resultados principales se destacan la importancia del proceso de masculinización del cerebro en la vulnerabilidad en machos, ya que hembras masculinizadas mediante la exposición postnatal a estradiol junto con la exposición prenatal a ácido valproico mostraron alteraciones en la sociabilidad en la adultez. Otro resultado que se destaca es la identificación de la cuarta y quinta semana de vida como un período sensible importante ya que, mediante un protocolo de manipulación, se lograron revertir las alteraciones comportamentales observadas en los machos expuestos prenatalmente a VPA.

Creemos que esta tesis abre nuevos interrogantes que incluyen comprender los mecanismos mediante los cuales la masculinización del cerebro interactúa con el VPA para afectar las conductas relacionadas con el TEA. En esta línea proponemos a la microglía y a moléculas inflamatorias como las prostaglandinas, como posibles mediadores celulares y moleculares de los efectos. Por otro lado, sería interesante evaluar si en nuestro modelo de manipulación juvenil, el rescate en los comportamientos relacionados al autismo está dado por una alteración en el proceso de masculinización. Para contrastar esta hipótesis, habría que analizar los comportamientos reproductivos y de territorialidad típicos de los animales macho, en animales adultos que fueron sometidos a manipulación juvenil. Finalmente, creemos que sería interesante evaluar el rol que juega el eje HPA y los glucocorticoides en estas conductas y en los distintos períodos sensibles y mecanismos involucrados.



Lic. Araceli Seiffe



Dra. Amaicha Mara Depino

## 7. Bibliografía

- Abdallah, Morsi W., Nanna Larsen, Jakob Grove, Bent Norgaard-Pedersen, Poul Thorsen, Erik L. Mortensen, and David M. Hougaard. 2013. "Amniotic Fluid Inflammatory Cytokines: Potential Markers of Immunologic Dysfunction in Autism Spectrum Disorders." *World Journal of Biological Psychiatry* 14(7):528–38. doi: 10.3109/15622975.2011.639803.
- Abrahams, Brett S., and Daniel H. Geschwind. 2008. "Advances in Autism Genetics: On the Threshold of a New Neurobiology." *Nature Reviews Genetics* 9(5):341–55. doi: 10.1038/nrg2346.
- Amateau, Stuart K., and Margaret M. McCarthy. 2004. "Induction of PGE2 by Estradiol Mediates Developmental Masculinization of Sex Behavior." *Nature Neuroscience* 7(6):643–50. doi: 10.1038/nn1254.
- American Psychological Association (APA). 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Depressive Disorders*. American Psychiatric Publishing, Inc.
- Atladóttir, Hjördis Ó., Poul Thorsen, Lars Østergaard, Diana E. Schendel, Sanne Lemcke, Morsi Abdallah, and Erik T. Parner. 2010. "Maternal Infection Requiring Hospitalization during Pregnancy and Autism Spectrum Disorders." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 40(12):1423–30. doi: 10.1007/s10803-010-1006-y.
- Auger, Anthony P., and K. M. Olesen. 2009. "Brain Sex Differences and the Organisation of Juvenile Social Play Behaviour." *Journal of Neuroendocrinology* 21(6):519–25. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01871.x.
- Auyeung, Bonnie, Simon Baron-Cohen, Emma Ashwin, Rebecca Knickmeyer, Kevin Taylor, and Gerald Hackett. 2009. "Fetal Testosterone and Autistic Traits." *British Journal of Psychology* 100(1):1–22. doi: 10.1348/000712608X311731.
- Ayhan, Fatma, and Genevieve Konopka. 2019. "Regulatory Genes and Pathways Disrupted in Autism Spectrum Disorders." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 89(August 2018):57–64. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.08.017.
- Azmitia, Efrain C., Jorawer S. Singh, Xiao P. Hou, and Jerzy Wegiel. 2011. "Dystrophic Serotonin Axons in Postmortem Brains from Young Autism Patients." *Anatomical Record* 294(10):1653–62. doi: 10.1002/ar.21243.
- Bailey, A., A. Le Couteur, I. Gottesman, P. Bolton, E. Simonoff, E. Yuzda, and M. Rutter. 2013. "Autism as a Strongly Genetic Disorder: Evidence from a British Twin Study." *The Science of Mental Health: Volume 2: Autism* 91–105.
- Bakker, Julie, Christelle De Mees, Quentin Douhard, Jacques Balthazart, Philippe Gabant, Josiane Szpirer, and Claude Szpirer. 2006. "Alpha-Fetoprotein Protects the Developing Female Mouse Brain from Masculinization and Defeminization by Estrogens." *Nature Neuroscience* 9(2):220–26. doi: 10.1038/nn1624.
- Balthazart, Jacques, and Gregory Ball, eds. 2012. *Brain Aromatase, Estrogens, and Behavior*. Oxford University Press.
- Bargiela, Sarah, Robyn Steward, and William Mandy. 2016. "The Experiences of Late-Diagnosed Women with Autism Spectrum Conditions: An Investigation of the Female Autism Phenotype." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 46(10):3281–94. doi: 10.1007/s10803-016-2872-8.
- Baron-Cohen, Simon. 2002. "The Extreme Male Brain Theory of Autism." *Trends in Cognitive Sciences* 6(6):248–54. doi: 10.1016/S1364-6613(02)01904-6.
- Baron-Cohen, Simon, Rebecca C. Knickmeyer, and Matthew K. Belmonte. 2005. "Sex Differences in the Brain: Implications for Explaining Autism." *Science* 310(5749):819–23.

doi: 10.1126/science.1115455.

Baron-Cohen Simon, S. 2010. *Empathizing, Systemizing, and the Extreme Male Brain Theory of Autism*. Vol. 186. Elsevier B.V.

Baron-Cohen, Simon, Alexandros Tsompanidis, Bonnie Auyeung, Bent Nørgaard-Pedersen, David M. Hougaard, Morsi Abdallah, Arie Cohen, and Alexa Pohl. 2020. "Foetal Oestrogens and Autism." *Molecular Psychiatry* 25(11):2970–78. doi: 10.1038/s41380-019-0454-9.

Baum, Michael J. 1972. "Precocious Mating in Male Rats Following Treatment with Androgen or Estrogen." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 78(3):356–67. doi: 10.1037/h0032288.

Beery, Annaliese K. 2018. "Inclusion of Females Does Not Increase Variability in Rodent Research Studies." *Current Opinion in Behavioral Sciences* 23:143–49. doi: 10.1016/j.cobeha.2018.06.016.

Beery, Annaliese K., and Irving Zucker. 2011. "Sex Bias in Neuroscience and Biomedical Research." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35(3):565–72. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.07.002.

Bekkers, John M., and Norimitsu Suzuki. 2013. "Neurons and Circuits for Odor Processing in the Piriform Cortex." *Trends in Neurosciences* 36(7):429–38. doi: 10.1016/j.tins.2013.04.005.

Bell, Donna; 1971. "Sex Differences in Body Weight and Eating : Organization and Activation by Gonadal Hormones in the Raf." 7:27–34. doi: 10.1016/0031-9384(71)90231-9.

Bell, Margaret R. 2018. "Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans." *Endocrinology* 159(7):2596–2613. doi: 10.1210/en.2018-00220.

Ben-Ari, Yehezkel. 2002. "Excitatory Actions of GABA during Development: The Nature of the Nurture." *Nature Reviews Neuroscience* 3(9):728–39. doi: 10.1038/nrn920.

Betancur, Catalina, Takeshi Sakurai, and Joseph D. Buxbaum. 2009. "The Emerging Role of Synaptic Cell-Adhesion Pathways in the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders." *Trends in Neurosciences* 32(7):402–12. doi: 10.1016/j.tins.2009.04.003.

Bicks, Lucy K., Kazuhiko Yamamuro, Meghan E. Flanigan, Julia Minjung Kim, Daisuke Kato, Elizabeth K. Lucas, Hiroyuki Koike, Michelle S. Peng, Daniel M. Brady, Sandhya Chandrasekaran, Kevin J. Norman, Milo R. Smith, Roger L. Clem, Scott J. Russo, Schahram Akbarian, and Hirofumi Morishita. 2020. "Prefrontal Parvalbumin Interneurons Require Juvenile Social Experience to Establish Adult Social Behavior." *Nature Communications* 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-14740-z.

Bielajew, C., A. T. M. Konkle, A. C. Kentner, S. L. Baker, A. Stewart, A. A. Hutchins, L. Santa-Maria Barbagallo, and G. Fouriez. 2003. "Strain and Gender Specific Effects in the Forced Swim Test: Effects of Previous Stress Exposure." *Stress* 6(4):269–80.

Bilbo, Staci D., Nicholas J. Newsom, David B. Sprunger, Linda R. Watkins, Jerry W. Rudy, and Steven F. Maier. 2007. "Differential Effects of Neonatal Handling on Early Life Infection-Induced Alterations in Cognition in Adulthood." *Brain, Behavior, and Immunity* 21(3):332–42. doi: 10.1016/j.bbi.2006.10.005.

Bölte, Sven, Sonya Girdler, and Peter B. Marschik. 2019. "The Contribution of Environmental Exposure to the Etiology of Autism Spectrum Disorder." *Cellular and Molecular Life Sciences* 76(7):1275–97. doi: 10.1007/s00018-018-2988-4.

- Brinkmann, A. O., L. J. Blok, P. E. De Ruiter, P. Doesburg, K. Steketeer, C. A. Berrevoets, and J. Trapman. 1999. "Mechanisms of Androgen Receptor Activation and Function." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 69(1–6):307–13. doi: 10.1016/S0960-0760(99)00049-7.
- Brooks-Kayal, Amy. 2010. "Epilepsy and Autism Spectrum Disorders: Are There Common Developmental Mechanisms?" *Brain and Development* 32(9):731–38. doi: 10.1016/j.braindev.2010.04.010.
- Brooks, Mollie, E., Kasper Kristensen, Van Benthem, Koen, J., Arni Magnusson, W. Berg, Casper, Anders Nielsen, J. Skaug, Hans, Martin Mächler, and M. Bolker, Benjamin. 2017. "GlmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-Inflated Generalized Linear Mixed Modeling." *The R Journal* 9(2):378. doi: 10.32614/RJ-2017-066.
- Brown, L. M., and D. J. Clegg. 2010. "Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Central Effects of Estradiol in the Regulation of Food Intake , Body Weight , and Adiposity &." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 122(1–3):65–73. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.12.005.
- Bullitt, Elizabeth. 1990. "Expression of C-fos-like Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 296(4):517–30. doi: 10.1002/cne.902960402.
- Byers, Shannon L., Michael V. Wiles, Sadie L. Dunn, and Robert A. Taft. 2012. "Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images." *PLoS ONE* 7(4):1–5. doi: 10.1371/journal.pone.0035538.
- Campolongo, Marcos, Nadia Kazlauskas, German Falasco, Leandro Urrutia, Natalí Salgueiro, Christian Höcht, and Amaicha Mara Depino. 2018. "Sociability Deficits after Prenatal Exposure to Valproic Acid Are Rescued by Early Social Enrichment." *Molecular Autism* 9(1):1–17. doi: 10.1186/s13229-018-0221-9.
- Can, Adem, David T. Dao, Michal Arad, Chantelle E. Terrillion, Sean C. Piantadosi, and Todd D. Gould. 2011. "The Mouse Forced Swim Test." *Journal of Visualized Experiments* (58):4–8. doi: 10.3791/3638.
- Castagné, Vincent, Paul Moser, Sylvain Roux, and Roger D. Porsolt. 2010. "Rodent Models of Depression: Forced Swim and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice." *Current Protocols in Pharmacology* 49(1):1–14. doi: 10.1002/0471141755.ph0508s49.
- Chadman, Kathryn K., Mu Yang, and Jacqueline N. Crawley. 2009. "Criteria for Validating Mouse Models of Psychiatric Diseases." *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics* 150(1):1–11. doi: 10.1002/ajmg.b.30777.
- Chaste, Pauline, and Marion Leboyer. 2012. "Autism Risk Factors: Genes, Environment, and Gene-Environment Interactions." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 14(3):281–92. doi: 10.31887/DCNS.2012.14.3/pchaste.
- Chess, Stella. 1971. "Autism in Children with Congenital Rubella." *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia* 1(1):33–47. doi: 10.1007/BF01537741.
- Chiarotti, Flavia, and Aldina Venerosi. 2020. "Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates since 2014." *Brain Sciences* 10(5). doi: 10.3390/brainsci10050274.
- Choe, Han, Michael Reed, Nora Benavidez, Daniel Montgomery, Natalie Soares, Yeong Shin Yim, and Gloria B. Choi. 2016. "Cues of Opposing Valence." *Stress* 87(1):152–63. doi: 10.1016/j.neuron.2015.06.022.Oxytocin.

- Chomiak, Taylor, Nathanael Turner, and Bin Hu. 2013. "What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid." *Pathology Research International* 2013. doi: 10.1155/2013/712758.
- Christensen, Deborah L. et al. 2018. "Correction and Republication: Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012." *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 67(45):1279. doi: 10.15585/mmwr.mm6745a7.
- Christensen, Deborah L. et al, Kim Van Naarden Braun, Jon Baio, Deborah Bilder, Jane Charles, John N. Constantino, Julie Daniels, Maureen S. Durkin, Robert T. Fitzgerald, Margaret Kurzius-Spencer, Li-Ching Lee, Sydney Pettygrove, Cordelia Robinson, Eldon Schulz, Chris Wells, Martha S. Wingate, Walter Zahorodny, and Marshelyn Yeargin-Allsopp. 2018. "Correction and Republication: Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012." *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 67(45):1279. doi: 10.15585/mmwr.mm6745a7.
- Christianson, Arnold L., Nicole Chester, and Jennifer G. R. Kromberg. 2008. "Fetal Valproate Syndrome: Clinical and Neuro-Developmental Features in Two Sibling Pairs." *Developmental Medicine & Child Neurology* 36(4):361–69. doi: 10.1111/j.1469-8749.1994.tb11858.x.
- Clarkson, Jenny, and Allan E. Herbison. 2016. "Hypothalamic Control of the Male Neonatal Testosterone Surge." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371(1688). doi: 10.1098/rstb.2015.0115.
- Clayton, Janine A., and Francis S. Collins. 2014. "NIH to Balance Sex in Cell and Animal Studies." *Nature* 509(7500):282–83. doi: 10.1038/509282a.
- Connelly, Kara J., Emily A. Larson, Daniel L. Marks, and Robert F. Klein. 2015. "Neonatal Estrogen Exposure Results in Biphasic Age-Dependent Effects on the Skeletal Development of Male Mice." *Endocrinology* 156(1):193–202. doi: 10.1210/en.2014-1324.
- Corbier, P., D. A. Edwards, and J. Roffi. 1992. "The Neonatal Testosterone Surge: A Comparative Study." *Archives of Physiology and Biochemistry* 100(2):127–31. doi: 10.3109/13813459209035274.
- Cox, K. H., and E. F. Rissman. 2011. "Sex Differences in Juvenile Mouse Social Behavior Are Influenced by Sex Chromosomes and Social Context." *Genes, Brain and Behavior* 10(4):465–72. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00688.x.
- Crawley, Jacqueline N. 2012. "Translational Animal Models of Autism and Neurodevelopmental Disorders." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 14(3):293–305. doi: 10.31887/dcns.2012.14.3/jcrawley.
- Cryan, John F., Rita J. Valentino, and Irwin Lucki. 2005. "Assessing Substrates Underlying the Behavioral Effects of Antidepressants Using the Modified Rat Forced Swimming Test." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29(4–5):547–69. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.008.
- D'Audiffret, Alexandre C., Stephanie J. Frisbee, Phoebe A. Stapleton, Adam G. Goodwill, Elsa Isingrini, and Jefferson C. Frisbee. 2010. "Depressive Behavior and Vascular Dysfunction: A Link between Clinical Depression and Vascular Disease?" *Journal of Applied Physiology* 108(5):1041–51.
- Dawson, Geraldine. 2008. "Early Behavioral Intervention, Brain Plasticity, and the Prevention of Autism Spectrum Disorder." *Development and Psychopathology* 20(3):775–803. doi:

10.1017/S0954579408000370.

- Dean, Michelle, Robin Harwood, and Connie Kasari. 2017. "The Art of Camouflage: Gender Differences in the Social Behaviors of Girls and Boys with Autism Spectrum Disorder." *Autism* 21(6):678–89.
- Dean, Shannon L., Jessica F. Knutson, Desiree L. Krebs-Kraft, and Margaret M. McCarthy. 2012. "Prostaglandin E2 Is an Endogenous Modulator of Cerebellar Development and Complex Behavior during a Sensitive Postnatal Period." *European Journal of Neuroscience* 35(8):1218–29. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08032.x.
- Dean, Shannon L., Christopher L. Wright, Jessica F. Hoffman, Meina Wang, Bradley E. Alger, and Margaret M. McCarthy. 2012. "Prostaglandin E2 Stimulates Estradiol Synthesis in the Cerebellum Postnatally with Associated Effects on Purkinje Neuron Dendritic Arbor and Electrophysiological Properties." *Endocrinology* 153(11):5415–27. doi: 10.1210/en.2012-1350.
- Delville, Yvon, Richard H. Melloni, and Craig F. Ferris. 1998. "Behavioral and Neurobiological Consequences of Social Subjugation during Puberty in Golden Hamsters." *Journal of Neuroscience* 18(7):2667–72. doi: 10.1523/jneurosci.18-07-02667.1998.
- Depino, A. M. Amaicha Mara. 2013. "Peripheral and Central Inflammation in Autism Spectrum Disorders." *Molecular and Cellular Neuroscience* 53:69–76. doi: 10.1016/j.mcn.2012.10.003.
- Depino, A. M. Amaicha Mara. 2018. "Perinatal Inflammation and Adult Psychopathology: From Preclinical Models to Humans." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 77:104–14. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.010.
- Depino, A. M. Amaicha Mara, Luciana Lucchina, and Fernando Pitossi. 2011. "Early and Adult Hippocampal TGF- $\beta$ 1 Overexpression Have Opposite Effects on Behavior." *Brain, Behavior, and Immunity* 25(8):1582–91. doi: 10.1016/j.bbi.2011.05.007.
- Depino, Amaicha Mara, and Cornelius Gross. 2007. "Simultaneous Assessment of Autonomic Function and Anxiety-Related Behavior in BALB/c and C57BL/6 Mice." *Behavioural Brain Research*. doi: 10.1016/j.bbr.2006.11.025.
- Desjardins, Claude, J. A. Maruniak, and F. H. Bronson. 1973. "Social Rank in House Mice: Differentiation Revealed by Ultraviolet Visualization of Urinary Marking Patterns." *Science* 182(4115):939–41. doi: 10.1126/science.182.4115.939.
- Dessì-Fulgheri, Francesco, Stefania Porrini, and Francesca Farabollini. 2002. "Effects of Perinatal Exposure to Bisphenol A on Play Behavior of Female and Male Juvenile Rats." *Environmental Health Perspectives* 110(SUPPL. 3):403–7. doi: 10.1289/ehp.110-1241190.
- Doyle, Hillary H., Lori N. Eidson, David M. Sinkiewicz, and Anne Z. Murphy. 2017. "Sex Differences in Microglia Activity within the Periaqueductal Gray of the Rat: A Potential Mechanism Driving the Dimorphic Effects of Morphine." *Journal of Neuroscience* 37(12):3202–14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2906-16.2017.
- Dulawa, Stephanie C., and Rene Hen. 2005. "Recent Advances in Animal Models of Chronic Antidepressant Effects: The Novelty-Induced Hypophagia Test." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29(4–5):771–83. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.017.
- Dutta, Sudipta, Connie J. Mark-Kappeler, Patricia B. Hoyer, and Melissa E. Pepling. 2014. "The Steroid Hormone Environment during Primordial Follicle Formation in Perinatal Mouse Ovaries." *Biology of Reproduction* 91(3):1–12. doi: 10.1095/biolreprod.114.119214.
- Dworzynski, Katharina, Angelica Ronald, Patrick Bolton, and Francesca Happé. 2012. "How



- Different Are Girls and Boys above and below the Diagnostic Threshold for Autism Spectrum Disorders?" *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 51(8):788–97. doi: 10.1016/j.jaac.2012.05.018.
- Editors, The. 2010. "Retraction-Ileal-Lymphoid-Nodular Hyperplasia, Non-Specific Colitis, and Pervasive Developmental Disorder in Children." *The Lancet* 375(9713):445. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60175-4.
- Eisenberg, Leon. 1957. "The Fathers of Autistic Children." *American Journal of Orthopsychiatry* 27(4):715–24. doi: 10.1111/j.1939-0025.1957.tb05539.x.
- Ellenbroek, Bart A., Caren August, and Jiun Youn. 2016. "Does Prenatal Valproate Interact with a Genetic Reduction in the Serotonin Transporter? A Rat Study on Anxiety and Cognition." *Frontiers in Neuroscience* 10(SEP):1–10. doi: 10.3389/fnins.2016.00424.
- Elsabbagh, Mayada. 2020. "Linking Risk Factors and Outcomes in Autism Spectrum Disorder: Is There Evidence for Resilience?" *The BMJ* 368. doi: 10.1136/bmj.l6880.
- Elsabbagh, Mayada, Gauri Divan, Yun Joo Koh, Young Shin Kim, Shuaib Kauchali, Carlos Marcín, Cecilia Montiel-Nava, Vikram Patel, Cristiane S. Paula, Chongying Wang, Mohammad Taghi Yasamy, and Eric Fombonne. 2012. "Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders." *Autism Research* 5(3):160–79. doi: 10.1002/aur.239.
- Erskine, Mary S., Judith M. Stern, and Seymour Levine. 1975. "Effects of Prepubertal Handling on Shock-Induced Fighting and ACTH in Male and Female Rats." *Physiology and Behavior* 14(4):413–20. doi: 10.1016/0031-9384(75)90005-0.
- Estes, Myka L., and A. Kimberley McAllister. 2016. "Maternal Immune Activation: Implications for Neuropsychiatric Disorders." *Science* 353(6301):772–77. doi: 10.1126/science.aag3194.
- Feder, Harvey H. 1967. "Specificity of Testosterone and Estradiol in the Differentiating Neonatal Rat." *The Anatomical Record* 157(1):79–86. doi: 10.1002/ar.1091570112.
- Ferguson, Jennifer N., J. Matthew Aldag, Thomas R. Insel, and Larry J. Young. 2001. "Oxytocin in the Medial Amygdala Is Essential for Social Recognition in the Mouse." *Journal of Neuroscience* 21(20):8278–85. doi: 10.1523/jneurosci.21-20-08278.2001.
- Ferri, Sarah L., Ted Abel, and Edward S. Brodtkin. 2018. "Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: A Review." *Current Psychiatry Reports* 20(2):9. doi: 10.1007/s11920-018-0874-2.
- Filice, Federica, Emanuel Lauber, Karl Jakob Vörckel, Markus Wöhr, and Beat Schwaller. 2018. "17- $\beta$  Estradiol Increases Parvalbumin Levels in Pvalb Heterozygous Mice and Attenuates Behavioral Phenotypes with Relevance to Autism Core Symptoms." *Molecular Autism* 9(1):1–13. doi: 10.1186/s13229-018-0199-3.
- Folstein, S. E., S. L. Santangelo, S. E. Gilman, J. Piven, R. Landa, J. Lainhart, J. Hein, and M. Wzorek. 1999. "Predictors of Cognitive Test Patterns in Autism Families." *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* 40(7):1117–28. doi: 10.1017/S0021963099004461.
- Folstein, Susan E., and Beth Rosen-Sheidley. 2001. "Genetics of Autism: Complex Aetiology for a Heterogeneous Disorder." *Nature Reviews Genetics* 2(12):943–55. doi: 10.1038/35103559.
- Folstein, Susan, and Michael Rutter. 1977. "Infantile Autism: A Genetic Study of 21 Twin Pairs." *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 18(4):297–321. doi: 10.1111/j.1469-

7610.1977.tb00443.x.

- Fombonne, E., P. Bolton, J. Prior, H. Jordan, and M. Rutter. 1997. "A Family Study of Autism: Cognitive Patterns and Levels in Parents and Siblings." *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 38(6):667–83. doi: 10.1111/j.1469-7610.1997.tb01694.x.
- Geier, David A., Janet K. Kern, Paul G. King, Lisa K. Sykes, and Mark R. Geier. 2012. "An Evaluation of the Role and Treatment of Elevated Male Hormones in Autism Spectrum Disorders." *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 72(1):1–17.
- Geschwind, Daniel H., and Pat Levitt. 2007. "Autism Spectrum Disorders: Developmental Disconnection Syndromes." *Current Opinion in Neurobiology* 17(1):103–11. doi: 10.1016/j.conb.2007.01.009.
- Giarelli, Ellen, Lisa D. Wiggins, Catherine E. Rice, Susan E. Levy, Russell S. Kirby, Jennifer Pinto-Martin, and David Mandell. 2010. "Sex Differences in the Evaluation and Diagnosis of Autism Spectrum Disorders among Children." *Disability and Health Journal* 3(2):107–16. doi: 10.1016/j.dhjo.2009.07.001.
- Gioiosa, Laura, Elena Fissore, Giorgia Ghirardelli, Stefano Parmigiani, and Paola Palanza. 2007. "Developmental Exposure to Low-Dose Estrogenic Endocrine Disruptors Alters Sex Differences in Exploration and Emotional Responses in Mice." *Hormones and Behavior* 52(3):307–16. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.05.006.
- Gladue, Brian A., and Lynwood G. Clemens. 1980. "Masculinization Diminished by Disruption of Prenatal Estrogen Biosynthesis in Male Rats." *Physiology & Behavior* 25(4):589–93. doi: 10.1016/0031-9384(80)90126-2.
- Goel, Nirupa, and Tracy L. Bale. 2008. "Organizational and Activational Effects of Testosterone on Masculinization of Female Physiological and Behavioral Stress Responses." *Endocrinology* 149(12):6399–6405. doi: 10.1210/en.2008-0433.
- Gogolla, Nadine, Jocelyn J. LeBlanc, Kathleen B. Quast, Thomas C. Südhof, Michela Fagiolini, and Takao K. Hensch. 2009. "Common Circuit Defect of Excitatory-Inhibitory Balance in Mouse Models of Autism." *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 1(2):172–81. doi: 10.1007/s11689-009-9023-x.
- Gómez, M. L., L. Martínez-Mota, E. Estrada-Camarena, and A. Fernández-Guasti. 2014. "Influence of the Brain Sexual Differentiation Process on Despair and Antidepressant-like Effect of Fluoxetine in the Rat Forced Swim Test." *Neuroscience* 261:11–22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.035.
- Graciarena, M., A. Seiffe, B. Nait-Oumesmar, and A. M. Depino. 2019. "Hypomyelination and Oligodendroglial Alterations in a Mouse Model of Autism Spectrum Disorder." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00517.
- Grandjean, Philippe, and Philip J. Landrigan. 2014. "Neurobehavioural Effects of Developmental Toxicity." *The Lancet Neurology* 13(3):330–38. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70278-3.
- Gziel, Kinga, Agnieszka Potasiewicz, Małgorzata Hołuj, Ewa Litwa, Piotr Popik, and Agnieszka Nikiforuk. 2020. "Valproic Acid Exposure Impairs Ultrasonic Communication in Infant, Adolescent and Adult Rats." *European Neuropsychopharmacology* 41:52–62. doi: 10.1016/j.euroneuro.2020.09.006.
- Haberly, Lewis B. 2001. "Chem. Senses-2001-Haberly-551-76." *Chemical Senses* 26:1–26.
- Hagerman, Randi, Gry Hoem, and Paul Hagerman. 2010. "Fragile X and Autism: Intertwined at the Molecular Level Leading to Targeted Treatments." *Molecular Autism* 1(1):1–14. doi:

10.1186/2040-2392-1-12.

- Hallmayer, Joachim, Sue Cleveland, Andrea Torres, Jennifer Phillips, Brianne Cohen, Tiffany Torigoe, Janet Miller, Angie Fedele, Jack Collins, Karen Smith, Linda Lotspeich, Lisa A. Croen, Sally Ozonoff, Judith K. Grether, and Neil Risch. 2011. "Genetic Heritability." *Arch Gen Psychiatry* 68(11):1095–1102. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.76.Genetic.
- Heim, Christine, and Elisabeth B. Binder. 2012. "Current Research Trends in Early Life Stress and Depression: Review of Human Studies on Sensitive Periods, Gene-Environment Interactions, and Epigenetics." *Experimental Neurology* 233(1):102–11. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.10.032.
- Heredia, Luis, Margarita Torrente, María T. Colomina, and José L. Domingo. 2014. "Assessing Anxiety in C57BL/6J Mice: A Pharmacological Characterization of the Open-Field and Light/Dark Tests." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 69(2):108–14. doi: 10.1016/j.vascn.2013.12.005.
- Hiller, Rachel M., Robyn L. Young, and Nathan Weber. 2014. "Sex Differences in Autism Spectrum Disorder Based on DSM-5 Criteria: Evidence from Clinician and Teacher Reporting." *Journal of Abnormal Child Psychology* 42(8):1381–93. doi: 10.1007/s10802-014-9881-x.
- Hla, Timothy, D. Bishop-Bailey, C. H. Liu, H. J. Schaefer, and O. C. Trifan. 1999. "Cyclooxygenase-1 and -2 Isoenzymes." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31(5):551–57. doi: 10.1016/S1357-2725(98)00152-6.
- Hoffman, Jessica F., Christopher L. Wright, and Margaret M. McCarthy. 2016. "A Critical Period in Purkinje Cell Development Is Mediated by Local Estradiol Synthesis, Disrupted by Inflammation, and Has Enduring Consequences Only for Males." *Journal of Neuroscience* 36(39):10039–49. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1262-16.2016.
- Hofvander, Björn, Richard Delorme, Pauline Chaste, Agneta Nydén, Elisabet Wentz, Ola Ståhlberg, Evelyn Herbrecht, Astrid Stopin, Henrik Anckarsäter, Christopher Gillberg, Maria Råstam, and Marion Leboyer. 2009. "Psychiatric and Psychosocial Problems in Adults with Normal-Intelligence Autism Spectrum Disorders." *BMC Psychiatry* 9:1–9. doi: 10.1186/1471-244X-9-35.
- Hörnberg, Hanna, Enrique Pérez-Garci, Dietmar Schreiner, Laetitia Hatstatt-Burklé, Fulvio Magara, Stephane Baudouin, Alex Matter, Kassoum Nacro, Eline Pecho-Vrieseling, and Peter Scheiffele. 2020. "Rescue of Oxytocin Response and Social Behaviour in a Mouse Model of Autism." *Nature* 584(7820):252–56. doi: 10.1038/s41586-020-2563-7.
- Hotchkiss, A. K., J. S. Ostby, J. G. Vandenbergh, and L. E. Gray. 2003. "An Environmental Antiandrogen, Vinclozolin, Alters the Organization of Play Behavior." *Physiology and Behavior* 79(2):151–56. doi: 10.1016/S0031-9384(03)00093-3.
- 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. 2013. "Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders." *Cell* 155(7):1451–63. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024.
- Hughes, Robert N. 2007. "Sex Does Matter: Comments on the Prevalence of Male-Only Investigations of Drug Effects on Rodent Behaviour." *Behavioural Pharmacology* 18(7):583–89. doi: 10.1097/FBP.0b013e3282eff0e8.
- Hull, Laura, K. V. Petrides, and William Mandy. 2020. "The Female Autism Phenotype and Camouflaging: A Narrative Review." *Review Journal of Autism and Developmental*

- Disorders* 7(4):306–17. doi: 10.1007/s40489-020-00197-9.
- Hutchison, John B., Cordian Beyer, Rosemary E. Hutchison, and Andrew Wozniak. 1995. "Sexual Dimorphism in the Developmental Regulation of Brain Aromatase." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53(1–6):307–13. doi: 10.1016/0960-0760(95)00068-B.
- Hwang, Bogseon, and Carolyn Hughes. 2000. "The Effects of Social Interactive Training on Early Social Communicative Skills of Children with Autism." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 30(4):331–43. doi: 10.1023/A:1005579317085.
- Ingudomnukul, Erin, Simon Baron-Cohen, Sally Wheelwright, and Rebecca Knickmeyer. 2007. "Elevated Rates of Testosterone-Related Disorders in Women with Autism Spectrum Conditions." *Hormones and Behavior* 51(5):597–604. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.02.001.
- Ivanov, Andrei I., and Andrej A. Romanovsky. 2004. "Prostaglandin E2 as a Mediator of Fever: Synthesis and Catabolism." *Frontiers in Bioscience* 9(April):1977–93. doi: 10.2741/1383.
- Jacquemont, Sébastien, Bradley P. Coe, Micha Hersch, Michael H. Duyzend, Niklas Krumm, Sven Bergmann, Jacques S. Beckmann, Jill A. Rosenfeld, and Evan E. Eichler. 2014. "A Higher Mutational Burden in Females Supports a 'Female Protective Model' in Neurodevelopmental Disorders." *American Journal of Human Genetics* 94(3):415–25. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.02.001.
- Jiang, Hai yin, Lian lian Xu, Li Shao, Rong man Xia, Zheng he Yu, Zong xin Ling, Fan Yang, Min Deng, and Bing Ruan. 2016. "Maternal Infection during Pregnancy and Risk of Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Brain, Behavior, and Immunity* 58:165–72. doi: 10.1016/j.bbi.2016.06.005.
- Joel, Daphna, and Margaret M. McCarthy. 2017. "Incorporating Sex As a Biological Variable in Neuropsychiatric Research: Where Are We Now and Where Should We Be?" *Neuropsychopharmacology* 42(2):1–7. doi: 10.1038/npp.2016.79.
- Johnston, Amanda L., and Sandra E. File. 1991. "Sex Differences in Animal Tests of Anxiety." *Physiology and Behavior* 49(2):245–50. doi: 10.1016/0031-9384(91)90039-Q.
- Jónsson, Hákon, Patrick Sulem, Birte Kehr, Snaedis Kristmundsdottir, Florian Zink, Eiríkur Hjartarson, Marteinn T. Hardarson, Kristján E. Hjorleifsson, Hannes P. Eggertsson, Sigurjon Axel Gudjonsson, Lucas D. Ward, Gudny A. Arnadottir, Einar A. Helgason, Hannes Helgason, Arnaldur Gylfason, Adalbjorg Aslaug Jonasdottir, Adalbjorg Aslaug Jonasdottir, Thorunn Rafnar, Mike Frigge, Simon N. Stacey, Olafur Th. Magnusson, Unnur Thorsteinsdottir, Gisli Masson, Augustine Kong, Bjarni V. Halldorsson, Agnar Helgason, Daniel F. Gudbjartsson, and Kari Stefansson. 2017. "Parental Influence on Human Germline de Novo Mutations in 1,548 Trios from Iceland." *Nature* 549(7673):519–22. doi: 10.1038/nature24018.
- Kalueff, Allan V., Adam Michael Stewart, Cai Song, Kent C. Berridge, Ann M. Graybiel, and John C. Fentress. 2016. "Neurobiology of Rodent Self-Grooming and Its Value for Translational Neuroscience." *Nature Reviews Neuroscience* 17(1):45–59. doi: 10.1038/nrn.2015.8.
- Kanner, Leo. 1943. "Library\_Kanner\_1943.Pdf." *Nervous Child* 2:217–50.
- Kaprara, Athina, and Ilpo T. Huhtaniemi. 2018. "The Hypothalamus-Pituitary-Gonad Axis: Tales of Mice and Men." *Metabolism* 86:3–17. doi: 10.1016/J.METABOL.2017.11.018.
- Kataoka, Shunsuke, Kazuhiro Takuma, Yuta Hara, Yuko Maeda, Yukio Ago, and Toshio Matsuda. 2013. "Autism-like Behaviours with Transient Histone Hyperacetylation in Mice Treated Prenatally with Valproic Acid." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 16(1):91–103. doi: 10.1017/S1461145711001714.

- Kawanai, Takuya, Yukio Ago, Ryo Watanabe, Aya Inoue, Atsuki Taruta, Yusuke Onaka, Shigeru Hasebe, Hitoshi Hashimoto, Toshio Matsuda, and Kazuhiro Takuma. 2016. "Prenatal Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Affects Gene Expression of Autism-Related Molecules and Delays Neuronal Maturation." *Neurochemical Research* 41(10):2574–84. doi: 10.1007/s11064-016-1969-y.
- Kazlauskas, Nadia, Marcos Campolongo, Luciana Lucchina, Cecilia Zappala, and Amaicha Mara Depino. 2016. "Postnatal Behavioral and Inflammatory Alterations in Female Pups Prenatally Exposed to Valproic Acid." *Psychoneuroendocrinology* 72:11–21. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.06.001.
- Kazlauskas, Nadia, Araceli Seiffe, Marcos Campolongo, Cecilia Zappala, and Amaicha Mara Depino. 2019. "Sex-Specific Effects of Prenatal Valproic Acid Exposure on Sociability and Neuroinflammation: Relevance for Susceptibility and Resilience in Autism." *Psychoneuroendocrinology* 110(September):104441. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.104441.
- Kim, Young Shin, Bennett L. Leventhal, Yun Joo Koh, Eric Fombonne, Eugene Laska, Eun Chung Lim, Keun Ah Cheon, Soo Jeong Kim, Young Key Kim, Hyun Kyung Lee, Dong Ho Song, and Roy Richard Grinker. 2011. "Prevalence of Autism Spectrum Disorders in a Total Population Sample." *American Journal of Psychiatry* 168(9):904–12. doi: 10.1176/appi.ajp.2011.10101532.
- Kimura, Takeji, and Yasuko Hagiwara. 1985. "Regulation of Urine Marking in Male and Female Mice: Effects of Sex Steroids." *Hormones and Behavior* 19(1):64–70. doi: 10.1016/0018-506X(85)90006-6.
- Kirsten, Thiago B., Gabriela P. Chaves-Kirsten, Lucas M. Chaible, Ana C. Silva, Daniel O. Martins, Luiz R. G. Britto, Maria L. Z. Dagli, Andrea S. Torráo, João Palermo-Neto, and Maria M. Bernardi. 2012. "Hypoactivity of the Central Dopaminergic System and Autistic-like Behavior Induced by a Single Early Prenatal Exposure to Lipopolysaccharide." *Journal of Neuroscience Research* 90(10):1903–12. doi: 10.1002/jnr.23089.
- De Kloet, E. Ron, Marian Joëls, and Florian Holsboer. 2005. "Stress and the Brain: From Adaptation to Disease." *Nature Reviews Neuroscience* 6(6):463–75. doi: 10.1038/nrn1683.
- Kokras, Nikolaos, Christina Dalla, Antonios C. Sideris, Artemis Dendi, Hudu G. Mikail, Katerina Antoniou, and Zeta Papadopoulou-Daifoti. 2012. "Behavioral Sexual Dimorphism in Models of Anxiety and Depression Due to Changes in HPA Axis Activity." *Neuropharmacology* 62(1):436–45. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.025.
- Kondo, Mari A., Laura J. Gray, Gregory J. Pelka, Sook Kwan Leang, John Christodoulou, Patrick P. L. Tam, and Anthony J. Hannan. 2016. "Affective Dysfunction in a Mouse Model of Rett Syndrome: Therapeutic Effects of Environmental Stimulation and Physical Activity." *Developmental Neurobiology* 76(2):209–24. doi: 10.1002/dneu.22308.
- Kong, Augustine, Michael L. Frigge, Gisli Masson, Soren Besenbacher, Patrick Sulem, Gisli Magnusson, Sigurjon A. Gudjonsson, Asgeir Sigurdsson, Adalbjorg Aslaug Jonasdottir, Adalbjorg Aslaug Jonasdottir, Wendy S. W. Wong, Gunnar Sigurdsson, G. Bragi Walters, Stacy Steinberg, Hannes Helgason, Gudmar Thorleifsson, Daniel F. Gudbjartsson, Agnar Helgason, Olafur Th Magnusson, Unnur Thorsteinsdottir, and Kari Stefansson. 2012. "Rate of de Novo Mutations and the Importance of Father-s Age to Disease Risk." *Nature* 488(7412):471–75. doi: 10.1038/nature11396.
- van Kooten, Imke A. J., Patrick R. Hof, Herman van Engeland, Harry W. M. Steinbusch, Paul H. Patterson, and Christoph Schmitz. 2005. "Autism: Neuropathology, Alterations of the

- GABAergic System, and Animal Models." *International Review of Neurobiology* 71(05):1–26. doi: 10.1016/S0074-7742(05)71001-1.
- Kreiser, Nicole L., and Susan W. White. 2014. "ASD in Females: Are We Overstating the Gender Difference in Diagnosis?" *Clinical Child and Family Psychology Review* 17(1):67–84. doi: 10.1007/s10567-013-0148-9.
- Kreutzberg, Georg W. 1996. "Microglia: A Sensor for Pathological Events in the CNS." *Trends in Neurosciences* 19(8):312–18. doi: 10.1016/0166-2236(96)10049-7.
- Krishnan, Sudha, Karlie A. Intlekofer, Leah K. Aggison, and Sandra L. Petersen. 2009. "Central Role of TRAF-Interacting Protein in a New Model of Brain Sexual Differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(39):16692–97. doi: 10.1073/pnas.0906293106.
- Kuznetsova, Alexandra, Per B. Brockhoff, and Rune H. B. Christensen. 2017. "{lmerTest} Package: Tests in Linear Mixed Effects Models." *Journal of Statistical Software* 82(13):1–26. doi: 10.18637/jss.v082.i13.
- Lai, Meng Chuan, Michael V. Lombardo, Bonnie Auyeung, Bhismadev Chakrabarti, and Simon Baron-Cohen. 2015. "Sex/Gender Differences and Autism: Setting the Scene for Future Research." *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 54(1):11–24. doi: 10.1016/j.jaac.2014.10.003.
- Lai, Meng Chuan, Michael V. Lombardo, Greg Pasco, Amber N. V. Ruigrok, Sally J. Wheelwright, Susan A. Sadek, Bhismadev Chakrabarti, and Simon Baron-Cohen. 2011. "A Behavioral Comparison of Male and Female Adults with High Functioning Autism Spectrum Conditions." *PLoS ONE* 6(6). doi: 10.1371/journal.pone.0020835.
- Lammert, Catherine R., and John R. Lukens. 2019. "Modeling Autism-Related Disorders in Mice with Maternal Immune Activation (MIA)." *Methods in Molecular Biology* 1960:227–36. doi: 10.1007/978-1-4939-9167-9\_20.
- Lange, Shannon, Jürgen Rehm, Evdokia Anagnostou, and Svetlana Popova. 2018. "Prevalence of Externalizing Disorders and Autism Spectrum Disorders among Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis." *Biochemistry and Cell Biology* 96(2):241–51. doi: 10.1139/bcb-2017-0014.
- Lebrun, Yvan. 1980. "H. Lane, The Wild Boy of Aveyron. London: Allen & Unwin, 1977. Pp. 351 - S. Curtiss, Genie: A Psycholinguistic Study of a Modern-Day 'Wild Child'. New York: Academic Press, 1977. Pp. xvi + 288 - C. Maclean, The Wolf Children. London: Allen Lane, 1978." *Journal of Child Language* 7(1):227–31. doi: 10.1017/S0305000900007169.
- Lee, Brian K., Cecilia Magnusson, Renee M. Gardner, Åsa Blomström, Craig J. Newschaffer, Igor Burstyn, Håkan Karlsson, and Christina Dalman. 2015. "Maternal Hospitalization with Infection during Pregnancy and Risk of Autism Spectrum Disorders." *Brain, Behavior, and Immunity* 44:100–105. doi: 10.1016/j.bbi.2014.09.001.
- Lenth, Russell V. 2021. "Emmeans: Estimated Marginal Means, Aka Least-Squares Means."
- Lenz, Kathryn M., and Margaret M. McCarthy. 2015. "A Starring Role for Microglia in Brain Sex Differences." *Neuroscientist* 21(3):306–21. doi: 10.1177/1073858414536468.
- Lenz, Kathryn M., Bridget M. Nugent, Rachana Haliyur, and Margaret M. McCarthy. 2013. "Microglia Are Essential to Masculinization of Brain and Behavior." *Journal of Neuroscience* 33(7):2761–72. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1268-12.2013.
- Lenz, Kathryn M., Lindsay A. Pickett, Christopher L. Wright, Katherine T. Davis, Aarohi Joshi, and Margaret M. McCarthy. 2018. "Mast Cells in the Developing Brain Determine Adult

- Sexual Behavior." *Journal of Neuroscience* 38(37):8044–59. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1176-18.2018.
- Lenz, Kathryn M., Lindsay A. Pickett, Christopher L. Wright, Anabel Galan, and Margaret M. McCarthy. 2019. "Prenatal Allergen Exposure Perturbs Sexual Differentiation and Programs Lifelong Changes in Adult Social and Sexual Behavior." *Scientific Reports* 9(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-019-41258-2.
- Levine, Seymour. 1956. "A Further Study of Infantile Handling and Adult Avoidance Learning." *Journal of Personality* 25(1):70–80. doi: 10.1111/j.1467-6494.1956.tb01289.x.
- Levine, Seymour, Jacques A. Chevalier, and Sheldon J. Korchin. 1956. "The Effects of Early Handling and Shock on Later Avoidance Behavior." *Journal of Personality* 24:475–93.
- Levine, Seymour, Gary C. Haltmeyer, George G. Karas, and Victor H. Denenberg. 1967. "Physiological and Behavioral Effects of Infantile Stimulation." *Physiology and Behavior* 2(1):55–59. doi: 10.1016/0031-9384(67)90011-X.
- Litaudon, P., C. Amat, B. Bertrand, M. Vigouroux, and N. Buonviso. 2003. "Piriform Cortex Functional Heterogeneity Revealed by Cellular Responses to Odours." *European Journal of Neuroscience* 17(11):2457–61. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02654.x.
- Livingston, Lucy Anne, and Francesca Happé. 2017. "Conceptualising Compensation in Neurodevelopmental Disorders: Reflections from Autism Spectrum Disorder." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 80:729–42. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.06.005.
- Loomes, Rachel, Laura Hull, and William Polmear Locke Mandy. 2017. "What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 56(6):466–74. doi: 10.1016/j.jaac.2017.03.013.
- Lucchina, Luciana, Valeria Carola, Fernando Pitossi, and Amaicha Mara A. M. Depino. 2010. "Evaluating the Interaction between Early Postnatal Inflammation and Maternal Care in the Programming of Adult Anxiety and Depression-Related Behaviors." *Behavioural Brain Research* 213(1):56–65. doi: 10.1016/j.bbr.2010.04.032.
- Lucchina, Luciana, and Amaicha Mara Depino. 2014. "Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism." *Autism Research* 7(2):273–89. doi: 10.1002/aur.1338.
- Luchetti, Alessandra, Diego Oddi, Valentina Lampis, Eleonora Centofante, Armando Felsani, Marco Battaglia, and Francesca R. D'Amato. 2015. "Early Handling and Repeated Cross-Fostering Have Opposite Effect on Mouse Emotionality." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9(APR):1–11. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00093.
- Lupien, Sonia J., Bruce S. McEwen, Megan R. Gunnar, and Christine Heim. 2009. "Effects of Stress throughout the Lifespan on the Brain, Behaviour and Cognition." *Nature Reviews Neuroscience* 10(6):434–45. doi: 10.1038/nrn2639.
- Macrì, Simone, Filippo Biamonte, Emilia Romano, Ramona Marino, Flavio Keller, and Giovanni Laviola. 2010. "Perseverative Responding and Neuroanatomical Alterations in Adult Heterozygous Reeler Mice Are Mitigated by Neonatal Estrogen Administration." *Psychoneuroendocrinology* 35(9):1374–87. doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.03.012.
- Madrugá, Clarice, Léder L. Xavier, Matilde Achaval, Gilberto L. Sanvitto, and Aldo B. Lucion. 2006. "Early Handling, but Not Maternal Separation, Decreases Emotional Responses in Two Paradigms of Fear without Changes in Mesolimbic Dopamine." *Behavioural Brain Research* 166(2):241–46. doi: 10.1016/j.bbr.2005.08.005.

- Magnuson, Katherine M., and John N. Constantino. 2011. "Characterization of Depression in Children with Autism Spectrum Disorders." *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* 32(4):332–40. doi: 10.1097/DBP.0b013e318213f56c.
- Makinodan, Manabu, Kenneth M. Rosen, Susumu Ito, and Gabriel Corfas. 2012. "A Critical Period for Social Experience-Dependent Oligodendrocyte Maturation and Myelination." *Science* 337(6100):1357–60. doi: 10.1126/science.1220845.
- Malkova, Natalia V., Collin Z. Yu, Elaine Y. Hsiao, Marlyn J. Moore, and Paul H. Patterson. 2012. "Maternal Immune Activation Yields Offspring Displaying Mouse Versions of the Three Core Symptoms of Autism." *Brain, Behavior, and Immunity* 26(4):607–16. doi: 10.1016/j.bbi.2012.01.011.
- Markram, Kamila, Tania Rinaldi, Deborah La Mendola, Carmen Sandi, and Henry Markram. 2008. "Abnormal Fear Conditioning and Amygdala Processing in an Animal Model of Autism." *Neuropsychopharmacology* 33(4):901–12. doi: 10.1038/sj.npp.1301453.
- Márquez, C., G. L. Poirier, M. I. Cordero, M. H. Larsen, A. Groner, J. Marquis, P. J. Magistretti, D. Trono, and C. Sandi. 2013. "Peripuberty Stress Leads to Abnormal Aggression, Altered Amygdala and Orbitofrontal Reactivity and Increased Prefrontal MAOA Gene Expression." *Translational Psychiatry* 3(July 2012). doi: 10.1038/tp.2012.144.
- Masur, Jandira, Maria Teresa Schutz, and Roseli Boerngen. 1980. "Gender Differences in Open-field Behavior as a Function of Age." *Developmental Psychobiology* 13(2):107–10. doi: 10.1002/dev.420130202.
- Matson, Johnny L., and Alison M. Kozlowski. 2011. "The Increasing Prevalence of Autism Spectrum Disorders." *Research in Autism Spectrum Disorders* 5(1):418–25. doi: 10.1016/j.rasd.2010.06.004.
- Matsumoto, Akira, and Yasumasa Arai. 1986. "Male-Female Difference in Synaptic Organization of the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus in the Rat." *Neuroendocrinology* 42(3):232–36. doi: 10.1159/000124445.
- McCarthy, M. M., G. J. de Vries, and N. G. Forger. 2009. "Sexual Differentiation of the Brain: Mode, Mechanisms, and Meaning." Pp. 1707–46 in *Hormones, Brain and Behavior*. Elsevier.
- McCarthy, Margaret M. 2008. "Estradiol and the Developing Brain." *Physiological Reviews* 88(1):91–134. doi: 10.1152/physrev.00010.2007.
- McCarthy, Margaret M., and Christopher L. Wright. 2017. "Convergence of Sex Differences and the Neuroimmune System in Autism Spectrum Disorder." *Biological Psychiatry* 81(5):402–10. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.10.004.
- Meaney, Michael J., and Jane Stewart. 1981. "Neonatal Androgens Influence the Social Play of Prepubescent Rats." *Hormones and Behavior* 15(2):197–213. doi: 10.1016/0018-506X(81)90028-3.
- Meaney, Michael J., Jane Stewart, Paule Poulin, and Bruce S. McEwen. 1983. "Sexual Differentiation of Social Play in Rat Pups Is Mediated by the Neonatal Androgen-Receptor System." *Neuroendocrinology* 37(2):85–90. doi: doi.org/10.1159/000123524.
- Meerlo, Peter, K. M. Horvath, G. M. Nagy, B. Bohus, and J. M. Koolhaas. 1999. "The Influence of Postnatal Handling on Adult Neuroendocrine and Behavioural Stress Reactivity." *Journal of Neuroendocrinology* 11(12):925–33. doi: 10.1046/j.1365-2826.1999.00409.x.
- Mertens, Sinja, Miriam A. Vogt, Peter Gass, Rupert Palme, Bernhard Hiebl, and Sabine Chourbaji. 2019. "Effect of Three Different Forms of Handling on the Variation of



- Aggression-Associated Parameters in Individually and Group-Housed Male C57BL/6NCrl Mice." *PLoS ONE* 14(4):1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0215367.
- Mineur, Yann S., Linh X. Huynh, and Wim E. Crusio. 2006. "Social Behavior Deficits in the Fmr1 Mutant Mouse." *Behavioural Brain Research* 168(1):172–75. doi: 10.1016/j.bbr.2005.11.004.
- Misra, Vivek. 2014. "The Social Brain Network and Autism." *Annals of Neurosciences* 21(2):69–73. doi: 10.5214/ans.0972.7531.210208.
- Mong, J. A., J. L. Nuñez, and M. M. McCarthy. 2002. "GABA Mediates Steroid-Induced Astrocyte Differentiation in the Neonatal Rat Hypothalamus." *Journal of Neuroendocrinology* 14(1):45–55. doi: 10.1046/j.1365-2826.2002.00737.x.
- Moore, Celia L. 1986a. "A Hormonal Basis for Sex Differences in the Self-Grooming of Rats." *Hormones and Behavior* 20(2):155–65. doi: 10.1016/0018-506X(86)90014-0.
- Moore, Celia L. 1986b. "Sex Differences in Self-Grooming of Rats: Effects of Gonadal Hormones and Context." *Physiology and Behavior* 36(3):451–55. doi: 10.1016/0031-9384(86)90314-8.
- Murakami, Makoto, Yoshihito Nakatani, Toshihiro Tanioka, and Ichiro Kudo. 2002. "Prostaglandin E Synthase." *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68–69:383–99. doi: 10.1016/S0090-6980(02)00043-6.
- Naftolin, F., K. J. Ryan, and Z. Petro. 1972. "Aromatization of Androstenedione by the Anterior Hypothalamus of Adult Male and Female Rats." *Endocrinology* 90(1):295–98. doi: 10.1210/endo-90-1-295.
- Nagatani, T., T. Yamamoto, T. Sugihara, and S. Ueki. 1987. "The Effect of Agonists at the GABA-Benzodiazepine Receptor Complex on the Duration of Immobility of Mice in the Forced Swimming Test." *European Journal of Pharmacology* 142:17–22.
- Nanson, J. L. 1992. "Autism in Fetal Alcohol Syndrome: A Report of Six Cases." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 16(3):558–65. doi: 10.1111/j.1530-0277.1992.tb01417.x.
- Naviaux, J. C., M. A. Schuchbauer, K. Li, L. Wang, V. B. Risbrough, S. B. Powell, and R. K. Naviaux. 2014. "Reversal of Autism-like Behaviors and Metabolism in Adult Mice with Single-Dose Antipurinergic Therapy." *Translational Psychiatry* 4(November 2013). doi: 10.1038/tp.2014.33.
- Nelson, Lars H., and Kathryn M. Lenz. 2017. "The Immune System as a Novel Regulator of Sex Differences in Brain and Behavioral Development." *Journal of Neuroscience Research* 95(1–2):447–61. doi: 10.1002/jnr.23821.
- Nguyen, Thien A., Kunwei Wu, Saurabh Pandey, Alexander W. Lehr, Yan Li, Michael A. Bemben, John D. Badger, Julie L. Lauzon, Tongguang Wang, Kareem A. Zaghloul, Audrey Thurm, Mahim Jain, Wei Lu, and Katherine W. Roche. 2020. "A Cluster of Autism-Associated Variants on X-Linked NLGN4X Functionally Resemble NLGN4Y." *Neuron* 106(5):759–768.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2020.03.008.
- Nicolini, Chiara, and Margaret Fahnestock. 2018. "The Valproic Acid-Induced Rodent Model of Autism." *Experimental Neurology* 299:217–27. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.04.017.
- Nikodemova, Maria, Rebecca S. Kimyon, Ishani De, Alissa L. Small, Lara S. Collier, and Jyoti J. Watters. 2015. "Microglial Numbers Attain Adult Levels after Undergoing a Rapid Decrease in Cell Number in the Third Postnatal Week." *Journal of Neuroimmunology* 278:280–88. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.11.018.

- Olesen, Kristin M., Heather M. Jessen, Catherine J. Auger, and Anthony P. Auger. 2005. "Dopaminergic Activation of Estrogen Receptors in Neonatal Brain Alters Progesterone Receptor Expression and Juvenile Social Play Behavior." *Endocrinology* 146(9):3705–12. doi: 10.1210/en.2005-0498.
- Olusakin, Jimmy, Imane Moutkine, Sylvie Dumas, Evgeni Ponimaskin, Eleni Paizanis, Mariano Soiza-Reilly, and Patricia Gaspar. 2020. "Implication of 5-HT7 Receptor in Prefrontal Circuit Assembly and Detrimental Emotional Effects of SSRIs during Development." *Neuropsychopharmacology* 45(13):2267–77. doi: 10.1038/s41386-020-0775-z.
- Ornoy, Asher. 2009. "Valproic Acid in Pregnancy: How Much Are We Endangering the Embryo and Fetus?" *Reproductive Toxicology* 28(1):1–10. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.02.014.
- Owens, David F., and Arnold R. Kriegstein. 2002. "Is There More to GABA than Synaptic Inhibition?" *Nature Reviews Neuroscience* 3(9):715–27. doi: 10.1038/nrn919.
- Palanza, Paola. 2001. "Animal Models of Anxiety and Depression: How Are Females Different?" *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25(3):219–33. doi: 10.1016/S0149-7634(01)00010-0.
- Papaioannou, A., K. Gerozissis, A. Prokopiou, S. Bolaris, and F. Stylianopoulou. 2002. "Sex Differences in the Effects of Neonatal Handling on the Animal's Response to Stress and the Vulnerability for Depressive Behaviour." *Behavioural Brain Research* 129(1–2):131–39. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00334-5.
- Peça, João, Cátia Feliciano, Jonathan T. Ting, Wenting Wang, Michael F. Wells, Talaighair N. Venkatraman, Christopher D. Lascola, Zhanyan Fu, and Guoping Feng. 2011. "Shank3 Mutant Mice Display Autistic-like Behaviours and Striatal Dysfunction." *Nature* 472(7344):437–42. doi: 10.1038/nature09965.
- Persico, Antonio M., and Thomas Bourgeron. 2006. "Searching for Ways out of the Autism Maze: Genetic, Epigenetic and Environmental Clues." *Trends in Neurosciences* 29(7):349–58. doi: 10.1016/j.tins.2006.05.010.
- Phiel, Christopher J., Fang Zhang, Eric Y. Huang, Matthew G. Guenther, Mitchell A. Lazar, and Peter S. Klein. 2001. "Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen." *Journal of Biological Chemistry* 276(39):36734–41. doi: 10.1074/jbc.M101287200.
- Philip, Ruth C. M., Maria R. Dauvermann, Heather C. Whalley, Katie Baynham, Stephen M. Lawrie, and Andrew C. Stanfield. 2012. "A Systematic Review and Meta-Analysis of the fMRI Investigation of Autism Spectrum Disorders." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36(2):901–42. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.10.008.
- Phoenix, CHARLES H., ROBERT W. GOY, ARNOLD A. GERALD, and WILLIAM C. YOUNG. 1959. "ORGANIZING ACTION OF PRENATALLY ADMINISTERED TESTOSTERONE PROPIONATE ON THE TISSUES MEDIATING MATING BEHAVIOR IN THE FEMALE GUINEA PIG 1." *Endocrinology* 65(3):369–82. doi: 10.1210/endo-65-3-369.
- Pickles, A., E. Starr, P. Bolton, S. Kazak, K. Papanikolaou, A. Bailey, R. Goodman, and M. Rutter. 2000. "Variable Expression of the Autism Broader Phenotype: Findings from Extended Pedigrees." *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* 41(4):491–502. doi: 10.1017/S0021963099005557.
- Piven, J., G. A. Chase, R. Landa, M. Wzorek, J. Gayle, D. Cloud, and S. Folstein. 1991. "Psychiatric Disorders in the Parents of Autistic Individuals." *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 30(3):471–78. doi: 10.1097/00004583-199105000-00019.

- Pizzarelli, Rocco, and Enrico Cherubini. 2011. "Alterations of GABAergic Signaling in Autism Spectrum Disorders." *Neural Plasticity* 2011. doi: 10.1155/2011/297153.
- Pollitzer, Elizabeth. 2013. "Biology: Cell Sex Matters." *Nature* 500(7460):23–24. doi: 10.1038/500023a.
- Ponzi, Davide, Laura Gioiosa, Stefano Parmigiani, and Paola Palanza. 2020. "Effects of Prenatal Exposure to a Low-Dose of Bisphenol a on Sex Differences in Emotional Behavior and Central Alpha2-Adrenergic Receptor Binding." *International Journal of Molecular Sciences* 21(9). doi: 10.3390/ijms21093269.
- Porsolt, Roger D., Anne Bertin, and Maurice Jalfre. 1977. "Behavioral Despair in Mice: A Primary Screening Test for Antidepressants." *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 229(2):327–36.
- Porsolt, Roger D., M. Le Pichon, and M Jalfre. 1977. "Depression: A New Animal Model Sensitive to Antidepressant Treatments." *Nature* 266(5604):730–32. doi: 10.1038/266730a0.
- Porsolt, Roger D., M. Le Pichon, and Maurice Jalfre. 1977. "Depression : A New Animal Model Sensitive to Antidepressant Treatments." *Nature*.
- Posserud, M., Astri J. Lundervold, Stein Atle Lie, and Christopher Gillberg. 2010. "The Prevalence of Autism Spectrum Disorders: Impact of Diagnostic Instrument and Non-Response Bias." *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology* 45(3):319–27. doi: 10.1007/s00127-009-0087-4.
- Prendergast, Brian J., Kenneth G. Onishi, and Irving Zucker. 2014. "Female Mice Liberated for Inclusion in Neuroscience and Biomedical Research." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 40:1–5. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.01.001.
- Quadagno, D. M., J. Shryne, C. Anderson, and R. A. Gorski. 1972. "Influence of Gonadal Hormones on Social, Sexual, Emergence, and Open Field Behaviour in the Rat (*Rattus Norvegicus*)." *Animal Behaviour* 20(4):732–40. doi: 10.1016/S0003-3472(72)80145-3.
- R Core Team. 2021. "R: A Language and Environment for Statistical Computing."
- Raineki, Charlis, Aldo B. Lucion, and Joanne Weinberg. 2014. "Neonatal Handling: An Overview of the Positive and Negative Effects." *Developmental Psychobiology* 56(8):1613–25. doi: 10.1002/dev.21241.
- Rhees, Reuben W., James E. Shryne, and Roger A. Gorski. 1990. "Onset of the Hormone-sensitive Perinatal Period for Sexual Differentiation of the Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area in Female Rats." *Journal of Neurobiology* 21(5):781–86. doi: 10.1002/neu.480210511.
- Rice, Catherine. 2006. "Prevalence of Autism Spectrum Disorders --- Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006." Retrieved March 8, 2022 (<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5810a1.htm>).
- Robinson, Elise B., Paul Lichtenstein, Henrik Anckarsäter, Francesca Happé, and Angelica Ronald. 2013. "Examining and Interpreting the Female Protective Effect against Autistic Behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(13):5258–62. doi: 10.1073/pnas.1211070110.
- Rodier, Patricia M., Jennifer L. Ingram, Barbara Tisdale, and Victoria J. Croog. 1997. "Linking Etiologies in Humans and Animal Models: Studies of Autism." *Reproductive Toxicology* 11(2–3):417–22. doi: 10.1016/S0890-6238(97)80001-U.
- Rosseel, Yves. 2012. "{lavaan}: An {R} Package for Structural Equation Modeling." *Journal of*

- Rouzer, Carol A., and Lawrence J. Marnett. 2009. "Cyclooxygenases: Structural and Functional Insights." *Journal of Lipid Research* 50(SUPPL.):S29–34. doi: 10.1194/jlr.R800042-JLR200.
- De Rubeis, Silvia, Xin He, Arthur P. Goldberg, Christopher S. Poultney, Kaitlin Samocha, A. Ercument Cicek, Yan Kou, Li Liu, Menachem Fromer, Susan Walker, Tarjinder Singh, Lambertus Klei, Jack Kosmicki, Shih-Chen Fu, Branko Aleksic, Monica Biscaldi, Patrick F. Bolton, Jessica M. Brownfeld, Jinlu Cai, Nicholas G. Campbell, Angel Carracedo, Maria H. Chahrouh, Andreas G. Chiocchetti, Hilary Coon, Emily L. Crawford, Lucy Crooks, Sarah R. Curran, Geraldine Dawson, Eftichia Duketis, Bridget A. Fernandez, Louise Gallagher, Evan Geller, Stephen J. Guter, R. Sean Hill, Iuliana Ionita-Laza, Patricia Jimenez Gonzalez, Helena Kilpinen, Sabine M. Klauck, Alexander Kolevzon, Irene Lee, Jing Lei, Terho Lehtimäki, Chiao-Feng Lin, Avi Ma'ayan, Christian R. Marshall, Alison L. McInnes, Benjamin Neale, Michael J. Owen, Norio Ozaki, Mara Parellada, Jeremy R. Parr, Shaun Purcell, Kaija Puura, Deepthi Rajagopalan, Karola Rehnström, Abraham Reichenberg, Aniko Sabo, Michael Sachse, Stephan J. Sanders, Chad Schafer, Martin Schulte-Rüther, David Skuse, Christine Stevens, Peter Szatmari, Kristiina Tammimies, Otto Valladares, Annette Voran, Li-San Wang, Lauren A. Weiss, A. Jeremy Willsey, Timothy W. Yu, Ryan K. C. Yuen, Edwin H. Cook, Christine M. Freitag, Michael Gill, Christina M. Hultman, Thomas Lehner, Aarno Palotie, Gerard D. Schellenberg, Pamela Sklar, Matthew W. State, James S. Sutcliffe, Christopher A. Walsh, Stephen W. Scherer, Michael E. Zwick, Jeffrey C. Barrett, David J. Cutler, Kathryn Roeder, Bernie Devlin, Mark J. Daly, and Joseph D. Buxbaum. 2014. "Synaptic, Transcriptional and Chromatin Genes Disrupted in Autism." *Nature* 515(7526):209–15. doi: 10.1038/nature13772.
- Rubenstein, J. L. R., and M. M. Merzenich. 2003. "Model of Autism: Increased Ratio of Excitation/Inhibition in Key Neural Systems." *Genes, Brain and Behavior* 2(5):255–67. doi: 10.1034/j.1601-183X.2003.00037.x.
- Rylaarsdam, Lauren, and Alicia Guemez-Gamboa. 2019. "Genetic Causes and Modifiers of Autism Spectrum Disorder." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13(August):1–15. doi: 10.3389/fncel.2019.00385.
- Sachser, Norbert, Tobias D. Zimmermann, Michael B. Hennessy, and Sylvia Kaiser. 2020. "Sensitive Phases in the Development of Rodent Social Behavior." *Current Opinion in Behavioral Sciences* 36:63–70. doi: 10.1016/j.cobeha.2020.07.014.
- Samuels, Benjamin Adam, and René Hen. 2011. "Novelty-Suppressed Feeding in the Mouse." *Neuromethods* 63:107–21. doi: 10.1007/978-1-61779-313-4\_7.
- Sandi, Carmen, and József Haller. 2015. "Stress and the Social Brain: Behavioural Effects and Neurobiological Mechanisms." *Nature Reviews Neuroscience* 16(5):290–304. doi: 10.1038/nrn3918.
- Sandin, Sven, Paul Lichtenstein, Ralf Kuja-Halkola, Henrik Larsson, Christina M. Hultman, and Abraham Reichenberg. 2014. "The Familial Risk of Autism." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 311(17):1770–77. doi: 10.1001/jama.2014.4144.
- Sarkey, Sara, Iñigo Azcoitia, Luis Miguel Garcia-Segura, Daniel Garcia-Ovejero, and Lydia L. DonCarlos. 2008. "Classical Androgen Receptors in Non-Classical Sites in the Brain." *Hormones and Behavior* 53(5):753–64. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.02.015.
- Sato, Takashi, Takahiro Matsumoto, Hirotaka Kawano, Tomoyuki Watanabe, Yoshikatsu Uematsu, Keisuke Sekine, Toru Fukuda, Ken Ichi Aihara, Andrée Krust, Takashi Yamada, Yuko Nakamichi, Yoko Yamamoto, Takashi Nakamura, Kimihiro Yoshimura, Tatsuya Yoshizawa, Daniel Metzger, Pierre Chambon, and Shigeaki Kato. 2004. "Brain

- Masculinization Requires Androgen Receptor Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(6):1673–78. doi: 10.1073/pnas.0305303101.
- Schaafsma, Sara M., and Donald W. Pfaff. 2014. "Etiologies Underlying Sex Differences in Autism Spectrum Disorders." *Frontiers in Neuroendocrinology* 35(3):255–71. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.03.006.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak, and Albert Cardona. 2012. "Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis." *Nature Methods* 9(7):676–82. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schneider, Tomasz, and Ryszard Przewłocki. 2005. "Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid : Animal Model of Autism." 80–89. doi: 10.1038/sj.npp.1300518.
- Schwarz, Jaclyn M., and Staci D. Bilbo. 2012. "Sex, Glia, and Development: Interactions in Health and Disease." *Hormones and Behavior* 62(3):243–53. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.018.
- Schwarz, Jaclyn M., and Margaret M. McCarthy. 2008. "Cellular Mechanisms of Estradiol-Mediated Masculinization of the Brain." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 109(3–5):300–306. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.03.012.
- Seiffe, Araceli, Mauro Federico Ramirez, Claudio Darío Barrios, María Milagros Albarrán, and Amaicha Mara Depino. 2021. "Early Estradiol Exposure Masculinizes Disease-Relevant Behaviors in Female Mice." *European Journal of Neuroscience* (January):1–18. doi: 10.1111/ejn.15130.
- Seiffe, Araceli, Mauro Federico Ramírez, Lucas Sempé, and Amaicha Mara Depino. 2022. "Juvenile Handling Rescues Autism - Related Effects of Prenatal Exposure to Valproic Acid." *Scientific Reports* 1–12. doi: 10.1038/s41598-022-11269-7.
- Semple, Bridgette D., Klas Blomgren, Kayleen Gimlin, Donna M. Ferriero, and Linda J. Noble-Haeusslein. 2013. "Brain Development in Rodents and Humans: Identifying Benchmarks of Maturation and Vulnerability to Injury across Species." *Progress in Neurobiology* 106–107:1–16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001.
- Shepherd, Janet E. 1994. *Women and Health Research: Ethical and Legal Issues of Including Women in Clinical Studies*. Vol. 272.
- Shi, Limin, S. Hossein Fatemi, Robert W. Sidwell, and Paul H. Patterson. 2003. "Maternal Influenza Infection Causes Marked Behavioral and Pharmacological Changes in the Offspring." *Journal of Neuroscience* 23(1):297–302. doi: 10.1523/jneurosci.23-01-00297.2003.
- Silverman, Jill L., Seda S. Tolu, Charlotte L. Barkan, and Jacqueline N. Crawley. 2010. "Repetitive Self-Grooming Behavior in the BTBR Mouse Model of Autism Is Blocked by the MGLuR5 Antagonist MPEP." *Neuropsychopharmacology* 35(4):976–89. doi: 10.1038/npp.2009.201.
- Silverman, Jill L., Mu Yang, Catherine Lord, and Jacqueline N. Crawley. 2010. "Behavioural Phenotyping Assays for Mouse Models of Autism." *Nature Reviews Neuroscience* 11(7):490–502. doi: 10.1038/nrn2851.
- Simerly, R. B., M. C. Zee, J. W. Pendleton, D. B. Lubahn, and K. S. Korach. 1997. "Estrogen Receptor-Dependent Sexual Differentiation of Dopaminergic Neurons in the Preoptic

- Region of the Mouse." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25):14077–82. doi: 10.1073/pnas.94.25.14077.
- Skellern, Catherine, Michael McDowell, and Philip Schluter. 2005. "Diagnosis of Autistic Spectrum Disorders in Queensland: Variations in Practice." *Journal of Paediatrics and Child Health* 41(8):413–18. doi: 10.1111/j.1440-1754.2005.00667.x.
- Smith, Stephen E. P., Jennifer Li, Krassimira Garbett, Karoly Mirnics, and Paul H. Patterson. 2007. "Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6." *Journal of Neuroscience* 27(40):10695–702. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007.
- Solomon, Marjorie, Meghan Miller, Sandra L. Taylor, Stephen P. Hinshaw, and Cameron S. Carter. 2012. "Autism Symptoms and Internalizing Psychopathology in Girls and Boys with Autism Spectrum Disorders." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 42(1):48–59. doi: 10.1007/s10803-011-1215-z.
- Spear, L. P. 2000. "The Adolescent Brain and Age-Related Behavioral Manifestations." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24(4):417–63. doi: 10.1016/S0149-7634(00)00014-2.
- van Steensel, Francisca J. A., Susan M. Bögels, and Sean Perrin. 2011. "Anxiety Disorders in Children and Adolescents with Autistic Spectrum Disorders: A Meta-Analysis." *Clinical Child and Family Psychology Review* 14(3):302–17. doi: 10.1007/s10567-011-0097-0.
- Steffenburg, Suzanne, Christopher Gillberg, Lars Hellgren, Lena Andersson, I. Carina Gillberg, Gun Jakobsson, and Michael Bohman. 1989. "A Twin Study of Autism in Denmark ,." *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 30(3):405–16.
- Steimer, T., R. M. Escorihuela, A. Fernández-teruel, and And P. Driscoll. 1998. "Long-Term Behavioural and Neuroendocrine Changes in Roman High-(RHA/Verh) and Low-(RLA-Verh) Avoidance Rats Following Neonatal Handling." *International Journal of Developmental Neuroscience* 16(3–4):165–74. doi: 10.1016/S0736-5748(98)00032-X.
- Sternberg, Wendy F., and Caroline G. Ridgway. 2003. "Effects of Gestational Stress and Neonatal Handling on Pain, Analgesia, and Stress Behavior of Adult Mice." *Physiology and Behavior* 78(3):375–83. doi: 10.1016/S0031-9384(03)00015-5.
- Steru, Lucien, Raymond Chermat, Bernard Thierry, and Pierre Simon. 1985. "The Tail Suspension Test: A New Method for Screening Antidepressants in Mice." *Psychopharmacology* 85(3):367–70. doi: 10.1007/BF00428203.
- Strömmland, K., V. Nordin, M. Miller, B. Akerström, and C. Gillberg. 1994. "Autism in Thalidomide Embryopathy: A Population Study." *Developmental Medicine & Child Neurology* 36(4):351–56. doi: 10.1111/j.1469-8749.1994.tb11856.x.
- Taylor, Lauren J., Valsamma Eapen, Murray T. Maybery, Sue Midford, Jessica Paynter, Lyndsay Quarmby, Timothy Smith, Katrina Williams, and Andrew J. O. Whitehouse. 2016. "Diagnostic Evaluation for Autism Spectrum Disorder: A Survey of Health Professionals in Australia." *BMJ Open* 6(9):1–8. doi: 10.1136/bmjopen-2016-012517.
- Taylor, Luke E., Amy L. Swerdfeger, and Guy D. Eslick. 2014. "Vaccines Are Not Associated with Autism: An Evidence-Based Meta-Analysis of Case-Control and Cohort Studies." *Vaccine* 32(29):3623–29. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.04.085.
- Teissier, Anne, Corentin Le Magueresse, Jimmy Olusakin, Belmira L. S. Andrade da Costa, Angela M. De Stasi, Alberto Bacci, Yuka Imamura Kawasawa, Vidita A. Vaidya, and Patricia Gaspar. 2020. "Early-Life Stress Impairs Postnatal Oligodendrogenesis and Adult Emotional Behaviour through Activity-Dependent Mechanisms." *Molecular Psychiatry* 25(6):1159–74. doi: 10.1038/s41380-019-0493-2.

- Terranova, M. Livia, and Giovanni Laviola. 2005. "Scoring of Social Interactions and Play in Mice during Adolescence." *Current Protocols in Toxicology / Editorial Board, Mahin D. Maines (Editor-in-Chief) ... [et Al.]* Chapter 13:1–11. doi: 10.1002/0471140856.tx1310s26.
- Terranova, M. Livia, Giovanni Laviola, and Enrico Alleva. 1993. "Ontogeny of Amicable Social Behavior in the Mouse: Gender Differences and Ongoing Isolation Outcomes." *Developmental Psychobiology* 26(8):467–81. doi: 10.1002/dev.420260805.
- Thor, D. H., R. J. Harrison, S. R. Schneider, and W. J. Carr. 1988. "Sex Differences in Investigatory and Grooming Behaviors of Laboratory Rats (*Rattus Norvegicus*) Following Exposure to Novelty." *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C. : 1983)* 102(2):188–92. doi: 10.1037/0735-7036.102.2.188.
- Thor, Donald H., and William R. Holloway. 1986. "Social Play Soliciting by Male and Female Juvenile Rats: Effects of Neonatal Androgenization and Sex of Cagemates." *Behavioral Neuroscience* 100(2):275–79. doi: 10.1037/0735-7044.100.2.275.
- Todd, Brigitte J., Jaclyn M. Schwarz, and Margaret M. McCarthy. 2005. "Prostaglandin-E2: A Point of Divergence in Estradiol-Mediated Sexual Differentiation." *Hormones and Behavior* 48(5):512–21. doi: 10.1016/j.yhbeh.2005.07.011.
- Todeschin, Anelise S., Elisa C. Winkelmann-Duarte, Maria Helena Vianna Jacob, Bruno Carlo Cerpa Aranda, Silvana Jacobs, Marilda C. Fernandes, Maria Flavia Marques Ribeiro, Gilberto Luiz Sanvito, and Aldo Bolten Lucion. 2009. "Effects of Neonatal Handling on Social Memory, Social Interaction, and Number of Oxytocin and Vasopressin Neurons in Rats." *Hormones and Behavior* 56(1):93–100. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.03.006.
- Toth, Mate, Eva Mikics, Aron Tulogdi, Mano Aliczki, and Jozsef Haller. 2011. "Post-Weaning Social Isolation Induces Abnormal Forms of Aggression in Conjunction with Increased Glucocorticoid and Autonomic Stress Responses." *Hormones and Behavior* 60(1):28–36. doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.02.003.
- Tsai, Luke, Mark A. Stewart, and Gerald August. 1981. "Implication of Sex Differences in the Familial Transmission of Infantile Autism." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 11(2):165–73. doi: 10.1007/BF01531682.
- Tzanoulinou, Stamatina, and Carmen Sandi. 2015. "The Programming of the Social Brain by Stress During Childhood and Adolescence: From Rodents to Humans." Pp. 411–29 in *Brain Imaging in Behavioral Neuroscience*.
- U.S. Government Accountability Office. 2001. "Drug Safety: Most Drugs Withdrawn in Recent Years Had Greater Health Risks for Women." *Gao-01-286R* 343(25):1–8.
- Ueno, Hiroshi, Yu Takahashi, Shunsuke Suemitsu, Shinji Murakami, Naoya Kitamura, Kenta Wani, Yosuke Matsumoto, Motoi Okamoto, and Takeshi Ishihara. 2020. "Effects of Repetitive Gentle Handling of Male C57BL/6NCr Mice on Comparative Behavioural Test Results." *Scientific Reports* 10(1):1–13. doi: 10.1038/s41598-020-60530-4.
- Vallée, Monique, Willy Mayo, Françoise Dellu, Michel Le Moal, Hervé Simon, and Stefania Maccari. 1997. "Prenatal Stress Induces High Anxiety and Postnatal Handling Induces Low Anxiety in Adult Offspring: Correlation with Stress-Induced Corticosterone Secretion." *Journal of Neuroscience* 17(7):2626–36. doi: 10.1523/jneurosci.17-07-02626.1997.
- Via, Esther, Joaquim Radua, Narcis Cardoner, Francesca Happé, and David Mataix-Cols. 2011. "Meta-Analysis of Gray Matter Abnormalities in Autism Spectrum Disorder." *Archives of General Psychiatry* 68(4):409. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.27.
- Villa, Alessandro, Paolo Gelosa, Laura Castiglioni, Mauro Cimino, Nicoletta Rizzi, Giovanna Pepe, Federica Lolli, Elena Marcello, Luigi Sironi, Elisabetta Vegeto, and Adriana Maggi.

2018. "Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice." *Cell Reports* 23(12):3501–11. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.048.
- Voineagu, Irina, Xinchun Wang, Patrick Johnston, Jennifer K. Lowe, Yuan Tian, Steve Horvath, Jonathan Mill, Rita M. Cantor, Benjamin J. Blencowe, and Daniel H. Geschwind. 2011. "Transcriptomic Analysis of Autistic Brain Reveals Convergent Molecular Pathology." *Nature* 474(7351):380–86. doi: 10.1038/nature10110.
- De Vries, Geert J. 2004. "Minireview: Sex Differences in Adult and Developing Brains: Compensation, Compensation, Compensation." *Endocrinology* 145(3):1063–68. doi: 10.1210/en.2003-1504.
- Wagner, George C., Kenneth R. Reuhl, Michelle Cheh, Paulette McRae, and Alycia K. Halladay. 2006. "A New Neurobehavioral Model of Autism in Mice: Pre- and Postnatal Exposure to Sodium Valproate." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 36(6):779–93. doi: 10.1007/s10803-006-0117-y.
- Wakefield, A. J., S. H. Murch, A. Anthony, J. Linnell, D. M. Casson, M. Malik, M. Berelowitz, A. P. Dhillon, M. A. Thomson, P. Harvey, A. Valentine, S. E. Davies, and J. A. Walker-Smith. 1998. "Retracted: Ileal-Lymphoid-Nodular Hyperplasia, Non-Specific Colitis, and Pervasive Developmental Disorder in Children." *Lancet* 351(9103):637–41. doi: 10.1016/S0140-6736(97)11096-0.
- Waters, Elizabeth M., and Richard B. Simerly. 2009. "Estrogen Induces Caspase-Dependent Cell Death during Hypothalamic Development." *Journal of Neuroscience* 29(31):9714–18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0135-09.2009.
- Webb, Sara Jane, Michelle M. Garrison, Raphael Bernier, Abbi M. McClintic, Bryan H. King, and Pierre D. Mourad. 2017. "Severity of ASD Symptoms and Their Correlation with the Presence of Copy Number Variations and Exposure to First Trimester Ultrasound." *Autism Research* 10(3):472–84. doi: 10.1002/aur.1690.
- Welsh, Michelle, Hiroko Suzuki, and Gen Yamada. 2014. "The Masculinization Programming Window." *Endocrine Development* 27(Md):17–27. doi: 10.1159/000363609.
- Werling, Donna M., Neelroop N. Parikshak, and Daniel H. Geschwind. 2016. "Gene Expression in Human Brain Implicates Sexually Dimorphic Pathways in Autism Spectrum Disorders." *Nature Communications* 7:1–11. doi: 10.1038/ncomms10717.
- Wessler, S. 1976. "Introduction : What Is a Model? - NLM Catalog - NCBI." Retrieved May 24, 2022 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101117739>).
- Wicker, Bruno, Elisabetta Monfardini, and Jean Pierre Royet. 2016. "Olfactory Processing in Adults with Autism Spectrum Disorders." *Molecular Autism* 7(1):1–11. doi: 10.1186/s13229-016-0070-3.
- Williams, Gail, John King, Michael Cunningham, Mark Stephan, Bronwyn Kerr, and Joseph H. Hersh. 2001. "Fetal Valproate Syndrome and Autism: Additional Evidence of an Association." *Developmental Medicine and Child Neurology* 43(03):202. doi: 10.1017/S001216220100038X.
- Williams, Jo, Fiona Scott, Carol Stott, Carrie Allison, Patrick Bolton, Simon Baron-Cohen, and Carol Brayne. 2005. "The CAST (Childhood Asperger Syndrome Test): Test Accuracy." *Autism* 9(1):45–68. doi: 10.1177/1362361305049029.
- Wing, Lorna. 1981. "Sex Ratios in Early Childhood Autism and Related Conditions." *Psychiatry Research* 5(2):129–37. doi: 10.1016/0165-1781(81)90043-3.
- Wing, Lorna. 1997. "The History of Ideas on Autism - Legends, Myths and Reality." *Autism*



- 1(1):13–23. doi: 10.1177/1362361397011004.
- Wing, Lorna, and David Potter. 2002. "The Epidemiology of Autistic Spectrum Disorders: Is the Prevalence Rising?" *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 8(3):151–61. doi: 10.1002/mrdd.10029.
- Wommack, Joel C., A. Salinas, R. H. Melloni, and Y. Delville. 2004. "Behavioural and Neuroendocrine Adaptations to Repeated Stress during Puberty in Male Golden Hamsters." *Journal of Neuroendocrinology* 16(9):767–75. doi: 10.1111/j.1365-2826.2004.01233.x.
- Wright, Christopher L., Scott R. Burks, and Margaret M. McCarthy. 2008. "Identification of Prostaglandin E2 Receptors Mediating Perinatal Masculinization of Adult Sex Behavior and Neuroanatomical Correlates." *Developmental Neurobiology* 68(12):1406–19. doi: 10.1002/dneu.20665.
- Wu, Melody V., Devanand S. Manoli, Eleanor J. Fraser, Jennifer K. Coats, Jessica Tollkuhn, Shin Ichiro Honda, Nobuhiro Harada, and Nirao M. Shah. 2009. "Estrogen Masculinizes Neural Pathways and Sex-Specific Behaviors." *Cell* 139(1):61–72. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.036.
- Wu, S., F. Wu, Y. Ding, J. Hou, J. Bi, and Z. Zhang. 2017. "Advanced Parental Age and Autism Risk in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Acta Psychiatrica Scandinavica* 135(1):29–41. doi: 10.1111/acps.12666.
- Yamaguchi, Hiroshi, Yuta Hara, Yukio Ago, Erika Takano, Shigeru Hasebe, Takanobu Nakazawa, Hitoshi Hashimoto, Toshio Matsuda, and Kazuhiro Takuma. 2017. "Environmental Enrichment Attenuates Behavioral Abnormalities in Valproic Acid-Exposed Autism Model Mice." *Behavioural Brain Research* 333(March):67–73. doi: 10.1016/j.bbr.2017.06.035.
- Yang, Mu, Kayla Perry, Michael D. Weber, Adam M. Katz, and Jacqueline N. Crawley. 2011. "Social Peers Rescue Autism-Relevant Sociability Deficits in Adolescent Mice." *Autism Research* 4(1):17–27. doi: 10.1002/aur.163.
- Yohn, Nicole L., and Julie A. Blendy. 2017. "Adolescent Chronic Unpredictable Stress Exposure Is a Sensitive Window for Long-Term Changes in Adult Behavior in Mice." *Neuropsychopharmacology* 42(8):1670–78. doi: 10.1038/npp.2017.11.
- Young, H., M. J. Oreve, and M. Speranza. 2018. "Clinical Characteristics and Problems Diagnosing Autism Spectrum Disorder in Girls." *Archives de Pediatrie* 25(6):399–403. doi: 10.1016/j.arcped.2018.06.008.
- Zablotsky, Benjamin, Lindsey I. Black, Matthew J. Maenner, Laura A. Schieve, and Stephen J. Blumberg. 2015. "Estimated Prevalence of Autism and Other Developmental Disabilities Following Questionnaire Changes in the 2014 National Health Interview Survey." *National Health Statistics Reports* 2015(87).
- Zhang, Fan, Sanna Yuan, Feng Shao, and Weiwen Wang. 2016. "Adolescent Social Defeat Induced Alterations in Social Behavior and Cognitive Flexibility in Adult Mice: Effects of Developmental Stage and Social Condition." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10(JULY):1–11. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00149.
- Zimmerman, Andrew W., Susan L. Connors, Karla J. Matteson, Li Ching Lee, Harvey S. Singer, Julian A. Castaneda, and David A. Pearce. 2007. "Maternal Antibrain Antibodies in Autism." *Brain, Behavior, and Immunity* 21(3):351–57. doi: 10.1016/j.bbi.2006.08.005.