



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Aportes a la comprensión de las bases biológicas del autismo:
caracterización del rol del cerebelo en la modulación de los
niveles de sociabilidad y evidencia de herencia intergeneracional
de los niveles de sociabilidad en un modelo murino de autismo.**

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

Cecilia Mariel Zappala

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)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2021

Aportes a la comprensión de las bases biológicas del autismo: caracterización del rol del cerebelo en la modulación de los niveles de sociabilidad y evidencia de herencia intergeneracional de los niveles de sociabilidad en un modelo murino de autismo.

El desorden del espectro autista es una alteración en el neurodesarrollo caracterizada por impedimentos en la interacción social, habilidades comunicativas reducidas y la presencia de comportamientos repetitivos. Actualmente múltiples factores etiológicos se asocian a este desorden.

El objetivo general de esta tesis doctoral fue analizar en qué medida dos factores contribuyen a la neurobiología del autismo y la sociabilidad. Así buscamos por un lado determinar el rol que juega el cerebelo en los niveles de sociabilidad y, por otro lado, determinar la heredabilidad de los fenotipos asociados a autismo en un modelo murino.

Para analizar el rol del cerebelo en la sociabilidad utilizamos dos enfoques. Primero utilizamos el modelo de administración prenatal de Ácido Valproico (VPA) en ratones. Está descrito que la exposición prenatal al VPA produce una disminución en la sociabilidad de los ratones machos adultos. Caracterizamos la estructura del lóbulo VI/VII cerebelar de estos animales y buscamos en el modelo alteraciones morfológicas descritas en pacientes con autismo. Además, estudiamos la relación funcional entre la neuroinflamación cerebelar del lóbulo VI/VII y la sociabilidad. Encontramos que los animales machos VPA muestran alteraciones en la densidad de células de Purkinje en el periodo postnatal, pero las mismas no se observan en la adultez. Por otro lado, observamos que la neuroinflamación del lóbulo VI/VII en machos adultos lleva a una disminución en la sociabilidad. Este efecto puede ser revertido mediante la inyección sistémica de un antiinflamatorio esteroideo, el cual tiene como uno de sus blancos a la vía NFκ-B, la cual está descrita que tiene un efecto importante sobre la activación de la microglia.

Por otro lado, cada vez hay más estudios que vinculan alteraciones epigenéticas con diferentes desórdenes psiquiátricos, incluido el autismo. Debido a que el VPA actúa como inhibidor de las deacetilasas de histonas nos preguntamos si este agente podría estar actuando por mecanismos epigenéticos y si sus efectos podrían ser heredados a las siguientes generaciones. Para determinarlo planteamos diferentes cruces para analizar si los fenotipos observados en los machos del modelo VPA podían ser heredado a las siguientes

generaciones por linaje paterno o materno. Nuestros resultados muestran que las alteraciones en la sociabilidad pueden ser heredados intergeneracionalmente a través del linaje paterno a la descendencia masculina. Interesantemente, estos niveles de sociabilidad pueden ser modulados y presentar mejorías si se aplica un diseño de estimulación social temprana en los animales. No observamos en nuestro modelo evidencia de herencia transgeneracional de los fenotipos.

Consideramos que este trabajo puede ayudar a conocer el rol del cerebelo en la sociabilidad y permitió analizar la heredabilidad de los fenotipos conductuales en un modelo de autismo.

Palabras clave: autismo, cerebelo, ácido valproico, heredabilidad, intergeneracional, herencia

Contributions to the understanding of the biological bases of autism: characterization of the role of the cerebellum in regulating the levels of sociability and evidence of intergenerational inheritance of the levels of sociability in a murine model of autism.

Autism spectrum disorder is a neurodevelopmental disorder characterized by impairments in social interaction, reduced communication skills, and the presence of repetitive behaviors. Currently, multiple etiological factors have been associated with this disorder.

The general aim of this doctoral thesis is to analyze to what extent two factors contribute to the neurobiology of autism and sociability. In this work we sought, on one hand, to determine the role of the cerebellum in determining the levels of sociability and, on the other hand, to evaluate the heritability of phenotypes associated with autism in a murine model.

To analyze the role of the cerebellum in sociability we used two approaches. We first used the mouse model of prenatal administration of Valproic Acid (VPA). It has been described that prenatal exposure to VPA produces a decrease in sociability in adult male mice. Therefore, we characterize the structure of lobule VI / VII of the cerebellum in our animals and looked for morphological alterations described in patients with autism. In addition, we studied the functional relationship between lobule VI / VII of the cerebellum and neuroinflammation and sociability. We found that male VPA animals showed alterations in Purkinje cell density in the postnatal period, but that these alterations were not observed in adulthood. Moreover, we observed that neuroinflammation of the lobule VI / VII of adult male mice leads to a decrease in sociability. This effect can be reversed with the systemic administration of a steroidal anti-inflammatory drug, which targets – among others- the NF κ -B pathway, that is important in microglia activation.

There are several studies that link epigenetic alterations with different psychiatric disorders, including autism. Since VPA acts as an inhibitor of histone deacetylases, we wondered whether this agent could be acting by epigenetic mechanisms and if its effects could be inherited to subsequent generations. To determine this, we bred mice to analyze

whether the inheritance of the phenotypes observed in male animals of the VPA model could be inherited to the following generations by the paternal or the maternal lineage. Our results show that alterations in sociability can be inherited intergenerationally through the paternal lineage to male offspring. Interestingly, these levels of sociability can be modulated and improved by early social stimulation. We did not observe evidence of transgenerational inheritance of phenotypes in our model.

We believe that this work can help to understand the role of the cerebellum in sociability and allowed us to analyze the heritability of behavioral phenotypes in a mouse model of autism.

Keywords: autism, cerebellum, valproic acid, heritability, intergenerational, inheritance

Abreviaturas

ABN = Amamantamiento activo (del inglés, *Arched Back Nursing*)

ANOVA = Análisis de la varianza (del inglés, *Analysis of Variance*)

APA = Asociación Americana de Psiquiatría

BHE = Barrera Hematoencefálica

CD11 = Grupo de diferenciación 11 (del inglés, *Cluster of Differentiation 11*)

CD45 = Grupo de diferenciación 45 (del inglés, *Cluster of Differentiation 45*)

CPs = Células de Purkinje

DAMPS = Patrón molecular asociado a daño (del inglés, *Damage-Associated Molecular Pattern*)

DEA = Desorden del Espectro Autista

DEXA = Dexametasona

DG = Día gestacional

DSM= Manual Estadístico y de Diagnóstico de Desórdenes Mentales

Fx = Filial x

GFAP = Proteína ácida fibrilar glial (del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GM-CSF = Factor estimulante de granulocitos y macrófagos (del inglés, *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*)

GWAS = Estudio de asociaciones genómicas (del inglés, *Genome-Wide Association Study*)

H3K4 = Histona H3lisina4

HDAC = Deacetilasa de histonas (del inglés, *Histone DeAcetylases*)

IBA1 = Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (del inglés, *Ionized calcium-Binding Adaptor molecule 1*)

IBU = Ibuprofeno

IL-x = Interleuquina x

Ip = Intraperitoneal

LEAP = Experiencias de aprendizaje: un programa alternativo para pre-escolares y padres (del inglés, *Learning Experiences: an Alternative Program for Preschoolers & Parents*)

LGP = Acicalamiento de las crías (del inglés, *Licking and Grooming the Pups*)

LM =Linaje materno

LNS = Lado No Social

LP = Linaje paterno

LPS = Lipopolisacárido

LS = Lado Social

MIA = Activación inmune materna (del inglés, *Maternal Immune Activation*)

PAMPs = Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PB = Buffer Fosfato

PBS = Buffer Fosfato Salino

PET = Tomografía de emisión de positrones (del inglés, *Positron Emission Tomography*)

PFA = Paraformaldehído

PolyI:C = ácido poliriboinosínico-poliribocitidílico

PPA = Ácido Propiónico

Px = Día Postnatal x

SEM = Error estándar de la media (del inglés, *Standard Error of the Mean*)

TAG = Trastornos de Ansiedad Generalizados

TBS = Buffer Tris Salino

TDAH = Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad

TNFx = Factor de necrosis tumoral x

TOC = Trastornos Obsesivos Compulsivos

Tto = Tratamiento

Tx = Detergente Tritón x-100

UTR = Región no traducida (del inglés, *UnTranslated Region*)

VPA = Ácido Valproico (del inglés, *Valproic Acid*)

VTA = Área tegmental ventral (del inglés, *Ventral Tegmental Area*)

Índice

Abreviaturas	5
Capítulo I. Introducción	11
I.1. Breve recorrido histórico del concepto de Desorden del Espectro Autista (DEA).....	12
I.2. Etiología del autismo.....	13
I.2.1. Factores genéticos	14
I.2.2. Factores ambientales.....	16
I.2.3. Factores epigenéticos.....	18
I.2.4. Herencia Intergeneracional y Transgeneracional	20
I.3. Neuropatología del autismo	22
I.3.1. Alteraciones de la corteza en el DEA	23
I.3.2. Alteraciones cerebelares	23
I.3.3. Alteraciones del sistema inmune en el DEA	28
I.4. Comorbilidades frecuentes en el DEA	34
I.5. Modelos animales de autismo	36
I.5.1. Modelo de exposición prenatal al ácido valproico (VPA)	37
I.5.2. Modelo de activación inmune materna (MIA)	40
I.6. Estimulación social temprana y DEA	42
Hipótesis y Objetivos	44
Capítulo II. Materiales y Métodos	47
II.1. Animales	48
II.1.1. Progenitores (F0).....	48
II.1.2. Tratamiento prenatal: Crías F1	49
II.1.3. Apareos realizados para estudiar herencia intergeneracional y transgeneracional .	50
II.1.3.1. Herencia intergeneracional - Crías F2: linaje materno	50
II.1.3.2. Herencia intergeneracional - Crías F2: linaje paterno	51
II.1.3.3. Herencia transgeneracional - Crías F3: linaje paterno.....	51
II.1.4. Ratones CF1 utilizados para las inyecciones estereotáxicas	52
II.2. Tratamiento postnatal: Modelo de Rescate social	52

II.3. Inyecciones	53
II.3.1. Inyección estereotáxica de LPS en el cerebelo	53
II.3.2. Inyecciones intraperitoneales con anti-inflamatorios.....	55
II.4. Cuidado materno.....	55
II.5. Ganancia en peso	56
II.6. Comportamiento durante el desarrollo postnatal	56
II.6.1. Enderezamiento sobre superficie	56
II.6.2. Fuerza de agarre en una red colgante.....	56
II.6.3. Sobresalto acústico.....	57
II.7. Comportamiento en la adultez	57
II.7.1. Ensayo de Interacción Social	57
II.7.2. Ensayo de autoacicalamiento	59
II.7.3. Laberinto en Y.....	59
II.7.4. Reconocimiento de un objeto novedoso	60
II.7.5. Ensayo de habituación/deshabituación olfativa	61
II.7.6. Ensayo de nado forzado	63
II.7.7. Ensayo de suspensión de la cola	63
II.7.8. Ensayo de campo abierto	64
8. Análisis Histológico	65
8.1. Procesamiento de los tejidos	65
II.8.2. Tinción de Nissl	66
II.8.3. Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia	66
II.8.3.1. c-Fos	67
II.8.3.2. IBA-1	67
II.8.4. Obtención de imágenes	68
II.8.5. Análisis de las imágenes	68
II.8.5.1. Parámetros morfométricos.....	68
II.8.5.2. Densidad de células de Purkinje.....	69
II.8.5.3. Cuantificación de células c-Fos positivas.....	70
II.8.5.4. Cuantificación de células IBA-1 positivas	70
II.8.6. Análisis de los niveles de catecolaminas mediante HPLC.....	72
II.8.7 Análisis estadístico	73

Capítulo III. Caracterización del cerebelo en el modelo VPA.....	74
III.1. Punto de inicio.....	76
III.2. Diseño experimental.....	77
III.3. Resultados.....	77
III.3.1. Densidad de células de Purkinje en animales del modelo VPA	77
III.3.2. Parámetros morfométricos en ratones adultos del modelo VPA	80
III.3.3. El cerebelo y el circuito de la recompensa en el modelo VPA: Cuantificación de las células c-Fos-positivas en el área tegmental ventral	83
III.4. Conclusiones y discusión	84
Capítulo IV. Rol de la neuroinflamación del lóbulo VI/VII cerebelar en la sociabilidad.....	88
IV.1. Punto de inicio.....	90
IV.2. Diseño experimental.....	90
IV. 3. Resultados	93
IV.3.1. Efecto del tratamiento sistémico con drogas anti-inflamatorias sobre la sociabilidad en animales inyectados con LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo.	93
IV.3.2. Efecto del tratamiento sistémico con drogas anti-inflamatorias sobre la neuroinflamación en animales inyectados con LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo ...	101
IV.3.2.1. Cuantificación de la microglia	101
IV.3.3.2. Caracterización morfológica de los diferentes fenotipos de la microglia. ...	107
IV.3.3. Efecto del tratamiento sistémico con drogas anti-inflamatorias sobre la densidad de células de Purkinje y el área del lóbulo VII cerebelar en animales inyectados estereotáxicamente con LPS	111
IV.4. Conclusiones y Discusión	113
Capítulo V. Herencia a través de las generaciones de los fenotipos asociados a autismo en el modelo VPA.....	115
V.1. Punto de inicio	117
V.2. Nomenclatura.....	119
V.3. Características descritas en la F1 del modelo VPA	121
V.4. Resultados - Herencia intergeneracional a través del linaje materno	122
V.4.1. Diseño experimental	122
V.4.2. Cuidado materno de la F1-VPA.....	123

V.4.3. Crías F2: linaje materno.....	124
V.4.3.1. Comportamiento postnatal de las crías de la F2 -linaje materno	124
V.4.3.2. Comportamiento en la adultez de la F2 - linaje materno	128
V.4.4. Conclusiones y discusión sobre la herencia intergeneracional a través del linaje materno	135
V.5. Resultados - Herencia intergeneracional a través del linaje paterno	140
V.5.1. Diseño experimental	140
V.5.2. Comportamiento postnatal de las crías de la F2 - linaje paterno	141
V.5.3. Comportamiento en la adultez de las hembras de la F2 - linaje paterno	145
V.5.4. Comportamiento en la adultez de los machos de la F2 - linaje paterno y estudio del efecto de la estimulación social temprana sobre los mismos.....	155
V.5.5. Densidad de células c-Fos ⁺ en la corteza piriforme de ratones machos F2 - linaje paterno	167
V.5.6. Niveles de catecolaminas en la corteza piriforme de ratones machos F2 - linaje paterno	169
V.5.7. Conclusiones y discusión sobre la herencia intergeneracional a través del linaje paterno	170
V.6. Resultados - Herencia transgeneracional a través del linaje paterno.....	177
V.6.1. Diseño experimental	177
V.6.2. Crías F3: linaje paterno	179
V.6.2.1. Ganancia en peso durante el periodo postnatal en la F3 - linaje paterno	179
V.6.3. Conclusiones y discusión sobre la ganancia de peso y el comportamiento en la adultez de machos F3/LP	189
Capítulo VI. Conclusiones generales.....	191
Capitulo VII. Bibliografía.....	197

Capítulo I. Introducción

I.1. Breve recorrido histórico del concepto de Desorden del Espectro

Autista (DEA)

El término autismo viene de la palabra griega Auto, que significa “si mismo”. Fue utilizado por primera vez en 1911 por el psiquiatra Eugen Bleuler para describir ciertas características de la conducta presentes en pacientes esquizofrénicos. Según Bleuler estos pacientes presentaban, dentro de su patología esquizofrénica, un repliegue de la vida mental sobre sí mismos, la constitución de un mundo cerrado y la dificultad extrema o la imposibilidad de comunicarse con los demás (De Lara, 2012).

En 1943, Leo Kanner, psiquiatra infantil del Hospital John Hopkins, describió en su trabajo el seguimiento durante 5 años de la conducta de 11 pacientes que presentaban dificultades en las relaciones sociales. A diferencia de lo que se creía en ese momento, él concluyó que los pacientes no eran esquizofrénicos, ni presentaban una forma temprana de esta enfermedad, sino que se trataba de un desorden diferente. Él fue el primero en describir esta conducta como “autismo infantil temprano” y considerarla una condición presente en los niños desde su nacimiento (Kanner, 1943). En su trabajo el autor describe los rasgos más salientes de sus pacientes como: soledad extrema, una obsesión por mantener las cosas en su lugar, ecolalia tardía e, incluso, algunos pacientes presentaban muy buena memoria. En principio, el trabajo de Kanner llevó a interpretar al autismo como una alteración emocional más que una alteración cognitiva, y se consideraba que la causa del desorden estaba asociada a la falta de apego materno y de contacto emocional (lo que se conoce como la teoría de las madres refrigeradoras) (Kanner, 1943, Jaison, 2018, Kroncke et al., 2016, Chown & Hughes, 2016).

Un año más tarde, Hans Asperger, pediatra y psiquiatra austríaco, describió el comportamiento de niños que, al igual que los de Kanner, presentaban dificultades para integrarse socialmente. Si bien su inteligencia y adquisición de lenguaje parecían ser normales, los niños carecían de habilidades no verbales de comunicación, no presentaban empatía y tenían intereses restrictivos. Al igual que Kanner, Asperger llamó al conjunto de estas conductas “psicopatía autista” (Wing, 1981).

No fue hasta 1980 que el Manual Estadístico y de Diagnóstico de Desórdenes Mentales III (DSM III), contemplando la evidencia científica obtenida hasta el momento, describió al autismo con un diagnóstico diferente al de la esquizofrenia y lo consideró como

un trastorno del desarrollo y no como una condición emocional (APA, 1980, Pina-Camacho et al., 2016). En el DSM IV (APA, 1994) se describe al síndrome de Asperger y se lo clasifica como un desorden diferente del autismo. El trastorno autista y el síndrome de Asperger comparten las características de alteraciones en la sociabilidad e intereses repetitivos, aunque se diferencian en que las personas con Asperger poseen un coeficiente intelectual promedio o superior a la media poblacional, y la ausencia del retraso en el habla (Baron-Cohen, 2010).

En la quinta edición del DSM (DSM V) desaparece la categoría conocida como “Trastornos Generalizados del Desarrollo” y se la reemplaza por el “Trastorno de Espectro Autista”, actualmente conocida como “Desorden de Espectro Autista” (DEA), la cual incluye dos dominios principales: déficit en la sociabilidad, y conductas repetitivas y restrictivas (APA, 2013). Actualmente el DEA incluye a 3 de los 5 desórdenes del desarrollo persistente que se listan en el DSM IV: el Desorden autista, el Síndrome de Asperger, y el Trastorno del desarrollo persistente no especificado de otra manera. El DSM vigente en la actualidad (DSM V) incluye así en su criterio diagnóstico del DEA las siguientes características:

- Dificultades en la comunicación y en la interacción social
- Presencia de comportamientos repetitivos
- Los síntomas deben estar presentes en la infancia temprana (aunque pueden no manifestarse plenamente)
- Estas alteraciones no se deben explicar por retrasos globales en el desarrollo o discapacidad intelectual

I.2. Etiología del autismo

Actualmente no se considera que el DEA pueda ser explicado a partir de una única causa o mecanismo. Dado que existe una gran variabilidad en la gravedad de los síntomas, así como en el momento de inicio de los mismos, Casanova et al. (2020) sugieren que esta variabilidad sirve como índice de la variabilidad de las causas de este desorden, las cuales puede incluir tanto factores genéticos como ambientales.

El DEA puede ser clasificado como **autismo secundario o sindrómico** cuando las características de este desorden se manifiestan en personas que presentan un síndrome o

enfermedad congénita o adquirida. En el caso de no conocer las causas etiológicas del autismo se lo llama **autismo idiopático**.

El autismo sindrómico representa el 15% de los pacientes diagnosticados con DEA, mientras que el otro 85% presenta autismo idiopático (National Institute of Health about Autism, 2019). El autismo sindrómico puede manifestarse por ejemplo en personas que presentan alteraciones genéticas como las que se observan en el síndrome de X Frágil, síndrome de Rett, síndrome de Angelman, síndrome de Down, o esclerosis tuberosa (Caglayan, 2010, Robert et al. 2017). También puede observarse en enfermedades congénitas o adquiridas como la meningitis, la rubeola y la toxoplasmosis, entre otras (Mulas Delgado et al., 2005).

A continuación describiremos los principales factores que han sido propuestos para explicar el autismo.

I.2.1. Factores genéticos

Existe evidencia innegable que el autismo presenta un componente genético (Rodier, 2000). Esta evidencia se basa principalmente en estudios de concordancia realizados en hermanos gemelos (monocigóticos) y mellizos (dicigóticos), donde tanto los gemelos como los mellizos comparten el mismo ambiente uterino, pero la diferencia radica en que los gemelos presentan el mismo material genético, mientras que los mellizos no. Los estudios de concordancia indican la probabilidad de que, si un individuo presenta el fenotipo autista, su hermano o hermana también lo haga. Estas investigaciones han encontrado que si un individuo presenta DEA existe un 60% de probabilidad de que su gemelo también lo haga. Mientras que si son mellizos esta concordancia es del 0% (Steffenburg et al., 1989, Bailey et al., 1995, Folstein & Rosen-Sheilley, 2001). Estos estudios manifiestan la heredabilidad que presenta el trastorno. Adicionalmente, al producirse una reevaluación en el DSM V de lo que se conoce como el espectro autista, aumentó el grado de concordancia de 60 a 92% para los gemelos, y de 0 a 10% para los mellizos (Muhle et al., 2004). Debido a esto, Muhle et al. (2004) sugieren que la interacción entre múltiples genes sería la responsable del autismo idiopático, pero que factores genéticos y ambientales pueden contribuir a la variabilidad de la expresión del fenotipo.

Otra evidencia que indica la relación entre el DEA y los factores genéticos son las formas de autismo sindrómico, que fue en donde se encontraron los primeros genes candidatos para el autismo (Warrier & Baron-Cohen, 2001). Muchos de los síndromes (síndrome de Rett, X Frágil, esclerosis tuberosa, síndrome de Down) están asociados a mutaciones monogénicas o mendelianas. Sin embargo, como mencionamos previamente, el autismo sindrómico sólo explica un porcentaje relativamente bajo de los casos de DEA.

En cuanto al autismo idiopático, en la revisión de Caglayan (2010) se describen algunos de los genes candidatos más estudiados y cuya alteración está asociada con un aumento en el riesgo de desarrollar autismo. Entre ellos tenemos a distintos genes relacionados con la formación y fortalecimiento de sinapsis, como *NLGN3* y *NLGN4* que codifican para las proteínas postsinápticas neurogilingas 3 y 4. Estas proteínas interactúan con las neuroxinas, presentes en las neuronas presinápticas. La alteración de estos genes se caracteriza por la pérdida de la destreza social y verbal adquirida. Asimismo, el gen *NRXN1*, que codifica para la proteína neuroxina 1- α , también ha sido reconocido como un gen candidato, posiblemente por la participación de esta proteína en la adhesión celular y por sus funciones como receptor. El gen *SHANK3* que codifica para la proteína Shank participa en el complejo postsináptico de las sinapsis excitatorias y se ha demostrado que la mutación de esta proteína puede generar un severo déficit social y verbal. Por otro lado, se ha vinculado con el DEA al gen *MeCP2*, que codifica para una proteína represora de la transcripción que se une a regiones CpG metiladas de la región promotora de otros genes, y que además recluta a deacetilasas de histonas que participan en la represión de la expresión génica. Finalmente, se ha asociado el DEA con genes de la familia *HOXA1*, que codifican para factores de transcripción necesarios para el desarrollo de la cabeza y el cuello. En resumen, las mutaciones de estos genes candidatos incluyen alteraciones en la expresión y función de proteínas que tendrían un impacto en los procesos neuronales normales y generarían por tanto las manifestaciones conductuales observadas en el DEA. Finalmente, estudios desarrollados por Gillberg et al. (2019) con la técnica de GWAS (*Genome-wide association study*) en familiares que presentan parientes con autismo, indican que entre 3.6 y 8.8% de los pacientes diagnosticados presentan mutaciones *de novo*.

Si bien parecería que la genética clásica asociada a las alteraciones de estos genes candidatos nos permite comprender al menos en parte la causa del DEA, actualmente

continúa siendo un desafío explicar la variabilidad en la conducta presente en el desorden. Persico & Bourgeron (2006) intentan explicar la variabilidad observada en los fenotipos de DEA como el resultado de la complejidad del perfil genético, que involucra múltiples genes, heterogeneidad de *loci*, fenómenos de *imprinting* genético, e interacciones entre los genes y el ambiente (Persico & Bourgeron, 2006).

Finalmente, en el último tiempo el campo de la genética ha ampliado su estudio no sólo a los genes que codifican para proteínas, sino a los mecanismos encargados de la regulación y expresión/represión de genes, incluyendo a las alteraciones en los mecanismos epigenéticos como otro factor etiológico del DEA. Estos mecanismos epigenéticos interesantemente podrían estar mediando la interacción entre los genes y el ambiente, como veremos en la sección I.2.3.

I.2.2. Factores ambientales

Si bien el estudio en gemelos ha demostrado que la concordancia en el DEA es alta, trabajos posteriores sugirieron que los índices de concordancia no deben ser explicados solamente por los genes, ya que los gemelos comparten un mismo ambiente perinatal y éste puede estar contribuyendo a la causa del desorden (Hallmayer et al., 2011, Sandin et al., 2014). Cuando hablamos del ambiente nos referimos al entorno biológico, el cual puede estar influenciado por exposiciones químicas, bacterianas, virales y físicas que actúan sobre la fisiología del organismo (Bölte et al., 2019).

Bölte et al. (2019) proponen que el ambiente puede jugar dos roles en este desorden: puede tener un rol causal si favorece el desarrollo del trastorno, pero también puede participar en la modulación de una predisposición genética, haciendo que se desarrolle o no el DEA. Estos autores proponen que el ambiente es capaz de modular la severidad del autismo o disminuir su riesgo según las condiciones.

Algunos factores netamente ambientales que se han demostrado que aumentan el riesgo al desarrollo del autismo son: la edad paterna, el ambiente fetal (alteraciones en las hormonas sexuales maternas, obesidad materna, infecciones maternas), y medicaciones (antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina, ácido valproico) (Karimi et al.,

2017, Bölte et al., 2019). Adicionalmente, el consumo de alcohol, el fumar y la nutrición materna también han mostrado incrementar el riesgo al desarrollo de este desorden, así como la exposición a pesticidas, compuestos orgánicos no persistentes (ftalatos, bisfenol) y compuestos orgánicos persistentes (diclorodifenil tricloroetano- DDT, plocilobisfenilos-PBC) (Bölte et al., 2019).

Uno de los factores ambientales que aumenta el riesgo de autismo que ha sido más estudiado es el ácido valproico (VPA). El VPA es utilizado como un anticonvulsivante para el tratamiento de la epilepsia, aunque su uso también está relacionado a otros desórdenes como el trastorno bipolar, como estabilizador del humor (Macfarlane & Greenhalgh, 2018). Además, debido a su acción como inhibidor de deacetilasas de histonas, se están desarrollando ensayos clínicos que indican esta droga para el tratamiento de otras enfermedades como el Alzheimer, el SIDA y el cáncer (Ornoy et al., 2020). Estudios de cohortes de mujeres que han utilizado esta droga durante el primer trimestre del embarazo han demostrado que aumenta 7 veces la probabilidad de que sus hijos desarrollen malformaciones congénitas (Wyszynski et al., 2005). De hecho, muchos de sus efectos en el desarrollo son tan característicos que se ha descrito el Síndrome de Valproato Fetal y su reconocimiento ha llevado a que el VPA sea contraindicado en mujeres en edad fértil, salvo que sea la droga de elección para tratar la condición del paciente. Los efectos teratogénicos del VPA van desde malformaciones mayores y menores (rostros característicos, defectos del cerebro y médula espinal, anomalías genitales y de los miembros) hasta retrasos en el desarrollo y características conductuales similares a las observadas en el DEA (Ardingier et al., 1988, Mutlu-Albayrak et al., 2016, Ornoy et al., 2018).

Los mecanismos de acción del VPA no se comprenden completamente, y es considerada una droga “sucia”. Por un lado, el VPA parece actuar como un eficaz anticonvulsivante y estabilizador del humor debido a que incrementa los niveles sinápticos del neurotransmisor GABA y reduce los potenciales de acción que llevan a las convulsiones (Winterer et al., 2003, Ornoy et al., 2009). En cambio, las causas de sus efectos teratogénicos no son del todo claras, y algunos autores sugieren que podrían estar asociadas a efectos epigenéticos ya que el VPA actúa como un inhibidor de las deacetilasas de histonas, por lo que puede causar cambios en la expresión de genes (Phiel et al., 2001). Otro mecanismo al que se ha asociado su efecto teratogénico es a que esta droga puede

producir la depleción del ácido fólico, el cual podría afectar la expresión génica, la síntesis proteica y los niveles de estrés oxidativo (Ornoy et al., 2018).

I.2.3. Factores epigenéticos

La epigenética hace referencia a los cambios producidos en la expresión génica sin alteración de la secuencia de ADN (Schiele & Domschke, 2018). Las marcas epigenéticas (como metilaciones del ADN o modificaciones de las histonas) pueden alterar la expresión génica. Errores epigenéticos pueden estar asociados a eventos estocásticos como mutaciones o a exposiciones a diversos factores ambientales. En ambos casos pueden resultar finalmente en la disrupción de la expresión génica, con un impacto negativo en vías biológicas importantes para el desarrollo del cerebro (Siu & Weksberg, 2017). Estudios recientes se están enfocando en entender cuál es la contribución de la epigenética a la etiología del DEA, haciendo hincapié en que éste es un mecanismo que permite la interacción entre el genoma y el ambiente.

Existen dos grandes evidencias que relacionan las alteraciones epigenéticas con el autismo. La primera es que muchos de los síndromes que presentan características conductuales similares a las observadas en pacientes con autismo están asociados a alteraciones en los mecanismos epigenéticos. Y la segunda es el estudio de las marcas epigenéticas en diferentes tejidos de pacientes que presentan DEA.

Como hemos mencionado previamente, un 15% de los casos de autismo está asociado a algún síndrome. Un número significativo de estos síndromes presentan alteraciones en genes relacionados con mecanismos epigenéticos, como el síndrome de Rett, el de X Frágil o el de Angelman entre los más conocidos (Zhao et al., 2007). Por ejemplo, el síndrome de Rett está asociado a mutaciones en el gen *MeCP2*, el cual codifica para la proteína *Methyl CpG binding protein* que se une al ADN metilado, modela la estructura de la cromatina y afecta de esta forma la expresión de diversos genes. En pacientes con síndrome de X Frágil se observan repeticiones de CGG en la región 5' UTR (*untranslated region*) del gen *FMRI*, que resulta en una hipermetilación y silenciamiento del gen. Adicionalmente se ha demostrado que mutaciones en el gen que codifica para la

proteína CHD8 (*chromodomain helicase DNA binding protein 8*), la cual modela la estructura de la cromatina y recluta histonas H1, deriva en un síndrome que presenta características conductuales similares a las observadas en el DEA, junto con otras características como la macrocefalia o problemas intestinales (Bernier et al., 2014). Estas particularidades de los genes afectados sugieren que existe una relación estrecha entre las características fenotípicas de estos síndromes (que serán discutidas en el capítulo 5) con alteraciones en los mecanismos epigenéticos.

Por otro lado, el estudio directo de las marcas epigenéticas en pacientes con autismo representa un desafío, debido a que la epigenómica es característica de cada tipo celular y región del cerebro, lo que dificulta la comparación entre diferentes trabajos. Sin embargo, dos estudios han reportado una metilación diferencial en la región 3' UTR de los genes *PRRT1*, *TSPAN32* y *C11orf21* en el cerebro de pacientes con autismo (Siu & Weksberg, 2017). Otros autores han apuntado a investigar las metilaciones de los promotores de genes candidatos para el desarrollo del DEA, concluyendo con la identificación de metilaciones diferenciales en diferentes islas CpG del promotor de los genes *OXTR* (que codifica para el receptor de oxitocina), *SHANK3*, y *MeCP2* (Elagoz Yuksel et al., 2016, Jiang et al., 2004, Nagarajan et al., 2006, Zhu et al., 2014). También se han realizado investigaciones sobre las acetilaciones y metilaciones de diferentes tipos de histonas presentes en las muestras de cerebros *postmortem* de pacientes con DEA. Estos resultados demostraron que las personas con autismo presentan patrones diferenciales de acetilaciones y metilaciones de histonas específicas (Shulha et al., 2012, Sun et al., 2016).

Wang et al. (2020) estudiaron el rol de las enzimas metiltransferasas en ratones mutantes para la proteína Shank. Estos animales presentaban un fenotipo relacionado con el autismo, caracterizado por un déficit en la sociabilidad. Además observaron que los ratones que carecían de una copia del gen *SHANK3* mostraban niveles aumentados de las metiltransferasas EHMT1 y EHMT2 en la corteza prefrontal, así como una dimetilación de la lisina 9 de las histonas, que es mediada por estas enzimas. Esta última característica también fue observada en cerebros *postmortem* de pacientes con autismo. En este trabajo, reportaron que la administración en la corteza prefrontal de UNC0642, un inhibidor de estas metiltransferasas, induce un rescate de la sociabilidad en estos animales y restablece la función sináptica mediada por los receptores NMDA. Estos resultados son interesantes para

plantear estrategias terapéuticas que tengan como blanco diferentes componentes epigenéticos para poder “ajustar” la expresión génica.

I.2.4. Herencia Intergeneracional y Transgeneracional

En los últimos años se ha demostrado que ciertos fenotipos adquiridos a causa de exposiciones ambientales o experiencias personales pueden ser heredados. La herencia hace referencia a la transmisión de las características presentes en los parentales a su descendencia. Actualmente se sabe que los factores exclusivamente genéticos no son los únicos responsables de explicar la heredabilidad de rasgos complejos (Pollak & Weber-Stadlbauer, 2020). Algunos de los ejemplos de exposiciones que generan efectos heredables en la descendencia son: 1) la exposición a disruptores endócrinos (por ejemplo el vinclozolin), 2) malnutrición (como la dieta alta en grasa), 3) experiencias de vida que pueden ser negativas (como el estrés traumático) o positivas (como el enriquecimiento social), y 4) enfermedades de los parentales (Jawaid & Mansuy, 2019).

Recientemente, estudios en humanos y en ratones sugieren que los factores de riesgo asociados al desarrollo de enfermedades pueden ser heredados a las siguientes generaciones a través de mecanismos epigenéticos (Klengel et al., 2016). Actualmente se está estudiando cuál podría ser la contribución de la herencia intergeneracional y transgeneracional en diferentes enfermedades, incluidos los desordenes psiquiátricos.

La **herencia intergeneracional** ocurre cuando los efectos producidos por la exposición de los parentales (F0) pasa a la siguiente generación (F1). En este caso, el agente al que los padres son expuestos puede afectar directamente sus células germinales o a los fetos en el caso de tratarse de una hembra preñada. Si la exposición de las células germinales ocurre antes de la concepción, es de esperar que los efectos se observen en la descendencia F1 (Figura I.1.B). Además, cuando la exposición se da en una hembra preñada, puede ocurrir que afecte a las células germinales de los fetos en desarrollo, de manera que en este caso particular puede existir herencia intergeneracional tanto si el efecto se observa en la F1 (cuando el efecto fue sobre células somáticas del feto) como si se observa en la F2 (si el efecto fue en la gametas del feto en desarrollo) (Figura I.1.A). En ambos casos se habla de herencia intergeneracional ya que la exposición al agente ocurre directamente sobre las gametas de los parentales o del feto en desarrollo.

Por otro lado, se habla de una **herencia transgeneracional** cuando los efectos de la exposición de los parentales perduran en las siguientes generaciones, las cuales no han sido expuestas directamente al agente. Esto se observa cuando se expone a un parental masculino o femenino (F0) antes de la concepción y sus efectos se observan en la F2 o generaciones subsiguientes (Figura I.1.B). En cambio, si la expuesta es una hembra preñada, y por lo tanto también el feto en desarrollo, hablamos de herencia transgeneracional cuando sus efectos se observan en la F3 y generaciones subsiguientes (Figura I.1.A). Distintos mecanismos epigenéticos han sido propuestos como los vectores para que ciertos rasgos puedan ser heredados a las siguientes generaciones (Bohacek & Mansuy, 2013).

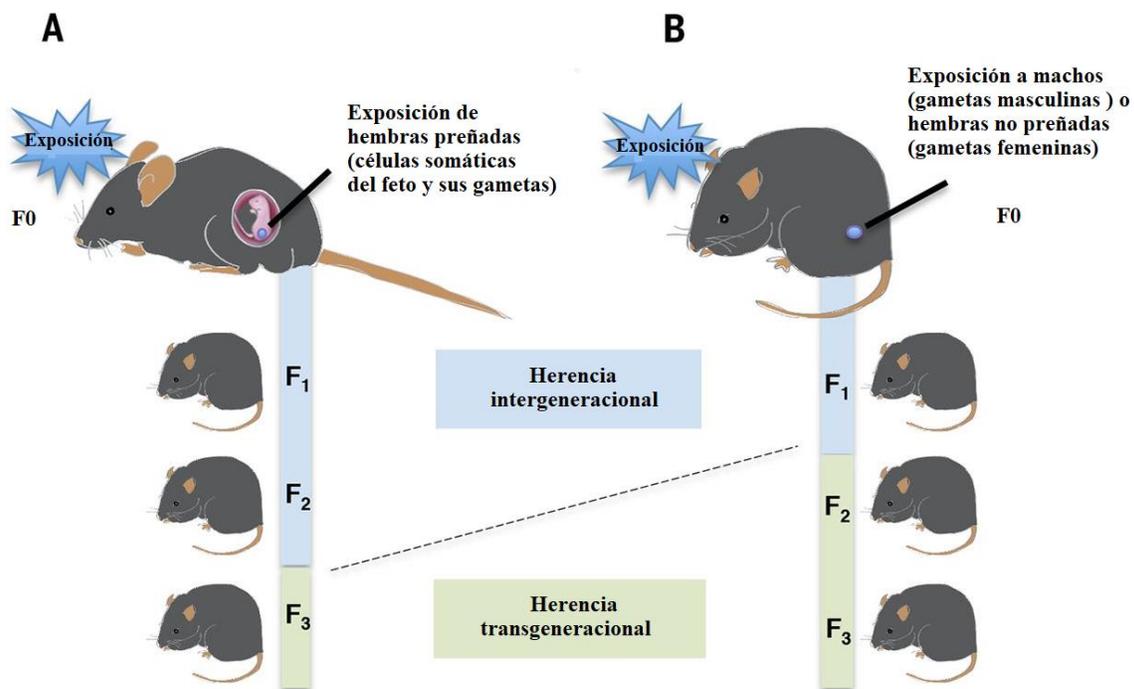


Figura I.1. Modelos de herencia intergeneracional y transgeneracional (adaptado de Siklenka et al., 2015). La exposición de hembras preñadas (F0) a diferentes factores ambientales puede alterar las células somáticas y las gametas del feto en desarrollo. En el caso de que la exposición sea en una hembra preñada, se considera herencia intergeneracional cuando los efectos se observan en la F1 y/o en la F2, ya que las gametas que dan origen a la F2 han sido expuestas *in utero* al agente. Sin embargo, si el efecto se observa en la F3 se considera herencia transgeneracional, ya que la F3 en ese modelo es la primera generación en la que se observa el efecto en ausencia a una exposición directa al agente (A). Si la hembra no está preñada, y el efecto del agente es sobre las gametas femeninas, éste puede derivar en un efecto sobre la F1, siendo esta situación considerada herencia intergeneracional. En esta situación si el efecto se observa en la F2, es considerado herencia transgeneracional ya que en esta generación se observaría un efecto, pero el agente no estaría

actuando directamente sobre ella. Este mismo razonamiento es considerado en el caso de que la exposición sea en el parental masculino y se vean afectadas sus gametas (B).

Lo planteado hasta al momento parece demostrar que no hay una única causa que nos permita explicar la etiología del autismo. Y que más estudios serán necesarios para dilucidar cuál es la contribución de cada uno de los factores (genéticos, epigenéticos, ambientales y sus interacciones) en la etiología del autismo.

I.3. Neuropatología del autismo

El DEA presenta una gran y diversa complejidad clínica asociada a la multitud de sistemas implicados en el funcionamiento del sistema nervioso central y su interacción con otros sistemas. Desde la comprensión de que el autismo tiene bases biológicas, muchos estudios se han abocado a comprender las alteraciones presentes en el cerebro de los individuos con DEA.

Una de las alteraciones neuroanatómicas más reportadas en el DEA es el aumento del tamaño del cerebro (Fidler et al., 2000). Ya a mediados de 1943 Kanner describe en su publicación que un porcentaje de sus pacientes presentaban macrocefalia (Kanner, 1943) y desde entonces numerosos estudios se centraron en la medición del volumen del cerebro en niños autistas a partir del registro de la circunferencia craneal. Estos trabajos revelaron que los niños presentaban un crecimiento acelerado de su volumen cerebral durante su infancia temprana (desde el primer año y hasta los 4 años de vida), el cual luego se enlentecía (Lainhart et al. 1997, Courchesne et al., 2001, Aylward et al., 2002, Amaral et al., 2008). Estudios realizados a partir de neuroimágenes han propuesto que esto podría ser explicado por un aumento en la cantidad de sustancia blanca (Herbert et al., 2003). Otros autores sugirieron que este aumento del volumen cerebral podría estar asociado a una mayor tasa de crecimiento de las neuronas y la glía, a un aumento en el tamaño celular, a un excesivo número de minicolumnas, e incluso a una insuficiente poda sináptica del árbol dendrítico (Bailey et al., 1998, Courchesne et al., 2003).

Entre las regiones cerebrales más consistentemente identificadas como alteradas en el DEA, se encuentran la corteza prefrontal y el cerebelo. Por otro lado, además de las alteraciones neuronales se han detectado cambios en la fisiología de la glía y en el estado del sistema inmunológico, siendo el DEA relacionado con un estado neuroinflamatorio.

I.3.1. Alteraciones de la corteza en el DEA

La corteza, en particular la corteza prefrontal, presenta un rol importante en el comportamiento social, las emociones, el aprendizaje, la comunicación y la memoria. Es por este motivo que se ha estudiado extensamente esta estructura, identificando alteraciones en la organización de la corteza en pacientes con DEA. Bailey et al. (1998) reportaron que el ancho de la corteza de estos pacientes se encontraba aumentado, además de observar un aumento en la densidad neuronal cortical y presencia de neuronas en la capa molecular, así como patrones de organización celular laminares irregulares. Asimismo, observaron un aumento de neuronas presentes en la sustancia blanca, y sustancia gris localizada ectópicamente

Estudios posteriores se centraron en las minicolumnas corticales. Las minicolumnas son una forma de organización neuronal que permite procesar las diferentes categorías de información y que están formadas por neuronas, axones mielinizados del tálamo y axones de otras áreas de la corteza. Casanova et al. (2002) han reportado alteraciones en la topología de estas minicolumnas que incluyen un número aumentado de las mismas, además de una menor compactación y cantidad de células por minicolumna.

Otro rasgo saliente reportado en la corteza de pacientes con DEA es el aumento en la densidad de espinas dendríticas en la capa II de las neuronas piramidales corticales (Hustler & Zhand, 2010).

I.3.2. Alteraciones cerebelares

El cerebelo se encuentra situado detrás de la protuberancia y el bulbo, conectado con el tronco encefálico. En el cerebelo se distingue el vermis en la línea media y dos hemisferios cerebelares que se localizan lateralmente (Figura I.2.A). Además está dividido por surcos transversales en los lóbulos anterior, posterior y floculonodular (Figura I.2.B). El cerebelo está dividido además en los lóbulos I a X. En humanos el lóbulo VII está subdividido en el hemisferio en Crus I, Crus II y VIIB, mientras que el lóbulo VIII se subdivide en el lóbulo VIIIA y VIIB.

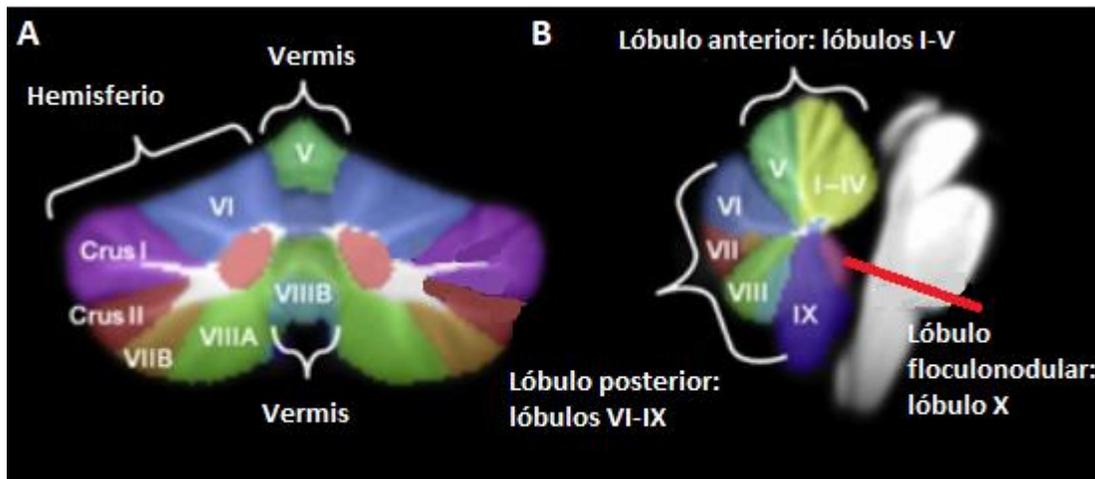


Figura I.2. Esquemas de la anatomía cerebelar humana (adaptada del Atlas de Diedrichsen et al., 2009). En el esquema A se indica una vista interna del cerebelo y en B una vista lateral. Amarillo: lóbulos I-IV, verde: lóbulos V, azul: lóbulos VI, violeta: lóbulos VII (Crus I), rojo: lóbulos VII (Crus II), naranja: lóbulos VII (VIII B), verde claro: lóbulos VIII (VIII A), verde agua: lóbulos VIII (VIII B), violeta oscuro: lóbulos IX, violeta: lóbulos X (sólo se ve en el esquema lateral).

Anatómicamente el cerebelo está constituido por una corteza cerebelar externa de sustancia gris, la cual rodea a la sustancia blanca localizada más internamente. En la sustancia blanca se encuentran distribuidos los núcleos profundos (núcleos fastigio, interpósito y dentado). La corteza cerebelar presenta 3 capas: la capa molecular que es la más externa, la capa de células de Purkinje (CPs) y la capa de células granulares dispuesta más internamente (Figura I.3).

La capa granular está constituida por una gran densidad de células granulares junto con interneuronas, que incluyen principalmente a las células de Golgi, pero también pueden encontrarse en esta región a las células de Lugaro y las células en cepillo unipolar. Los axones de las células granulares se dirigen a la capa molecular y se bifurcan formando lo que se conoce como las fibras paralelas. Por otro lado, la capa de CPs está formada por los somas de estas células que junto con las células de la glía de Bergmann (un tipo de neuroglia presente en el cerebelo) forman una monocapa. La capa molecular, que es la más superficial, incluye el árbol dendrítico de las CPs, los axones ascendentes de las células granulares, interneuronas inhibitorias (células estrelladas y células en cesta) y las fibras paralelas que corresponden a axones de las células granulares (Roostaei et al., 2014).

El cerebelo presenta dos aferencias muy estudiadas: las fibras musgosas y las fibras trepadoras. Las fibras musgosas transmiten información al cerebelo desde núcleos del

tronco encefálico y la médula, y establecen sinapsis con las células granulares. Mientras que las fibras trepadoras se originan en la oliva inferior (un subnúcleo del tronco encefálico) y llegan hasta las CPs con quienes establecen contacto (Apps & Garwicz, 2005).

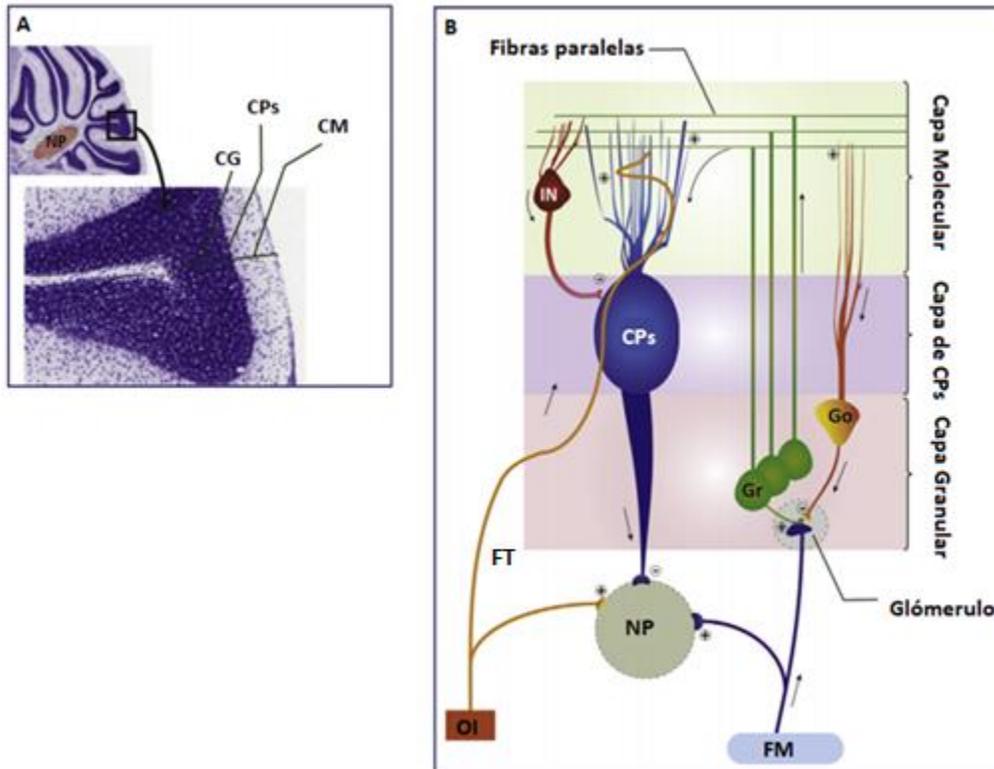


Figura I.3. Sección histológica del cerebelo de ratón (A) y esquema de la corteza cerebelar y el circuito cerebelar básico (B) (adaptada de Roostaei et al., 2014). En A se observa un corte sagital del cerebelo de ratón teñido con la tinción de Nissl a la altura del vermis, donde se aprecia la corteza cerebelar. En el esquema se indica además que los núcleos profundos (NP) se ubican en la sustancia gris. La imagen magnificada de uno de los lóbulos indica la capa molecular (CM), la capa de las células de Purkinje (CPs) y la capa granular (CG). En B, el esquema representa la organización de la corteza cerebelar. IN: interneuronas de la CM, Gr: células granulares, Go: células de Golgi, FM: fibras musgosas, FT: fibras trepadoras, OI: oliva inferior.

El concepto de que el cerebelo está involucrado solamente en funciones motoras está cambiando y cada vez hay más evidencia que sugiere que el mismo cumple un rol en funciones cognitivas, del lenguaje y de la regulación afectiva (Becker & Stoodley, 2013, Broussand, 2014). En este contexto es interesante observar la consistencia en los reportes de alteraciones en el cerebelo en pacientes con DEA, que no se observan en otras regiones del cerebro y que han llevado a publicaciones de consenso de la comunidad (Fatemi et al., 2012).

Gran parte de la información producida con relación a la neuroanatomía del cerebelo de los pacientes con autismo proviene de estudios histológicos. Una de las alteraciones consistentemente observada es la pérdida de las CPs (Bauman & Kemper, 1985, Bailey et al., 1998, Allen, 2005). Sin embargo ésta no es la única alteración reportada en relación a este tipo celular, ya que por ejemplo Fatemi et al. (2002) y Whitney et al. (2008) han observado un tamaño considerablemente menor de las CPs de pacientes con DEA comparadas con las de individuos neurotípicos. En esta línea, Palmen et al. (2004) analizaron la bibliografía presente hasta 2004 y observaron que se reportó una menor densidad o un menor tamaño de CPs en 21 de 29 cerebelos de pacientes con DEA (72%).

Existen diferentes hipótesis respecto al momento del desarrollo en que se produce la pérdida de las CPs en el DEA. Kemper & Bauman (1993) propusieron que la pérdida es cerca de la semana 30 de gestación, mientras que Whitney et al. (2009) proponen que esto ocurre posteriormente, incluso en el período postnatal. Whitney et al. (2009) analizaron la densidad de las células que inervan las CPs (células en canasta y células estrelladas) por CPs en el cerebelo de pacientes autistas y neurotípicos, y no encontraron diferencias, por más que observaron un número reducido de CPs. En base a estos resultados, propusieron que la pérdida de CPs se produce luego de que éstas migran a la localización esperada.

Otra de las características neuroanatómicas cerebelares más observada en los pacientes con DEA son alteraciones en el tamaño cerebelar, en particular las sustancias gris y blanca (Courchesne et al., 2001), y en los lóbulos cerebelares (Courchesne et al., 1988, Allen, 2005). Stanfield et al. (2008) han observado que los pacientes con autismo, durante su infancia temprana, tienen un tamaño cerebelar mayor que seguramente responde al aumento del volumen cerebral de estos pacientes que describimos en la sección I.5.1. Por otro lado, estudios realizados por Courchesne et al. (1988) observaron una hiperplasia de los lóbulos VI y VII en pacientes con autismo. De manera similar, Kaufmann et al. (2003) y Webb et al. (2009) también reportaron una reducción del tamaño del vermis. Si bien la hipoplasia en el lóbulo VI/VII también puede ser observada en otras patologías como en síndrome de Down o X Frágil, en el trabajo de Kaufmann et al. (2003) se demostró que existe una fuerte asociación entre la reducción del lóbulo VI/VII y el autismo idiopático.

En un trabajo más actual, D'Mello et al. (2015b) realizaron mediciones de la sustancia gris y del volumen de los lóbulos cerebelares en 35 niños con DEA y 35 niños

con desarrollo típico. Mediante correlaciones entre las características estructurales del cerebelo y el grado de la sintomatología observada en los pacientes, reportaron una reducción de la sustancia gris de la región derecha cerebelar Crus I/II (esta región es próxima al lóbulo VII, pero localizada en el hemisferio), la cual correlaciona con los síntomas comportamentales. Esta región es importante ya que presenta conectividad estructural y funcional con la región fronto-parietal del cerebro, otra región también asociada a la sociabilidad.

Otra de las alteraciones observadas en pacientes con DEA son signos de neuroinflamación cerebelar crónica, que será desarrollado en profundidad en la sección I.5.3. Además, es llamativo que muchos genes candidatos para autismo cumplen un rol importante en el desarrollo cerebelar [por ejemplo, *SHANK3*, *EN2*, *RORA* (Rogers et al., 2013)].

Las líneas de investigación actuales del cerebelo y el DEA están enfocadas al estudio de las interconexiones y el funcionamiento de las mismas. Rogers et al. (2013) propone que la extensa conectividad que tiene el cerebelo con otras regiones de la corteza permitiría que un mal funcionamiento del cerebelo derive en el amplio espectro de síntomas que se observa en el DEA. Se ha reportado la interconexión del cerebelo con regiones que regulan la atención, el movimiento, las sensaciones, el lenguaje y el procesamiento social (D`Mello & Stoodley, 2015a).

El estudio de modelos animales ha contribuido a entender el posible rol del cerebelo y las CPs en el DEA. Por ejemplo, se ha asociado la pérdida de CPs con la expresión de comportamientos repetitivos en ratones (Martin et al., 2010). Animales nulos para el gen *GABRB3* muestran comportamientos relacionados con el DEA (como menor sociabilidad) y presentan atrofia cerebelar (DeLorey et al., 2008). Finalmente, Carta et al. (2019) han demostrado en ratones que existen proyecciones directas, desconocidas hasta el momento, que se dirigen desde los núcleos profundos cerebelares hacia el área tegmental ventral. Ellos proponen que el cerebelo es capaz de regular la sociabilidad y la conducta a partir del circuito de recompensa mediado por la liberación de dopamina.

I.3.3. Alteraciones del sistema inmune en el DEA

El sistema inmune cumple la función de defensa del organismo a través de la identificación y eliminación de agentes que representen un peligro. Éstos pueden ser agentes externos, como patógenos, pero también internos, como las células tumorales. Este sistema está formado por diferentes tipos celulares cuyos nombres pueden variar según el tipo de tejido, pero en líneas generales está constituido por células fagocíticas como los macrófagos, células presentadoras de antígenos, linfocitos T, B y *Natural killers* (NK). Además, el sistema inmune es coordinado y actúa a través de muchas de las moléculas que estas células producen: anticuerpos, citoquinas, quimioquinas y moléculas del sistema de complemento.

La respuesta inmunológica presenta mecanismos de inmunidad innata y adaptativa. La respuesta inmune innata es una reacción inflamatoria inespecífica, que se caracteriza por la migración de las células del sistema inmune al sitio de infección y un aumento de la permeabilidad vascular para acceder a la zona afectada. Según el tipo de agente infeccioso las células que pueden participar en la respuesta inmune innata son macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastocitos y células dendríticas. Y, en función del tipo celular que participe, su respuesta suele ir acompañada de un aumento en la secreción de moléculas como citoquinas, quimioquinas e interferones.

Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa se inicia cuando las células presentadoras de antígenos reconocen un agente extraño en tejidos periféricos. Estas células van a procesar y exponer antígenos a los linfocitos T presentes en los ganglios linfáticos, induciendo una respuesta que va a ser específica para ese agente. La activación de la respuesta inmune adaptativa lleva a un aumento de los linfocitos T y B, los cuales además de eliminar al agente generan memoria inmunitaria en el organismo.

Las respuestas del sistema inmune son principalmente coordinadas por la secreción de las citoquinas. Las citoquinas son moléculas proteicas de 15-25 kDa, secretadas por monocitos, macrófagos y linfocitos. Estas moléculas participan en la recuperación de la homeostasis en situaciones de inflamación, infección, y/o alteraciones inmunológicas (Nathan, 2002). Anteriormente se las clasificaba a las citoquinas como pro-inflamatorias o anti-inflamatorias según los procesos que facilitaban, sin embargo hoy se las considera

moléculas pleiotrópicas, ya que la misma molécula puede cumplir funciones diferentes en distintos blancos. Dentro de las citoquinas clasificadas típicamente como pro-inflamatorias se encuentran la IL-1 β (interleuquina 1 β), la IL-6 (interleuquina 6) y el TNF- α (factor de necrosis tumoral α). Mientras que la IL-4 (interleuquina 4) y la IL-10 (interleuquina 10) son conocidas típicamente como anti-inflamatorias.

Son pocos los tejidos del cuerpo humano que presentan un aislamiento parcial de las células y moléculas que circulan por la sangre. El sistema nervioso es uno de los tejidos que posee un “privilegio inmune”, entendido como la ausencia de una respuesta inflamatoria intensa en el sitio. Este privilegio inmune es mantenido gracias a dos barreras: la barrera de los plexos coroideos que separa la sangre del líquido cefalorraquídeo, y la barrera hematoencefálica (BHE) que separa la sangre del parénquima cerebral (De Bock et al., 2014). La base anatómica de la BHE está constituida por una capa de células endoteliales unidas por uniones estrechas, que hacen que esta barrera presente una baja actividad pinocítica. Las células endoteliales, junto a los pericitos y los astrocitos, forman una unidad funcional llamada unidad neurovascular (Muldoon et al., 2013). Por otro lado, los plexos coroideos están formado por capilares fenestrados situados dentro del estroma, recubiertos por células epiteliales dispuestas en una monocapa (Demeestere et al., 2015).

El privilegio inmune del sistema nervioso se fundamenta principalmente en: 1) una permeabilidad limitada a anticuerpos, mediadores y células del sistema inmune que circulan periféricamente; 2) ausencia de vasos linfáticos que drenen antígenos a la periferia; 3) escasez de células dendríticas; y 4) niveles bajos de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (Muldoon et al., 2013). Por más que el sistema nervioso se considera aislado del sistema periférico por estos mecanismos, en ciertas condiciones como lesión, inflamación o enfermedad, las células del sistema inmune, las moléculas pro y anti-inflamatorias y otras proteínas periféricas son capaces de atravesar la barrera y acceder al parénquima cerebral (Galea et al., 2007, Muldoon et al., 2013, Matta et al., 2019).

Por otro lado, la inflamación del sistema nervioso o neuroinflamación es una respuesta fisiológica que está mediada principalmente por la activación y la proliferación de dos tipos de células gliales presentes en el sistema nervioso central: la microglía y los astrocitos (Matta et al., 2019). Esta actividad sostenida surge luego de una infección, lesión o enfermedad, por ejemplo durante un proceso desmielinizante o neurodegenerativo. En

condiciones normales la respuesta inflamatoria se autolimita una vez que la noxa ha sido eliminada o el tejido reparado. Sin embargo, diversos estudios proponen que la actividad innecesaria y prolongada en ausencia de una noxa puede derivar en un estado de neurotoxicidad como el que se reporta en múltiples patologías del sistema nervioso central (Dheen et al., 2007). En este sentido, ya son numerosos los estudios que reportan que un mal funcionamiento del sistema inmune podría estar asociado al desarrollo de enfermedades psiquiátricas o neurodegenerativas (Onore et al., 2012, Theoharides et al., 2013). Así, tanto la microglía como los astrocitos pueden afectar el funcionamiento de las neuronas y así afectar la conducta.

La **microglía** es un conjunto de células residentes del cerebro que regulan su desarrollo, participan activamente en el mantenimiento de las redes neuronales y en procesos de reparación del cerebro. Además cumplen un rol en la respuesta inmunológica cerebral, actuando como macrófagos (Colonna & Butovsky, 2017). Estas células presentan la capacidad de modificar su morfología y también su respuesta ante los cambios en su ambiente.

Cuando una noxa se presenta en el sistema nervioso central la microglía entra en contacto con citoquinas, PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) y DAMPS (*damage-associated molecular patterns*). Entonces estas células sufren una serie de cambios donde pasan de un estadio de reposo a una microglía reactiva, capaz de montar una respuesta inflamatoria y secretar citoquinas pro-inflamatorias, además de ser necesarias para remover la noxa o reparar el tejido a través de un mecanismo fagocítico (Kreutzberg, 1996, Glass et al., 2010, Kigerl et al., 2014). En particular, la respuesta inflamatoria es mediada por citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF e IL-6, además de por óxido nítrico y aniones superóxido (Glass et al., 2010, Hong et al., 2016).

La microglía puede ser identificada con marcadores específicos como IBA-1 (*Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), CD45 (*cluster of differentiation 45*), o CD11 (*cluster of differentiation 11*). Además, se puede clasificar a las células microgliales en 4 tipos según su fenotipo (Figura I.4): (1) microglía ramificada, que presenta un pequeño soma y muchos procesos ramificados (también llamada microglía en reposo o microglía de tipo 1); (2) microglía con somas más elongados y procesos muy ramificados (microglía de tipo 2); (3) microglía con un soma ameboide y pocas ramificaciones (microglía de tipo 3 o

reactiva); y (4) microglía ameboidea con una o dos ramificaciones (microglía de tipo 4 o microglía activada) (Kreutzberg, 1996, Torres-Platas et al., 2014).

Actualmente se propone que un funcionamiento anormal en la activación de la microglía o la producción de citoquinas pro-inflamatorias tendrían un rol central en el desarrollo de enfermedades psiquiátricas o neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, el DEA, la depresión, la adicción y la esquizofrenia (Hong et al., 2016).

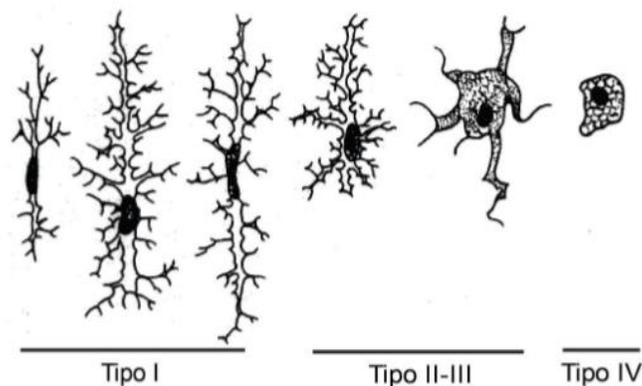


Figura I.4. Diferencias morfológicas de la microglía según su grado de activación (adaptado de Kreutzberg, 1996).

Los **astrocitos** son, junto a las neuronas, las células más abundantes del sistema nervioso. Estas células tienen una morfología que recuerda a una estrella, de donde proviene su nombre, tienen origen ectodérmico y cumplen numerosas funciones en el sistema nervioso central. Dado que los astrocitos presentan un contacto estrecho con células residentes del sistema nervioso central, como la microglía, oligodendrocitos y neuronas, son esenciales para el mantenimiento del sistema nervioso: participan en la regulación del pH, en la homeostasis iónica, y brindan un soporte metabólico y trófico a las neuronas. Estas células también tienen un rol en la homeostasis de los neurotransmisores; por ejemplo participan en la transmisión glutamatérgica, ya que controlan la distribución del glutamato extracelular y su reserva (*pool*) dentro de la neurona. Además son esenciales durante la sinaptogénesis y para la maduración de las sinapsis (Verkhratsky & Nedergaard, 2014). También participan en la eliminación de aminoácidos excitatorios cuando se encuentran en exceso (Nedergaard et al., 2002), y en el mantenimiento de la integridad de la BHE (Prat et al., 2001). En cuanto a sus funciones relacionadas con la respuesta inmunológica, forman parte de la BHE, por lo que juegan un rol importante en el tráfico y activación de las células

del sistema inmune y, al igual que la microglía, los astrocitos son células capaces de identificar las señales de peligro que ingresan en el organismo y responder secretando citoquinas, quimioquinas y mediando la respuesta inmune innata y adaptativa (Rosenberg, 2002, Farina et al., 2007). Los astrocitos pueden ser identificados en el cerebro por la expresión del marcador GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), una proteína de la matriz celular.

Tanto las células inmunes que penetran en el parénquima cerebral en situaciones patológicas como la microglía y los astrocitos son capaces de sintetizar y secretar moléculas inflamatorias como las citoquinas y las quimioquinas. Las citoquinas, cuando actúan en el cerebro, tienen la capacidad de modular el comportamiento, por ejemplo pueden producir sueño, fiebre, comportamiento relacionado con la enfermedad (*sickness behaviour*), afectar el humor, la consolidación de la memoria, los procesos cognitivos y la respuesta neuroendocrina ante el estrés (Prieto-Moreno & Rosenstein, 2006). Así, el estado neuroinflamatorio puede influir directamente en el funcionamiento neuronal y en la conducta.

Se han descrito numerosas anomalías en el sistema inmunológico de los pacientes con DEA. Estas alteraciones involucran a la inmunidad innata y adaptativa, y pueden presentarse tanto en periodos prenatales como postnatales. Durante el periodo prenatal se han descrito dos tipos de insultos que pueden incrementar el riesgo de que la descendencia desarrolle DEA: 1) las infecciones maternas y la activación del sistema inmune materno (MIA) en respuesta a estas infecciones (la cual se desarrolla en detalle en sección I.5.2); y 2) la presencia de anticuerpos maternos que tienen de blanco diferentes moléculas del cerebro fetal (Meltzer & Van de Water, 2017). En la etapa postnatal uno de los principales focos de estudio en los pacientes con DEA han sido las poblaciones celulares del sistema inmune. Las alteraciones encontradas son variadas e incluyen niveles aumentados de activación de las células NK (Enstrom et al., 2009), y una respuesta aumentada de los monocitos ante la unión de un ligando al receptor Toll (Enstrom et al., 2010), entre otras.

Las alteraciones en el sistema inmune pueden perdurar a lo largo de la vida, y se han descrito distintas formas en los pacientes con DEA. Por un lado, se ha reportado que pacientes con autismo pueden presentar una autoreactividad del sistema inmune adaptativo

hacia moléculas del sistema nervioso central, generando anticuerpos contra proteínas cerebelares, de la corteza prefrontal, del putamen, y del caudado (Goines et al., 2011, Meltzer & Van de Water, 2017). Por otro lado, se ha descrito que los pacientes con DEA tienen alteraciones en los niveles de citoquinas a nivel periférico. Se han observado en el plasma de pacientes con DEA niveles disminuidos de la citoquina anti-inflamatoria TGF- β y niveles aumentados del factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 (Ashwood et al., 2011). Finalmente, algunos autores proponen que muchos de los malestares gastrointestinales que padecen los pacientes son consecuencia de un estado inflamatorio crónico a nivel intestinal que aumenta la permeabilidad por una disrupción de la barrera de la mucosa (Ashwood et al., 2006, Torrente et al., 2002).

Actualmente parece haber consenso en cuanto a que las alteraciones del sistema inmune pueden derivar en un estado inflamatorio crónico en el cerebro y desencadenar una respuesta mediada por las células de la glía. Además, muchas de las moléculas inflamatorias que se han descrito como alteradas en DEA pueden cumplir otras funciones relacionadas a la proliferación neuronal, el podado sináptico o la supervivencia (Onore et al., 2012). En el trabajo de Vargas et al. (2005) se encontró que en cerebros *postmortem* de pacientes con autismo existían regiones con una mayor densidad de astrocitos activados en la capa granular y sustancia blanca del cerebelo, el giro frontal medio y el giro cingular anterior de la corteza. Además se reportó un aumento en la activación o reactividad de la microglía principalmente en el cerebelo, en diferentes regiones de la corteza y en la sustancia blanca. Así, concluyeron que los pacientes con autismo estudiados cursaban con procesos de neuroinflamación activos en la corteza, la sustancia blanca y el cerebelo. Morgan et al. (2010) también reportaron alteraciones que van en el mismo sentido: un incremento en la reactividad y densidad de la microglía en la corteza prefrontal dorsolateral. Tetreault et al. (2012) observaron un incremento en la densidad basal de microglía en la corteza visual y la fronto-insular de pacientes con DEA, comparado con pacientes neurotípicos. Finalmente, se reportaron alteraciones en la densidad de astrocitos en la corteza superior frontal, parietal y cerebelar de pacientes con DEA (Laurence & Fatemi, 2005).

Estos resultados indican un nexo estrecho entre la reactividad de las células gliales en diferentes regiones del cerebro y el DEA, que también puede observarse en **modelos animales de DEA**. En nuestro laboratorio, Lucchina & Depino (2014) demostraron que en el modelo de autismo generado por la inyección prenatal de VPA, los animales recapitulaban el fenotipo de activación crónica de las células gliales en el hipocampo y el cerebelo. Bronzuoli et al. (2018) también encontraron signos de neuroinflamación en el cerebro de ratas tratadas prenatalmente con VPA. Ellos evaluaron tanto la densidad de células GFAP-positivas, así como los niveles de este mensajero en ratas de diferentes edades y en diferentes regiones del cerebro. Ellos concluyeron que las alteraciones reportadas son heterogéneas, dependientes de la edad y la región estudiada, siendo más evidentes en la corteza prefrontal y el hipocampo. La alteración en el número de dendritas, la disfunción de las sinapsis y la conectividad neuronal son algunas de las características observadas en el DEA y en modelos animales del desorden. Como la actividad neuronal es modulada por la microglía y los astrocitos, se propone que los procesos inflamatorios anormales mediados por estas células pueden contribuir a las alteraciones del comportamiento observadas en el DEA (Matta et al., 2019).

I.4. Comorbilidades frecuentes en el DEA

Una comorbilidad es definida como la aparición de dos o más formas psicopatológicas o trastornos en la misma persona (Matson & Nebel-Schwalm, 2007). Actualmente el DSM V reconoce que las personas con autismo presentan otros trastornos comórbidos (APA, 2013), y la gravedad del DEA y la calidad de vida no sólo depende de las características propias del desorden, sino que incluye sus comorbilidades (Simonoff et al., 2008). Algunos de los trastornos comórbidos más comunes en personas con autismo incluyen el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), la depresión, la discapacidad intelectual, los trastornos de ansiedad, los trastornos obsesivos compulsivos (TOC), las fobias, y los trastornos de ansiedad generalizados (TAG), entre otros (Lewin et al., 2011, Vasa & Mazurek, 2015, Cervantes & Matson, 2015, Groom et al., 2017, Matson & Williams, 2014, Matson & Nebel-Schwalm, 2007).

Se ha estimado que la tasa de co-ocurrencia entre el DEA y la ansiedad es entre un 11% y un 84% (White & Roberson-Nay, 2009). El trabajo de Simonoff et al. (2008)

reportó, en su muestra de estudio de 112 personas con DEA, que un 42% presentaba un fenotipo ansioso y un 29% presentaba específicamente rasgos de ansiedad social. Unos años más tarde, Van Steensel et al. (2011) informó que el 39% de los jóvenes con autismo también presentaba por lo menos uno de los desórdenes de ansiedad descritos en el DSM V, siendo los trastornos comórbidos más frecuentes las fobias (29.8%), los TOC (17.4%), y los trastornos de ansiedad social (16.6%). También se ha reportado que los síntomas de la ansiedad parecen ser mayores en la personas con autismo que no tienen alteraciones cognitivas o del lenguaje tan severos, lo que comúnmente se llama autismo de alto funcionamiento (Chalfant et al., 2007).

Por otro lado, la depresión presenta una prevalencia de 2% en niños con autismo, aunque en niños con el síndrome Asperger se ha reportado una tasa de comorbilidad de un 30% (Matson & Nebel-Schwalm, 2007). Sin embargo, hay autores como Ghaziuddin et al. (2002) que señalan que este tipo de comorbilidad puede estar subestimada debido a la falta de herramientas diagnósticas para pacientes con DEA. El diagnóstico de la ansiedad o de la depresión puede ser difícil de llevar a cabo en esta población debido al déficit de comunicación que caracteriza a los individuos con DEA, ya que pocos individuos con DEA expresan directamente sus sentimientos. También ocurre que hay superposición de síntomas entre las comorbilidades y el DEA. Por ejemplo, la irritabilidad, la evasión y el miedo son síntomas compartidos entre el DEA y la ansiedad. La depresión también puede presentar signos de irritabilidad, falta de interés y un estado de tristeza que, según el grado de autismo que presente la persona, puede ser difícil de diagnosticar. Estos factores hacen que el diagnóstico de las comorbilidades dentro del DEA sea aún más complejo (Grondhuis & Aman, 2012, Chandrasekhar & Sikich, 2015).

El estudio de las comorbilidades es importante ya que los propios síntomas de la ansiedad o la depresión pueden agravar las dificultades interpersonales que ya de por sí presentan los pacientes con DEA (Grondhuis & Aman, 2012, DeFilippis, 2018) y esto pueda añadir dificultades adicionales a la calidad de vida de las personas con autismo. Además, comprender las comorbilidades puede ayudar a plantear hipótesis acerca de los mecanismos neurofisiológicos subyacentes al DEA.

I.5. Modelos animales de autismo

Wessler definió un modelo animal como “un organismo vivo en el que se puede estudiar la biología o el comportamiento, así como procesos patológicos inducidos o espontáneos, ya que el fenómeno en uno o más aspectos se parece al mismo fenómeno en humanos” (Wessler, 1976). Se acepta que un buen modelo animal debe satisfacer tres criterios: validez aparente, validez de constructo y validez predictiva. Se han desarrollado numerosos modelos en ratones para estudiar el autismo (por ejemplo, el modelo de ácido valproico, el modelo de activación inmune materna, mutantes de genes identificados en individuos con autismo como *SHANK3*, la cepa endocriada BTBR, entre otros), cada uno con sus particularidades.

Que un modelo presente **validez aparente** quiere decir que existen similitudes entre el fenotipo del ratón y el desorden en humanos. En el caso de los modelos en ratones para autismo es esperable que éste recapitule los síntomas centrales del DEA, como son las alteraciones en la comunicación y la sociabilidad, así como la presencia de comportamientos repetitivos. Es importante señalar que en líneas generales los modelos utilizados para estudiar trastornos psiquiátricos presentan limitaciones para recapitular todo el espectro fenotípico (Arguello & Gogos, 2006) y en lo particular, los modelos de autismo en ratón pueden recapitular solamente una parte de la etiología por lo que son considerados reduccionistas (Belzung et al., 2005). Por otro lado, que el modelo presente **validez de constructo** quiere decir que es de esperar que la causa biológica que genera el desorden en humanos también la genere en el ratón. Por ejemplo, cuando se conoce que la mutación de un cierto gen está asociada al autismo, el modelo generado por la misma mutación en el ratón se considera que presenta validez de constructo, al menos para ese tipo particular de DEA. Por último, que un modelo presente **validez predictiva** significa que es posible la extrapolación de las manipulaciones del comportamiento en el modelo animal a los humanos. Esto puede implicar dos cosas: 1) que el modelo responda de la misma manera que los humanos cuando se expone a ciertas drogas; y 2) que, en el desarrollo de una droga, el modelo es útil para identificar medicamentos que puedan ser beneficiosos para los humanos (Mabunga et al., 2015).

Como hemos mencionado previamente, son muchos los factores etiológicos observados en el DEA. Estos pueden ir desde cambios en la expresión de genes, mutaciones, alteraciones en componentes epigenéticos, exposición prenatal a agentes tóxicos o drogas, la edad paterna, etc. Por lo que son necesarios buenos modelos animales para determinar los mecanismos de la patología y para desarrollar tratamientos efectivos. En esta sección analizaremos diferentes modelos en ratones, que son comúnmente utilizados para el estudio del DEA.

Según Belzung et al. (2005) los modelos de autismo en ratones pueden ser clasificados en 4 categorías:

1) mutantes que expresan alteraciones en neuropéptidos involucrados en el comportamiento social (por ejemplo, ratones mutantes para los receptores de vasopresina, oxitocina u opioide);

2) modelos ambientales que recapitulan exposiciones fetales (como por ejemplo la exposición a talidomina, a anticonvulsivos como al VPA, o a infecciones neonatales);

3) modelos obtenidos luego de lesiones en el cerebro, en áreas donde se han reportado alteraciones en pacientes con DEA, como en el cerebelo, la amígdala o la corteza prefrontal; y,

4) modelos de enfermedades genéticas asociadas con DEA (por ejemplo, ratones nulos para el gen *FMRI* que modelan el síndrome del X Frágil).

A continuación vamos a profundizar en dos modelos ambientales para el estudio del DEA: el modelo de exposición prenatal al ácido valproico (VPA) y el modelo de activación inmune materna (MIA), ya que estos son los que están más relacionados con las hipótesis de nuestro trabajo.

I.5.1. Modelo de exposición prenatal al ácido valproico (VPA)

Como mencionamos previamente, la exposición durante el embarazo al anticonvulsivante VPA incrementa el riesgo de que los hijos desarrollen el síndrome de valproato fetal, el cual recapitula ciertas características conductuales parecidas a las observadas en pacientes con autismo. Esta observación clínica proporcionó la evidencia para desarrollar un modelo farmacológico de autismo asociado a una exposición dentro del

ambiente uterino (Rouillet et al., 2013). El modelo VPA fue creado por Rodier et al. (1996), quien expuso a ratas preñadas a una dosis de 350 mg/Kg de VPA. Dado que los estudios conductuales en roedores expuestos prenatalmente al VPA mostraron alteraciones comportamentales similares a las observadas en pacientes con DEA, desde entonces diferentes variantes de este modelo han sido validadas y utilizadas con el fin de determinar los mecanismos que subyacen al desorden y buscar opciones terapéuticas.

Schneider & Przewlocki (2005) fueron los primeros en describir en profundidad el comportamiento de los animales de este modelo. Ellos inyectaron una dosis única de VPA en ratas hembras preñadas que cursaban el día de gestación (DG) 12.5 y reportaron que las crías machos presentaban: 1) alteraciones de la sociabilidad, expresadas como una disminución en el número de interacciones sociales, así como una mayor latencia para la realización de las mismas; 2) hiperactividad locomotora y comportamientos repetitivos; 3) alteraciones en el sistema sensorial, representadas por una menor sensibilidad al dolor y mayor sensibilidad a estímulos no dolorosos; y 4) déficit de atención, que se manifestó en una menor inhibición del prepulso acústico (Schneider & Przewlocki, 2005).

El modelo VPA cumple con los criterios mencionados previamente para ser considerado un buen modelo animal para el estudio del DEA. Por un lado, posee validez aparente, ya que comparte los dos síntomas principales característicos del DEA: 1) déficit en la interacción y comunicación social y 2) presencia de comportamientos restrictivos y repetitivos. También comparten el agente etiológico, es decir, presenta validez de constructo. Finalmente, el criterio de validez predictiva probablemente sea el más cuestionado debido a la escasez de tratamientos efectivos para este desorden (Buitelaar, 2003, Mabunga et al., 2015).

En la última década ha aumentado el número de grupos de investigación que usa el modelo de exposición prenatal o postnatal al VPA para el estudio del DEA (Mabunga et al., 2015). En nuestro laboratorio trabajamos con el modelo VPA generado a partir de una única inyección subcutánea de una dosis de 600 mg/Kg en el DG 12.5 en ratones. Lucchina & Depino (2014) han validado el modelo en una cepa híbrida, cruce entre hembras BALB/c y machos C57BL/6J. En este caso el modelo recapituló las características observadas en el DEA de reducción de la sociabilidad. También describieron que los animales presentaban

un aumento en el comportamiento asociado a la ansiedad, que es una de las comorbilidades más comunes asociadas al DEA. Además, reportaron un aumento en la activación de las células gliales en el cerebelo y una respuesta inflamatoria exacerbada ante un estímulo inflamatorio, que es otra de las características observadas en algunos pacientes con autismo, como mencionamos previamente. Nuestro grupo también validó el modelo en otra cepa de ratones (CrIFcen: CF1), utilizando el mismo diseño experimental (una inyección subcutánea de 600 mg/Kg en hembras preñadas el DG 12.5). En su trabajo, Campolongo et al. (2018) describieron que los animales presentaban los síntomas característicos del DEA como reducción en la sociabilidad y aumento de los comportamientos repetitivos. Adicionalmente encontraron que los animales presentaban signos de depresión, que suele ser otra de las comorbilidades asociadas al DEA. Otras alteraciones conductuales observadas fueron: alteración en la respuesta olfatoria, el cual es un sentido muy relacionado con la sociabilidad en ratones, y una reducción en la locomoción (Campolongo et al., 2018).

Ya que el autismo es un desorden de etiología multifactorial, ningún modelo, incluido el modelo VPA es capaz de recapitular todas las características observadas en pacientes con DEA. Sin embargo, confiamos en la validez de este modelo para recapitular ciertos aspectos de la etiología del DEA y representar una herramienta útil para poder describir los mecanismos involucrados en el desorden.

Como mencionamos en la sección I.2.3, las alteraciones en los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de genes resulta ser un nuevo abordaje de investigación de la etiología multifactorial del DEA. Se ha reportado que el VPA presenta la capacidad de inhibir a las deacetilasas de histonas (HDAC), induciendo cambios estructurales en la cromatina que no permiten la correcta interacción con factores de transcripción y con la ARN polimerasa, y por lo tanto resultan en la inhibición de la expresión génica (Phiel et al., 2001). Estudios *in vitro* con células embrionarias humanas han demostrado la capacidad del VPA en generar la hiperacetilación de las HDAC (Phiel et al., 2001). Por otro lado, Tung & Winn (2010) administraron VPA a ratonas preñadas en el DG 9 y extrajeron los embriones a 1, 2, 3, 6 y 24 horas post-inyección. Sus resultados demostraron que el VPA generó un incremento en la acetilación de histonas que tuvo un

pico 3 horas post-inyección. Este aumento estuvo acompañado de la metilación en la histona H3lisina4 (H3K4). También se observó un incremento en la acetilación de histonas en el neuroepitelio, el corazón y somitos de los embriones. Estos resultados refuerzan la idea de que el VPA es capaz de producir alteraciones epigenéticas que deriven en malformaciones congénitas y permiten explicar, en parte, algunos de los efectos teratogénicos del VPA.

En la misma línea, Kataoka et al. (2013) utilizó el modelo de VPA, inyectando hembras en el DG 12.5 con VPA o valpromida (un análogo del VPA que no presenta actividad inhibitoria de las HDACs). Ellos demostraron que la exposición prenatal a VPA generaba el fenotipo conductual asociado a autismo, acompañado de una reducción del número de células teñidas con Nissl en las cortezas prefrontal y somatosensorial. Además, reportaron que los animales presentaron un aumento transitorio en la acetilación de histonas acompañado de un aumento de la apoptosis en la neocorteza y una reducción de la proliferación celular en la eminencia ganglionar. Sin embargo, estos efectos tanto sobre la conducta como en la morfología del cerebro no fueron observados cuando los animales fueron inyectados con la valpromida.

Estos trabajos contribuyen a establecer un posible mecanismo de acción del VPA a través de alteraciones epigenéticas que determinan alteraciones moleculares y celulares que, a su vez, resultan en las alteraciones conductuales observadas en los modelos animales.

I.5.2. Modelo de activación inmune materna (MIA)

Como hemos mencionado, otra de las etiologías asociadas al DEA es la activación del sistema inmune materno en sus diferentes formas y mecanismos (Jiang et al. 2016, Lombardo et al., 2018). Chess (1971) fue uno de los primeros en describir este nexo luego de la epidemia de rubeola de 1964. En un estudio en 273 niños con rubeola congénita identificó 10 niños con autismo y 8 niños con “rasgos parciales” de autismo, vinculando por primera vez una enfermedad infecciosa con el DEA.

Diferentes estudios han reportado que la activación del sistema inmune materno genera diferentes desórdenes neurológicos y psiquiátricos, que pueden ir desde la microcefalia observada en los hijos de las madres infectadas con el virus del zika

(Rasmussen et al., 2016) hasta la esquizofrenia (Rapoport et al., 2012) y el autismo (Ploeger et al., 2010). Un estudio bastante citado es el Atladóttir et al. (2010), realizado con el Registro Médico Danés, el cual utilizó la información clínica de los niños nacidos en Dinamarca entre 1980 y 2005. Este estudio incluyó a más de 10000 pacientes diagnosticados con DEA, y encontró una asociación entre la infección viral durante el primer trimestre y el riesgo de autismo. También estableció una asociación, aunque no tan fuerte, entre la infección bacteriana durante el segundo trimestre y el DEA.

La hipótesis de la activación inmune materna fue testeada en modelos animales estimulando la respuesta inmunológica de la madre preñada con diferentes inmunógenos (Meyer et al., 2009). El consenso actual es que las infecciones maternas durante la preñez pueden ser relevantes en el desarrollo de varios desórdenes del sistema nervioso como el DEA, la esquizofrenia o el Parkinson, entre otros (Harvey & Boksa, 2012).

En el contexto de esta tesis es relevante el modelo de MIA que contribuye al desarrollo de la sintomatología asociada al DEA, el cual se genera mediante la inyección de hembras preñadas con un agente mimético viral conocido como PolyI:C (ácido poliriboinosínico-poliribocitidílico). Existen diferentes aproximaciones a este modelo que utilizan dosis variables que van de 1 mg/Kg a 20 mg/Kg, con diferentes rutas de administración y días gestacionales de la inyección, que por lo general son cercanos al DG 12.5 (Careaga et al., 2017). Este modelo ha demostrado presentar validez aparente (ya que los animales desarrollan una conducta que recapitula la observada en el DEA), validez de constructo (ya que las infecciones en mujeres embarazadas incrementan la probabilidad de desarrollar conductas asociadas al DEA en la descendencia) y validez predictiva (ya que algunos tratamientos con drogas antipsicóticas o la terapia antipurinérgica probadas en ratones en el modelo de MIA generan una reducción de los síntomas de manera similar a la observada en humanos y dejan abierta la posibilidad del desarrollo de drogas para tratar algunos tipos de DEA) (Careaga et al., 2017).

Una de las hipótesis actuales en este campo de investigación es que el desarrollo normal del feto necesita un balance específico entre el ambiente materno y el ambiente fetal, y si una infección materna interrumpe este balance se puede alterar el perfil de desarrollo normal del cerebro. Por otro lado, no es necesariamente el agente infeccioso en sí mismo el que genera el perjuicio para el feto, sino que la alteración puede ser consecuencia

de la respuesta fisiológica desarrollada por la madre ante este agente, mediado principalmente por citoquinas maternas. Se propone que es el desbalance mediado por las citoquinas el que podría afectar la funcionalidad del cerebro en desarrollo y contribuir a los desórdenes psiquiátricos en la vida adulta (Minakoba & Wagner, 2018)

El trabajo de Smith et al. (2007) indica que la IL-6 puede ser uno de los mediadores de los efectos del MIA sobre el desarrollo de la cría. Demostraron que la inyección de esta citoquina específica en el DG 12.5 es capaz de producir características conductuales como un déficit en la inhibición de prepulso y la inhibición latente en la descendencia adulta, similares a los efectos de la MIA. Pero lo más sorprendente fue que la coadministración del polyI:C con un anticuerpo antiIL-6, evitó que la descendencia presente el déficit en la sociabilidad, así como en la inhibición del prepulso e inhibición latente descritas en este modelo. Además demostraron en ratones nulos de IL-6 que la inyección materna de PolyI:C no causaba alteraciones en la conducta asociadas a autismo en la descendencia.

Otras citoquinas que han sido asociadas al modelo de MIA e identificadas en individuos con DEA son IL-17a, IL-1 β y TNF- α , entre otras (Minakova & Wagner, 2018).

I.6. Estimulación social temprana y DEA

Hasta la fecha no se ha encontrado un tratamiento farmacológico o terapia que revierta las características principales del DEA. El enfoque actual busca encontrar diferentes tipos de intervenciones en niños y jóvenes que padecen este desorden, con el objetivo de disminuir la sintomatología y mejorar las habilidad cognitivas y sociales (Reichow et al., 2012, Vivanti et al., 2016, Weitlauf et al., 2014). Así, existen diferentes tipos de intervenciones para trabajar el DEA, que se basan principalmente en tres enfoques: estrategias de comunicación, estrategias del desarrollo y uso de herramientas conductuales para mejorar el comportamiento (Mulas et al., 2010).

Uno de estos modelos es “Experiencias de Aprendizaje y Programas Alternativos para Prescolares y Padres” (LEAP, *Learning Experiences: an Alternative Program for Preschoolers & Parents*), el cual ha demostrado mejorar la sintomatología del DEA y el funcionamiento cognitivo, así como también el lenguaje (Strain & Bovey, 2011). El LEAP se caracteriza por ser un programa educativo inclusivo de niños con DEA en aulas con niños de desarrollo típico. El objetivo de esta intervención es mejorar las áreas cognitivas,

emocionales y comunicativas en un contexto de aprendizaje entre pares y con el profesor (Skokut et al., 2008). Según Odom et al. (2010) este es uno de los modelos para el tratamiento del DEA con efectividad demostrada.

Por otro lado, el **ambiente enriquecido** es un término que hace referencia a las mejoras de las condiciones de confinamiento de los animales de laboratorio. Esto puede incluir jaulas más grandes, presencia de objetos, espacios destinados a que los animales puedan jugar y ejercitarse, y en algunos casos puede incluir una mayor cantidad de animales por caja para favorecer las interacciones (Sampedro-Piquero & Begega, 2017). Actualmente, estudios desarrollados en ratones han demostrado que el crecimiento en un ambiente enriquecido, el cual incluye un componente social, tiene efectos que pueden revertir los fenotipos observado en el DEA (Dawson, 2008, Reynolds et al., 2010).

En nuestro laboratorio hemos validado un modelo en ratones de estimulación temprana en el DEA, el cual llamamos modelo de rescate social. En dicho modelo utilizamos un diseño experimental que consiste en realizar destetes específicos (como se desarrolla en el Capítulo V) de modo tal de obtener ratones VPA que se crían con otros ratones VPA, ratones VPA que se crían con ratones control y ratones control que se crían con otros ratones que no estuvieron expuestos al VPA. Demostramos previamente que la estimulación social luego del destete es capaz de revertir los efectos que tiene la exposición prenatal al VPA sobre la sociabilidad (Campolongo et al., 2018).

Hipótesis y Objetivos

Sabemos que el Desorden del Espectro Autista (DEA) produce una sintomatología variable en su gravedad, por lo cual se habla de un espectro. Como describimos en la introducción, el DEA es un desorden multifactorial y el abanico de fenotipos que se observan puede estar asociado a los diferentes factores etiológicos que lo generan, ya sean factores ambientales, genéticos, epigenéticos o la interacción entre ellos. Uno de los factores de exposición ambiental que produce una sintomatología similar al DEA es la **exposición prenatal a VPA**. En nuestro laboratorio trabajamos con el modelo VPA en ratones, el cual recapitula el déficit de sociabilidad, la presencia de comportamientos repetitivos y algunas de las comorbilidades observadas en los pacientes con autismo.

Varias de las alteraciones cerebrales más consistentemente reportadas en pacientes con autismo se encuentran en el **cerebelo**, una estructura que hasta hace poco tiempo había sido estudiada casi exclusivamente en cuanto a sus funciones del control y coordinación de los movimientos. Dentro del cerebelo, una de las regiones más afectadas parece ser el lóbulo VI/VII. Trabajos previos nos llevaron a preguntarnos si en nuestro modelo VPA se recapitulaban algunas de las alteraciones estructurales observadas en el cerebelo de los pacientes con autismo. Esta información sería relevante para poder eventualmente plantear diferentes mecanismos de acción del VPA sobre el cerebelo y establecer la relación entre dichas alteraciones y la conducta. Además, en caso de encontrar alteraciones, podríamos analizar posteriormente si estas tienen alguna influencia sobre otras estructuras cerebrales.

Además, debido a que recientemente se propuso una relación estructural y funcional entre el cerebelo y el circuito de recompensa, decidimos investigar el grado de activación del **área tegmental ventral (VTA)** en los animales de este modelo.

Por otro lado, debido a la estrecha relación que presenta el DEA con las alteraciones en el sistema inmunológico, en particular con la neuroinflamación, nos resultó interesante

profundizar sobre el rol que tiene la **neuroinflamación cerebelar** en la conducta, en particular sobre la sociabilidad. Esto nos ha llevado a preguntarnos si puede un ambiente inflamatorio cerebelar en el lóbulo VI/VII generar una alteración en los niveles de sociabilidad. También nos parece interesante lograr identificar qué tipos celulares son los principales mediadores de esta respuesta. Obtener esta información ayudaría a probar la relación funcional entre la neuroinflamación en el cerebelo y la sociabilidad. También nos preguntamos mediante qué mecanismos moleculares podría estar operando la respuesta inflamatoria.

Esto llevó a plantearnos dos **hipótesis** en cuanto al cerebelo y su rol en la sociabilidad:

- 1) El cerebelo, y en particular el lóbulo VII, juega un rol relevante en la modulación de los niveles de sociabilidad. En particular, animales con niveles reducidos de sociabilidad presentan alteraciones estructurales y/o funcionales en el cerebelo y en regiones que inervan las neuronas cerebelares.
- 2) La neuroinflamación en el cerebelo afecta la función neuronal y resulta en niveles reducidos de sociabilidad, que pueden ser revertidos mediante el tratamiento con anti-inflamatorios sistémicos.

Por otro lado, cada vez hay más estudios que vinculan alteraciones **epigenéticas** con diferentes desórdenes psiquiátricos, incluido el DEA. En este sentido, se ha demostrado que el VPA actúa como inhibidor de las deacetilasas de histonas. Por este motivo, nos preguntamos si el VPA podría estar actuando por mecanismos epigenéticos que pudieran ser heredados a las siguientes generaciones, modulando los niveles de sociabilidad en la descendencia. Además, a partir de observaciones en pacientes con DEA y en el modelo VPA (Campolongo et al., 2018), sabemos que los niveles de sociabilidad pueden presentar mejorías cuando se aplica un diseño de estimulación social temprana. En base a estos antecedentes nos preguntamos si los fenotipos heredados podían ser rescatados a partir de la estimulación social temprana. Así, la tercera hipótesis de esta tesis es:

- 3) Las alteraciones conductuales generadas por la exposición prenatal a VPA pueden ser heredadas intergeneracionalmente y transgeneracionalmente a la descendencia. Las

alteraciones conductuales heredadas pueden ser rescatadas mediante estimulación social temprana.

En base a las hipótesis planteadas, el **Objetivo general** de esta tesis fue analizar dos factores que a nuestro entender contribuyen a la comprensión de las bases neurobiológicas del autismo: una de ellas es el rol del cerebelo en los niveles de sociabilidad y la otra es la heredabilidad de los fenotipos asociados al autismo en el modelo VPA (entre ellos los niveles de sociabilidad).

Para cumplir con el objetivo general y estudiar el **rol del cerebelo en la modulación de la sociabilidad** planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Estudiar la estructura del lóbulo VI/VII en ratones con distintos niveles de sociabilidad, haciendo énfasis en las alteraciones cerebelares observadas en la neuropatología del autismo.
- 2) Cuantificar el nivel de la activación neuronal en la VTA, en los ratones del modelo VPA.
- 3) Identificar los mecanismos mediante los cuales la neuroinflamación en el lóbulo VI/VII del cerebelo genera una reducción en la sociabilidad.

Por otro lado, para estudiar **si los efectos del VPA sobre la conducta se dan por mecanismos epigenéticos heredables** planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Estudiar si las alteraciones reportadas en los animales tratados prenatalmente con VPA son heredadas a las siguientes generaciones.
- 2) Analizar si la herencia depende del parental afectado prenatalmente por el VPA, mediante el estudio de los linajes materno y paterno.
- 3) Determinar si las alteraciones en la conducta que son heredadas pueden ser moduladas mediante estimulación social temprana.

Capítulo II. Materiales y Métodos

II.1. Animales

En este trabajo se utilizaron ratones de la cepa exocriada Cr1Fcen: CF1 (en adelante CF1) procedentes del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (6:00 a 18:00). El agua y la comida fueron suministradas *ad libitum*.

Los experimentos fueron realizados respetando las regulaciones locales y las enunciadas por el National Institute of Health (NIH) en su Guide of the Care and Use of Laboratory Animals. Los protocolos experimentales fueron previamente aprobados por la Comisión Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (protocolos N° 6/2 aprobado 25/3/14 y N°111 aprobado el 6/9/2019). Se realizaron los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento animal y el número de individuos utilizados.

II.1.1. Progenitores (F0)

Se utilizaron ratones machos y hembras adultos (8 -10 semanas) para realizar los apareos necesarios para generar el modelo experimental. Se eligió la cepa exocriada CF1 debido a que esta cepa tiene mayor éxito reproductivo que las cepas endocriadas. Para el apareo se utilizaron hembras vírgenes.

Cada hembra se colocó con un macho en una jaula individual. Ese día fue considerado el día 1 del apareo, a la mañana siguiente (entre las 9:00 y 10:00), se observó en la hembra la presencia o ausencia de tapón vaginal de semen. En caso de encontrarse tapón, la hembra fue separada del macho y ese día fue considerado como el día gestacional 0.5 (DG 0.5). De no observarse tapón, la hembra y el macho continuaron juntos hasta la observación de tapón vaginal, por un plazo máximo de cinco días. Por la mañana del quinto día todos los ratones fueron separados.

Las hembras fueron colocadas en jaulas de 4-5 animales y los machos en sus jaulas individuales para comenzar, luego de un descanso de 2 días, una nueva tanda de apareo con otro grupo de hembras.

II.1.2. Tratamiento prenatal: Crías F1

En el DG 12.5 las hembras preñadas fueron asignadas al azar a un tratamiento e inyectadas subcutáneamente con una dosis de 600 mg/Kg de ácido valproico (VPA) o con solución salina (SAL). Luego de la inyección, las hembras fueron aisladas en jaulas individuales. A partir del DG 18 se observó diariamente la ocurrencia de nacimientos y, en caso de detectarlos, se registró ese día como el día postnatal 0 (P0) (Figura II.1). No se realizaron cambios de la jaula durante la primera semana de vida con el fin de no alterar el nido, a las crías ni a las madre.



Figura II.1. Esquema de la generación del modelo VPA. Hembras preñadas (F0) fueron inyectadas al día de gestación (DG) 12.5 con VPA o SAL. Las crías de dichas hembras constituyeron la F1 VPA o SAL.

El tamaño de las camadas utilizada fue de entre 6 y 10 ratones. Las camadas de un tamaño inferior a 6 no fueron utilizadas. Por otro lado, se sacrificó el excedente de crías antes de P2 si el tamaño de la camada superaba los 10 ratones. Esto fue realizado con los fines de que las camadas sean más parecidas en cuanto al cuidado materno que reciben y la ganancia en peso de las crías.

Las crías fueron destetadas en el día P21 y separadas en función a su tratamiento y sexo. Para disminuir el efecto camada, al momento de armar cada jaula de destete se eligieron animales que no fuesen hermanos. Estos ratones fueron denominados como la filial 1 (F1) VPA o SAL según el tratamiento asignado.

II.1.3. Apareos realizados para estudiar herencia intergeneracional y transgeneracional

Con el fin de evaluar la existencia de herencia inter y transgeneracional, se realizaron diferentes cruzas. Además se realizaron diferentes diseños experimentales para determinar si los fenotipos podían transmitirse a través del linaje materno o paterno. En todos los diseños, se controló el peso de las hembras desde el comienzo del apareo para determinar la preñez y separarlas del macho. Las hembras que no quedaron preñadas durante un periodo de 3 semanas fueron sacrificadas.

II.1.3.1. Herencia intergeneracional - Crías F2: linaje materno

Con los fines de evaluar la herencia intergeneracional de la F1 a la siguiente generación (F2) a través del linaje materno, cruzamos hembras adultas de la F1 (prenatalmente expuestas a VPA o SAL) con machos naive (Figura II.2). En este trabajo se denominó a las crías de esta crusa como la F2-VPA o F2-SAL generada por linaje materno (F2-VPA/LM o F2-SAL/LM).

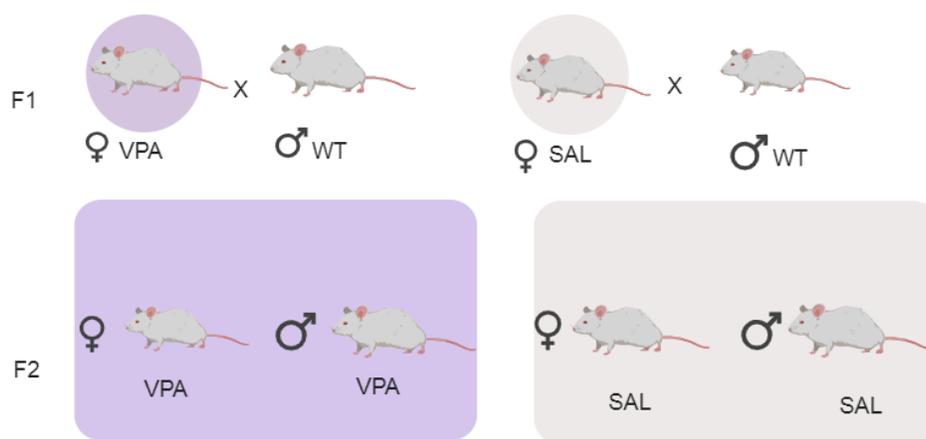


Figura II.2. Esquema de las cruzas realizadas para obtener la F2 VPA o SAL por linaje materno (F2-VPA/LM o F2-SAL/LM).

II.1.3.2. Herencia intergeneracional - Crías F2: linaje paterno

Se realizaron cruces entre machos adultos VPA o SAL de la F1 con hembras naive para generar una F2 por linaje paterno (Figura II.3). Identificamos a estas crías como la F2-VPA o F2-SAL generada por linaje paterno (F2-VPA/LP o F2-SAL/LP).

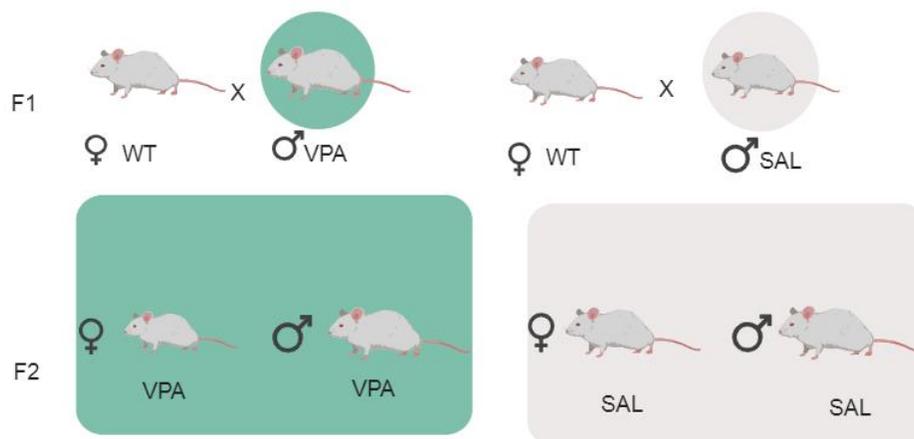


Figura II.3. Esquema de las cruces realizadas para obtener la F2 VPA o SAL por linaje paterno (F2-VPA/LP o F2-SAL/LP).

II.1.3.3. Herencia transgeneracional - Crías F3: linaje paterno

De modo similar al diseño anterior, se cruzaron machos adultos de la F2-VPA/LP o F2-SAL/LP con hembras naive para generar una filial 3 (F3) de ratones (Figura II.4). En el trabajo nos referimos a estas crías como la F3-VPA o F3-SAL generada por linaje paterno (F3-VPA/LP o F3-SAL/LP).

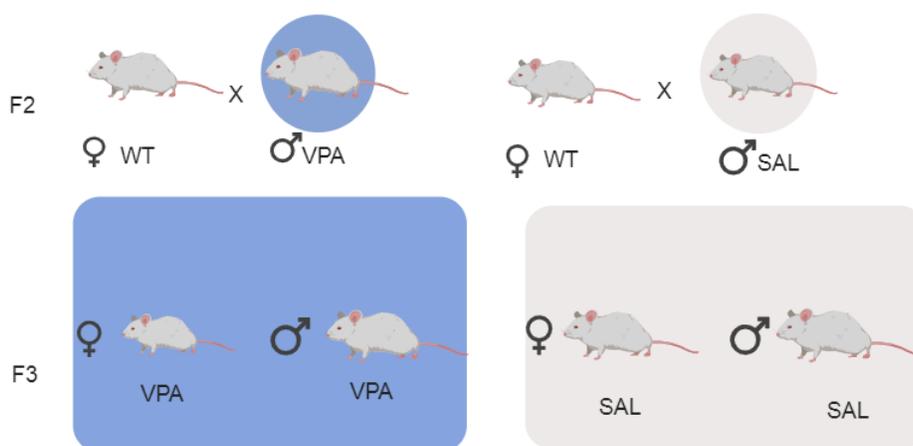


Figura II.4. Esquema de las cruces realizadas para obtener la F3 VPA o SAL por linaje paterno (F3-VPA/LP o F3-SAL/LP).

II.1.4. Ratones CF1 utilizados para las inyecciones estereotáxicas

Utilizamos animales adultos machos CF1 de entre 8 y 10 semanas de edad provenientes de la sala de producción del Bioterio Central de la FCEyN. Los mismos estuvieron habituados una semana a la sala de comportamiento en las condiciones ambientales detalladas en la Sección II.7. Se trasladó a los mismos a otra sala para realizar las inyecciones estereotáxicas (Ver Sección II.3.1). Se los dejó recuperarse sobre una almohadilla térmica y al despertar se los devolvió a la sala de comportamiento.

II.2. Tratamiento postnatal: Modelo de Rescate social

El tratamiento postnatal comenzó el día del destete y corresponde a un modelo de rescate social descrito previamente en Campolongo et al. (2018). Se utilizó este modelo en machos de la F2 y de la F3 obtenidos por linaje paterno. Se eligió trabajar con machos debido a que las hembras de la F1-VPA no muestran niveles reducidos de sociabilidad (Kazlauskas et al., 2019).

En las jaulas de destete se colocaron crías del mismo tratamiento ya sea derivadas de camadas VPA (crías VPA-VPA) o salina (SAL-SAL), además se armaron jaulas mixtas que contenían 2-3 crías derivadas de animales VPA (VPA-SAL) con 2-3 crías derivada de camadas control (SAL-VPA). Las crías pertenecientes a la misma camada fueron distribuidas al azar en distintas jaulas con el fin de reducir el efecto camada. De esta manera, a partir del P21 los ratones derivados de camadas VPA pudieron interactuar con otros ratones también provenientes de animales VPA o con animales SAL, dependiendo del tratamiento asignado.

Quedaron establecidos los siguientes grupos: F2 VPA-VPA (ratones descendientes en primer orden de ratones VPA que convivieron con otros descendientes de primer orden de ratones VPA), F2 SAL-SAL (derivados de camadas control que convivieron con otros ratones derivados de otras camadas control), F2 VPA-SAL (derivados de camadas VPA que convivieron con ratones provenientes de camadas control) y ratones F2 SAL-VPA (derivados de camadas SAL que interactuaron con ratones derivados de camadas VPA) (Figura II.5).

De manera similar al diseño planteado en la F2, se realizó el diseño de rescate social con machos de la F3. En este caso quedaron establecidos los grupos F3 SAL-SAL (descendientes en segundo orden de machos SAL que convivieron con ratones descendientes en segundo orden de machos SAL), F3 VPA-VPA (descendientes en segundo orden de machos VPA que convivieron con ratones descendientes en segundo orden de machos VPA), F3 SAL-VPA (descendientes en segundo orden de machos SAL que convivieron con descendientes en segundo orden de machos VPA) y F3 VPA-SAL (descendientes en segundo orden de machos VPA que convivieron con otros descendientes en segundo orden de machos SAL).

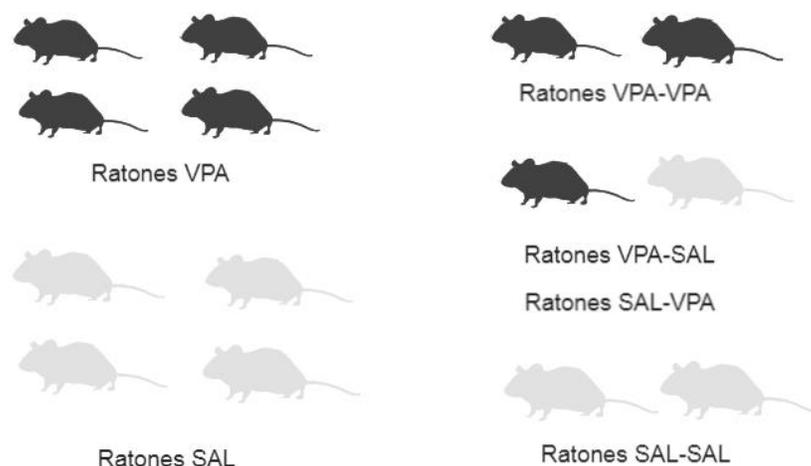


Figura II.5. Esquema general de los grupos experimentales generados con el modelo de rescate social.

II.3. Inyecciones

II.3.1. Inyección estereotáxica de LPS en el cerebelo

El lipopolisacárido (LPS) es un componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas, el cual es resistente a la degradación por las enzimas de los mamíferos (Ohanian & Schwab, 1967). Se ha demostrado que puede desencadenar procesos de neuroinflamación, activación de la microglia, astrogliosis y aumentos en los niveles de IL-1 y TNF α (Hauss-Wegrzynia et al., 1998).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la inyección de LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo genera una reducción en la sociabilidad de los ratones (Lucchina & Depino, 2013). Con los fines de estudiar el mecanismo de acción por el cual este potente inflamógeno genera esta reducción en la sociabilidad se realizaron inyecciones estereotáxicas de LPS el lóbulo VI/VII del cerebelo.

Ratones adultos CF1 fueron anestesiados con ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y ubicados en el aparato de estereotaxis (Stoelting). Para fijar la posición de la cabeza del ratón, se posicionó la barra que sostiene el hocico a una altura de 5 mm, mientras que la barra que sostiene las orejas se mantuvo a una altura de 10 mm. Se realizaron inyecciones en el lóbulo VI/VII de la vermis cerebelar. Las coordenadas de inyección fueron determinadas a partir del atlas de ratón (Figura II.6; Paxinos & Franklin, 2004) y confirmadas realizando pruebas con tinta china e identificando las lesiones producidas en el parénquima por el capilar (Figura II.7). Se utilizaron las siguientes coordenadas: -7.5 mm antero-posterior a partir del bregma, y -1.0 mm dorso-ventral a partir de la pia madre.

La inyección estereotáxica se realizó con un capilar de vidrio graduado y estirado (diámetro aproximado de $50 \mu\text{m}$). El LPS (serotipo 0111:B4, Sigma) se disolvió en solución salina estéril a una concentración de 0.1 mg/ml. Se inyectó un volumen final de $1 \mu\text{l}$. La inyección se realizó en un periodo de 6 minutos: en los primeros cuatro minutos se inyectó el LPS ($0.25 \mu\text{l}/\text{minuto}$), luego se mantuvo el capilar en el lugar de inyección durante un minuto adicional a fin de evitar el reflujo de la solución. Posteriormente se retiró el capilar en dos pasos, con 1 min de espera entre cada uno. Finalmente se procedió a limpiar y cerrar la herida pegándola con pegamento (La Gotita, Akapol S.A., BA-Argentina) y dejando la zona embebida en iodopovidona (Pervinox, Laboratorios Phoenix, BA-Argentina) a fin de minimizar posibles infecciones. Los animales inyectados se mantuvieron sobre una almohadilla térmica hasta recuperarse de la anestesia y luego fueron devueltos a su jaula.

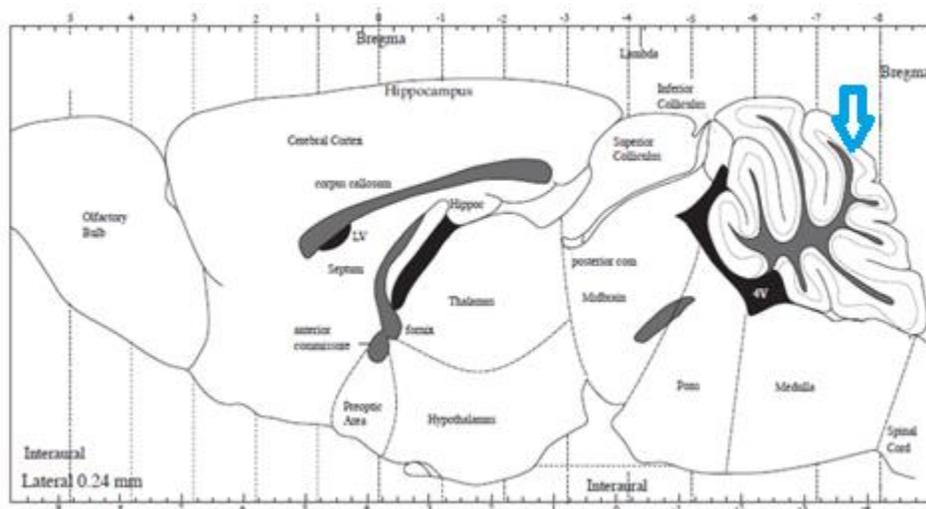


Figura II.6. Vista sagital y medial de la representación del cerebro y el cerebelo del ratón en el atlas del ratón (Paxino & Franklin, 2004). La flecha azul representa la coordenada de inyección.

II.3.2. Inyecciones intraperitoneales con anti-inflamatorios

Para poder elucidar el mecanismo a través del cual actúa el LPS, se realizó un pretratamiento con anti-inflamatorios a nivel sistémico previo a la inyección estereotáxica. Los ratones recibieron un inyección intraperitoneal de ibuprofeno (anti-inflamatorio no esteroideo), dexametasona (anti-inflamatorio esteroideo) o solución salina, una hora antes de la inyección estereotáxica con LPS o SAL. El ibuprofeno inyectable (Ibuzidine, Laboratorio IM) se disolvió en solución salina a una concentración de 20 mg/ml. A los ratones se les inyectó una dosis de 30 mg/kg. Por otro, la dexametasona inyectable (Lormine, Laboratorio Northia) se diluyó y se la llevó a una concentración final de 2 mg/ml. La dosis de dexametasona utilizada fue de 2 mg/kg. Estos dos anti-inflamatorios fueron elegidos porque poseen diferentes mecanismos de acción

II.4. Cuidado materno

El cuidado materno fue registrado entre los días P1 y P7. Las madres fueron observadas todos los días durante una hora entre las 9:30 y las 10:30 en la jaula donde

habitaba con la camada. Durante este tiempo se registró, cada un minuto, la actividad realizada por las madres: amamantar con postura arqueada (ABN, las siglas en inglés de *arched back nursing*) y acicalar a las crías (LGP, por las siglas en inglés de *licking and grooming the pups*) (Kazlauskas et al., 2016).

II.5. Ganancia en peso

Para conocer los efectos de los tratamientos en el desarrollo neonatal, se registró el peso de las crías de la F2 todos los días entre P2 y P9 y luego día por medio entre P11 a P21. Para las crías de la F3 se registró el peso a P13, P17 y P21.

II.6. Comportamiento durante el desarrollo postnatal

El progreso en el desarrollo neurológico fue registrado durante el periodo de lactancia con tres ensayos: enderezamiento sobre la superficie, fuerza de agarre y sobresalto acústico. Las primeras dos tareas dependen del hipocampo, la corteza y el cerebelo (Wagner et al., 2006), mientras que el sobresalto acústico puede proveer información general sobre el procesamiento sensoriomotor (Buccafusco, 2001).

II.6.1. Enderezamiento sobre superficie

Para evaluar el reflejo de enderezamiento se colocó al animal sobre su espalda sobre una superficie plana y se cuantificó el tiempo que éste tardó en regresar a su posición original. Se consideró un enderezamiento total sólo cuando las 4 patas del animal se encontraban apoyadas en la superficie, con una tolerancia máxima en el desarrollo de la tarea de 60 segundos (*cut off*).

II.6.2. Fuerza de agarre en una red colgante

En este test los animales son colocados sobre una red metálica, y ésta se invierte rápidamente sobre una caja con viruta, de modo que el ratón debe permanecer agarrado de la red para no caer. Se registró el tiempo transcurrido hasta la caída, con un tiempo máximo de espera de 60 segundos.

II.6.3. Sobresalto acústico

Se realizó un chasquido de dedos 10 cm por encima de la cabeza del animal y se evaluó la presencia o ausencia de sobresalto.

II.7. Comportamiento en la adultez

Los animales fueron habituados durante la semana previa al comienzo de los ensayos conductuales a la sala comportamiento del Bioterio Central, donde se los mantuvo con un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 (6:00 a 18:00) y una temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todos los ensayos conductuales fueron realizados durante la fase de luz (entre las 10:00 y las 17:00 hs para evitar la hora posterior y previa al cambio de fase), a excepción de los ensayos de habituación/deshabituación olfativa y de laberinto en Y que comenzaron dos horas antes de la fase oscura (16:00 hs) y se realizaron hasta las 21:00 hs aproximadamente con el objetivo de maximizar los niveles de exploración de los ratones. Para todos los ensayos se procedió de la misma manera. Se habituaron los animales durante al menos 30 minutos a la iluminación de la sala donde se realizó el ensayo. El orden con el que se evaluaron las jaulas fue al azar, solamente teniendo la consideración de no estudiar todas las jaulas del mismo tratamiento en el mismo horario. Los ensayos fueron realizados y analizados sin conocer los tratamientos. Los ensayos se realizaron en orden creciente según el estrés y se separaron por una semana a fin de minimizar el efecto de un ensayo sobre el otro.

Las arenas experimentales fueron limpiadas con etanol 20% entre sesiones, excepto el vaso utilizado en el ensayo de natación forzada, cuya agua fue cambiada luego de 4-5 ratones. Los ensayos fueron grabados y analizados utilizando el software ANY-Maze (Stoelting CO, USA).

II.7.1. Ensayo de Interacción Social

El ensayo de interacción social permite cuantificar la tendencia de un ratón de acercarse a otro ratón en un contexto de investigación social (Crawley, 2007). El dispositivo consiste en una arena rectangular de poliestireno negro (15 cm x 40 cm x 25

cm) que tiene definida 3 cámaras (2 laterales y una central) entre las cuales el ratón puede desplazarse (Figura II.7). Las cámaras laterales contienen cada una un tubo cilíndrico de acrílico transparente (7.5 cm de diámetro y 15 cm de altura) que posee agujeros de 0.5 cm en los que el ratón puede introducir el hocico. El ensayo se realizó bajo una iluminación tenue de 10 lux con los fines de disminuir los niveles de estrés y maximizar la exploración de toda la arena. El ensayo comenzó con una habituación de 5 minutos, en la cual el ratón es colocado en la cámara central y se le permite explorar la arena y los cilindros. Luego, se colocó al azar en uno de los cilindros un ratón de mismo sexo del animal evaluado, pero juvenil (edad entre P21 y P45) que denominamos “estímulo social” y en el otro se colocó un objeto de tamaño y color similar al ratón estímulo (rollo de película fotográfica cubierta con cinta de papel blanca). La cámara donde se encontraba el ratón estímulo fue definida como el “lado social” y la otra como el “lado no social”. Se grabaron ambas sesiones con el programa de seguimiento digital ANY-Maze y se registró el tiempo durante el cual el ratón pasa oliendo el cilindro del “lado social” y el del “lado no social” (nariz a menos de 1 mm del cilindro). Se calculó el índice de sociabilidad como el tiempo que el animal pasa oliendo el cilindro del lado social menos el tiempo oliendo el cilindro del lado no social. El piso de la arena fue cubierto con viruta limpia para reducir el estrés del animal al aparato.

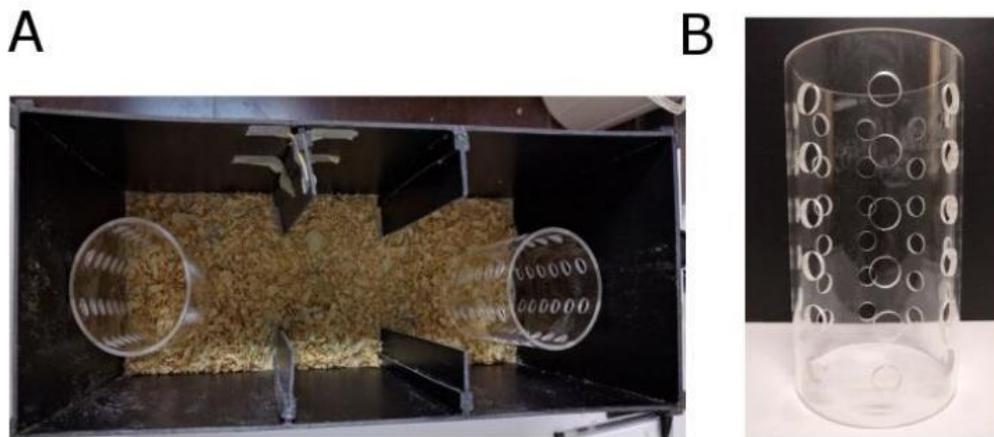


Figura II.7. Aparato utilizado en el ensayo de interacción social (A) y tubo cilíndrico en donde coloca el estímulo social o el estímulo no social (B).

II.7.2. Ensayo de autoacicalamiento

En roedores un comportamiento de acicalamiento excesivo puede ser conceptualmente análogo al comportamiento motor estereotipado característico del autismo (McFarlane et al., 2008). En este ensayo el dispositivo consiste en un tubo de acrílico de plexiglás transparente (5.5 cm de diámetro y 20 cm de altura) en el cual se colocó al ratón. El orificio del tubo fue tapado con un barbijo para evitar que el ratón escape (Figura II.8). Para este ensayo, cada ratón fue colocado en un cilindro durante 1 hora por dos días consecutivos en lo que fueron las sesiones de habituación. El tercer día se volvió a colocar al animal durante 10 minutos (luego de un periodo de 10 minutos de habituación), se grabó la sesión con el ANY-Maze y se midió el tiempo que el ratón se acicalaba cualquier parte de su cuerpo. Tanto en las sesiones de habituación como durante el ensayo la sala estuvo iluminada con 10 lux.



Figura II.8. Tubo de acrílico utilizado en el ensayo de auto-acicalamiento.

II.7.3. Laberinto en Y

El laberinto en Y es un ensayo utilizado para evaluar comportamientos repetitivos y memoria de trabajo (Deacon & Rawlins, 2006, Chang et al., 2017). El aparato consiste en un laberinto de acrílico transparente con 3 brazos, cada uno de 42 cm de largo, con paredes inclinadas de 12 cm de alto (Figura II.9). La base el laberinto es de Syntrex negro para

facilitar el seguimiento de los animales de color claro. El ratón fue habituado a la sala durante 30 minutos a 30 lux. Luego el animal fue colocado en uno de los brazos del laberinto y se le permitió recorrer el mismo libremente por todos los brazos. Las paredes de la sala tenían diferentes claves visuales que le permitían al ratón diferenciar los brazos entre sí. El recorrido del animal fue registrado por el software ANY-Maze. Se calculó el porcentaje de alternancias definida como $(\text{alternancias totales} \times 100) / (\text{número total de visitas a brazos} - 2)$. Cada alternancia fue definida como la visita consecutiva de los 3 brazos, en cualquier orden. También se registró la distancia total recorrida en el laberinto.



Figura II.9. Vista superior del Laberinto en Y.

II.7.4. Reconocimiento de un objeto novedoso

El ensayo de reconocimiento de un objeto novedoso es utilizado para evaluar memoria (Ennaceur & Delacour, 1988). El mismo se realizó en una arena cuadrada de paredes negras (30 cm x 30 cm, y 30 cm de altura) (Figura II.10). El ensayo consistió de tres sesiones de 5 minutos, separadas entre ellas por 5 minutos durante los cuales el animal permaneció en una caja con viruta. En la primera sesión se colocó al ratón durante 5 minutos en la arena experimental con el objetivo de que explore la misma (habitación). En la segunda sesión se lo expuso a dos objetos idénticos y se le permitió explorarlos. En la

tercera sesión se introdujo al animal en la arena conteniendo uno de los objetos que había explorado en la sesión anterior (objeto familiar) y un objeto desconocido (objeto novedoso). Las sesiones fueron grabadas y el movimiento de los animales registrado utilizando el ANY-Maze. Se midió el tiempo que el animal estuvo oliendo el objeto novedoso y el familiar. Además se calculó el tiempo relativo de exploración del objeto novedoso expresado por el índice de discriminación como:

$$\%ID = (t_{\text{novedoso}} - t_{\text{conocido}}) / t_{\text{total}}$$

con t_{total} como la suma del tiempo explorando el objeto novedoso (t_{novedoso}) y el tiempo que explora el objeto conocido (t_{conocido}).

Para cada ratón evaluado se aleatorizó el tipo de objeto novedoso y la posición del mismo (arriba o abajo) en la arena. El ensayo se realizó con una luz tenue de 10 lux.

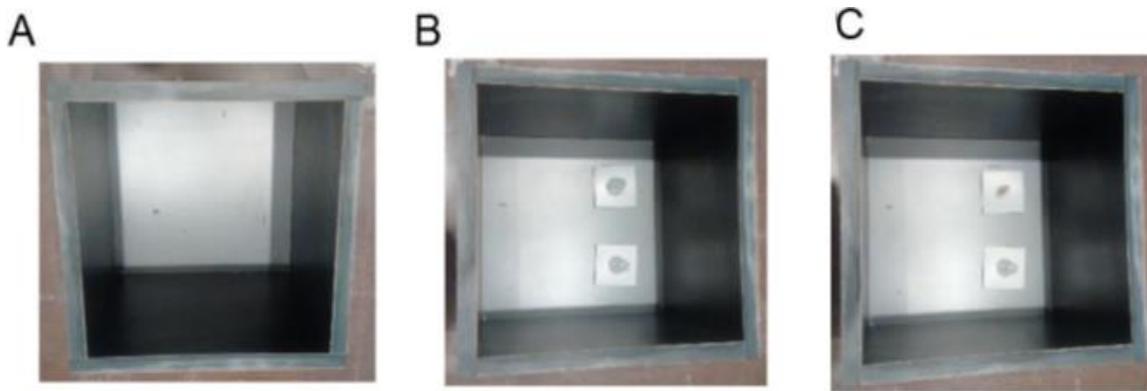


Figura II. 10. Arena utilizada en el test de reconocimiento novedoso. En (A) se muestra la arena sin ningún objeto utilizada en la habituación, mientras que en (B) se colocaron dos objetos iguales y en (C) dos objetos diferentes a fines ilustrativos.

II.7.5. Ensayo de habituación/deshabituación olfativa

El ensayo de habituación/deshabituación olfativa permite conocer la habilidad de los ratones para discriminar entre olores iguales o diferentes, sean estos de naturaleza social o no social (Yang & Crawley, 2009, Silverman et al., 2010). Cada ratón fue habituado durante 30 minutos a una caja experimental (27 cm x16 cm, 12 cm altura) que contenía viruta y un hisopo enganchado en la tapa de la caja, al cual el ratón puede acceder (Figura

II.11). La luz de la sala fue de 50 lux. Durante la habituación el animal suele explorar la caja y el hisopo, familiarizándose con el ambiente.

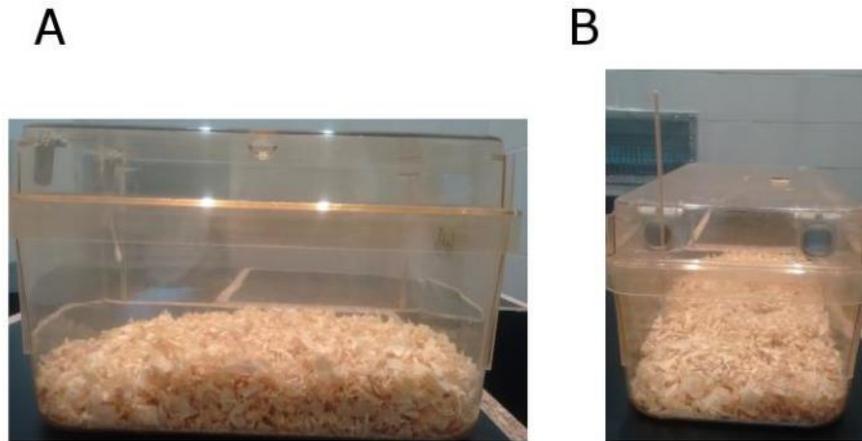


Figura II.11. Vista lateral (A) y frontal (B) de la caja en donde se realizó el ensayo de habituación/deshabituación olfativa. En B se puede ver el hisopo en la tapa de la caja.

El ensayo consiste en la presentación durante 2 minutos del hisopo con diferentes olores. Cada ratón recibió 3 presentaciones consecutivas de cada olor (habitación olfativa a un olor) y luego se cambió el olor. La presentación de un olor diferente al que el animal estaba habituado es lo que se conoce como deshabituación olfativa. El intervalo entre la presentación de los olores fue de 1 minuto, que es el tiempo en que se tardó en cambiar el hisopo. Primero se midió la respuesta al hisopo embebiendo la punta del hisopo en agua y presentándolo durante 3 sesiones de 2 minutos. Los olores no sociales consistieron en diluciones de extracto de vainilla o banana, que fueron calibradas previamente para estimular la olfacción y no causar rechazo (Campolongo et al., 2018). Para los olores sociales, se pasó la punta del hisopo en una caja con viruta sucia de machos o de hembras. Se grabó el comportamiento de los animales con el ANY-Maze y se cuantificó el tiempo que estuvieron oliendo la punta del hisopo. Los animales que no olieron en ninguna de las 3 presentaciones de algún olor en particular, no fueron tenidos en cuenta en el análisis.

Con las mediciones obtenidas se pudieron calcular diferentes índices de discriminación. Estos índices muestran la capacidad que posee un ratón de discriminar entre un olor que venía oliendo en sucesivas repeticiones cuando se presenta un olor diferente. El índice de discriminación entre olores no sociales se calculó como la diferencia

entre el tiempo que el animal pasó oliendo la primera presentación de banana respecto de la tercera presentación de vainilla. El de discriminación social se determinó como la resta entre el tiempo que el animal olfateó el hisopo en la primera presentación del olor a hembras respecto a la última presentación del olor a machos.

II.7.6. Ensayo de nado forzado

Este ensayo permite evaluar comportamientos asociados a depresión (Porsolt et al., 1977). Durante el mismo se colocó un ratón en un vaso de vidrio (15 cm de diámetro y 25 cm de altura), el cual estaba lleno con agua a 25°C hasta una altura de 14 cm (Figura II.12). Los animales fueron introducidos en el agua con delicadeza evitando que se mojaran su cabeza y vibrisas. Con el programa ANY-Maze se grabó el ensayo y se midió el tiempo de inmovilidad de un total de 6 minutos. Se reporta el tiempo total de inmovilidad entre el minuto 2 y el minuto 6 del ensayo. La sala estuvo en un nivel de iluminación de 50 lux.



Figura II.12. Vaso de vidrio en el que se evalúa el nado forzado.

II.7.7. Ensayo de suspensión de la cola

Al igual que el ensayo de nado forzado, el ensayo de suspensión de la cola permite analizar comportamientos asociados a depresión (Steru et al., 1985). El dispositivo de este ensayo consiste en dos soportes verticales de 25 cm unidos a través de un cable delgado (Figura II.13). Los ratones fueron suspendidos del alambre por la cola mediante cinta adhesiva de papel durante 5 minutos. Se registró el tiempo total de inmovilidad durante la

sesión. Los ratones que se treparon por su propia cola y subieron al alambre en este ensayo no fueron tenidos en cuenta para el análisis. La habitación estuvo iluminada a 50 lux.



Figura II.13. Dispositivo experimental con el que se realizó el ensayo de suspensión de la cola.

II.7.8. Ensayo de campo abierto

En este ensayo se permite a los animales explorar libremente una arena cuyo centro se encuentra más iluminado que la periferia. Los ratones que tienen un comportamiento asociado a ansiedad suelen preferir pasar más tiempo en la periferia de la arena (Buccafusco, 2001). La arena experimental de este ensayo fue una caja cuadrada de paredes y piso negro (45 cm x 45 cm, y 30 cm de altura) (Figura II.14). Se delimitó un centro virtual de 23 cm x 23 cm utilizando el software ANY-Maze. El resto de la superficie de la arena quedó definida como periferia. Se trabajó a una iluminación de 100 lux en el centro del campo. Durante el ensayo se introdujo al animal cerca de una de las paredes y se le permitió explorar la arena libremente. Se registró el recorrido del animal con el software ANY-Maze. Se cuantificó la distancia recorrida, el tiempo en el centro y el número de entradas al centro. La duración del ensayo fue de 10 minutos.



Figura II.14. Vista superior de la arena en donde se realizó el ensayo de campo abierto.

8. Análisis Histológico

8.1. Procesamiento de los tejidos

Los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) a través de inyección intraperitoneal, y luego perfundidos primero con solución salina (0.9 % NaCl) y luego con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer fosfato (PB) 0.1M pH =7.2. Las perfusiones fueron realizadas a flujo constante utilizando una bomba peristáltica (LKB 2115, LKB-produkter AB, Zurich, Suiza). Una vez finalizadas se realizó la extracción del cerebro y se postfijó en PFA al 4% por 24 hs a 4 ° C. Luego se descartó el PFA y se realizaron 2 lavados de la muestra con PB. El cerebro fue conservado en una solución de sacarosa al 30 % en PB a 4 °C. Las perfusiones no pudieron realizarse en animales de P7 debido a su pequeño tamaño. En ese caso, los animales fueron sacrificados, su cerebro fue fijado por 24 hs en PFA al 4 % y luego de lavados conservados en sacarosa al 30 % a 4 °C.

Para congelar las muestras fueron colocadas nuevamente en un falcón con solución de sacarosa 30 % en PB durante 24 horas a 4 °C y posteriormente secadas y guardadas en un freezer de -80 °C durante por lo menos 2 horas. Los cerebros fueron seccionados con un crióstato (Leica o Instrumentalia). Los cerebros de P7 y P14 fueron seccionados cada 30 µm, montados en portaobjetos gelatinizados, y conservados a -20 °C. Los cerebros de animales sacrificados a partir de P14 en adelante fueron cortados a un grosor de 35 µm y sus secciones almacenadas de manera seriada en placas *multiwell* con solución de criopreservación (3 vol de glicerol, 3 vol de etilenglicol, 4 vol de PB). El encéfalo fue cortado en su plano coronal, mientras que el cerebelo en su plano sagital.

II.8.2. Tinción de Nissl

Los cortes en solución de criopreservación fueron lavados en PB y montados en portaobjetos gelatinizados. Luego de mantenerlos a temperatura ambiente durante una hora para que se sequen, fueron colocados en un vaso de Coplin en donde se realizó el pasaje por las diferentes soluciones. Para la rehidratación de los cortes se realizaron dos pasajes en etanol 100%, dos pasajes en etanol 96%, un pasaje en etanol 70% y un pasaje por agua (3 minutos cada uno). A continuación se sumergieron los vidrios en la solución de cresyl violeta (0.5 gr de Cresyl, 100 ml de acetato de sodio 0.1 M, pH 3.8) por un minuto y se aclaró la tinción en agua de canilla. Para la deshidratación de los cortes se realizó un pasaje por etanol 70% de 1 minuto, dos pasajes por etanol 96% y dos pasajes por etanol 100% de 3 minutos cada uno, seguidos de tres pasajes de 3 minutos por xilol. A los vidrios se les agregó el cubreobjetos montándolo con el bálsamo sintético de Canadá (Biopack, Buenos Aires, Argentina).

II.8.3. Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

Se realizaron diferentes técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia para conocer el estado inflamatorio (IBA-1) o para determinar la presencia de marcadores de activación neuronal (c-Fos). Estas técnicas se llevaron a cabo en cortes en suspensión (“free floating”) hasta que los cortes fueron montados en un portaobjetos gelatinizado. El tipo de montaje fue específico de cada técnica y detallados a continuación.

II.8.3.1. c-Fos

El gen *c-FOS* es un gen de expresión temprana que codifica para una proteína nuclear que lleva el mismo nombre. Para realizar esta inmunohistoquímica se lavaron los tejidos tres veces con PBS conteniendo 0.1% tritón X-100 (Tx) y se bloquearon las peroxidases endógenas con una solución 1:60 de H₂O₂ en metanol durante 20 minutos. Luego se realizaron dos lavados con PBS-0.1% Tx, y las secciones se bloquearon durante 1 hora con suero de burro 1% en PBS-0.1% Tx. Los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario anti-c-Fos generado en conejo (dilución 1:1000, EMD Millipore, Burlington, MA, USA) durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación. Al otro día se lavaron las secciones con PBS-0.1% Tx y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (dilución 1:200, Jackson, West Grove, PA, USA) durante 2 horas. Se procedió a lavar nuevamente con PBS-0.1% Tx y luego dos veces con PB. Los cortes fueron incubados con el complejo avidina-biotina durante 2 horas (Laboratorio Vector, Burlingame, CA, USA), lavados dos veces en PB y revelados mediante una solución conteniendo diaminobenzimida (0.25 ml 0.1M DAB, 0.75 ml PB, 10 µl H₂O₂, 7.5 µl CINi). Por último se lavaron los cortes 3 veces con PB y fueron montados en un portaobjetos donde se permanecieron toda la noche secándose. A la mañana siguiente se realizó una contra-tinción de Nissl clarita, tal como se detalla en la sección II.8.2.

II.8.3.2. IBA-1

La molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (IBA1) es uno de los marcadores específicos de microglia y macrófagos más utilizados. Para cuantificar microglia se realizaron inmunofluorescencias anti-IBA-1.

Los cortes fueron lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) y luego incubados en buffer citrato (citrato de sodio 10 mM, Tween 20 0.05%, pH 6) en un baño a 85 °C durante 20 minutos. A continuación se realizaron dos lavados en PBS y se procedió a realizar el bloqueo de uniones inespecíficas (suero de burro 1% en PBS-Tx 0.1%) por 60 minutos. Se incubó al tejido con el anticuerpo primario anti-IBA1 generado en conejo (dilución 1:3000, WAKO, Osaka, Japón) durante dos noches en agitación y a 4 °C.

Trascurrido este tiempo se realizaron dos lavados con PBS-0.1% Tx y dos con PB. Se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa 488 (dilución 1:200, Jackson, Baltimore, USA) durante 2 horas en oscuridad y agitación. Finalmente se realizaron dos lavados con PB y los tejidos fueron montados en portaobjetos. Una vez que los tejidos se secaron, se hidrataron en un vaso de coplin con PB y se montaron los cubreobjetos con solución de fluorescencia (13% Mowiol 4-88, 33% glicerol en Tris 0.2 M pH 8,5).

II.8.4. Obtención de imágenes

Los cortes en los que se realizó la tinción de Nissl o la inmunohistoquímica anti c-Fos fueron fotografiados con una cámara Infinity 1 (Corporación Lumera, Ottawa, Canadá) incorporada a un microscopio CX31 (Olympus, Buenos Aires, Argentina). Las imágenes fueron tomadas utilizando el software Infinity Capture (Corporación Lumera, Ottawa, Canadá).

Por otro lado, las fotos de los preparados de la inmunofluorescencia anti IBA-1 fueron obtenidas con el microscopio confocal Olympus FV300/BX61. Se utilizó una magnificación de 400x y se tomaron imágenes en el plano Z de 1 μ m. Las mismas fueron analizadas con el software Olympus Fluoview viewer (Versión 04.01.02.02, Olympus Co).

II.8.5. Análisis de las imágenes

II.8.5.1. Parámetros morfométricos

Se fotografiaron secciones sagitales de los lóbulos V, VI y VII del cerebelo de ratones de diferentes edades y sexo, teñidos con la tinción de Nissl (sección II.8.2). Se determinaron diferentes parámetros de interés en el lóbulo VII del cerebelo de ratón con el programa ImageJ (Versión 1.48, NIH, USA): área total del lóbulo VII, área de la capa granular y molecular, ancho de la capa molecular y tamaño de las células de Purkinje (CPs).

Se calculó el ancho de la capa molecular trazando una línea recta medial al lóbulo que se extendió desde la capa de CPs hasta el final de la capa molecular (Figura II.15A). Se

determinó el área del lóbulo VII trazando una línea en el perímetro del mismo (Figura II.15B). De la misma manera se calculó el área de la capa granular (Figura II.15C) y el de la sustancia blanca (Figura II.15D) correspondiente al lóbulo. Para calcular el área de la capa molecular, al área total se le restaron el área de la capa granular y el de la sustancia blanca. Estos parámetros se obtuvieron de fotografías en aumento 40X. En fotos en aumento 400X se midió el área de las CPs trazando el contorno de las mismas (Figura II.15F). Se realizaron entre 8 y 16 mediciones en cada animal, muestreando los 3 lados del lóbulo.

Para calcular el valor de los parámetros por animal se realizó el promedio de 3-4 secciones. Se utilizaron entre 4 y 6 animales machos por tratamiento, y entre 3 y 5 hembras por tratamiento.

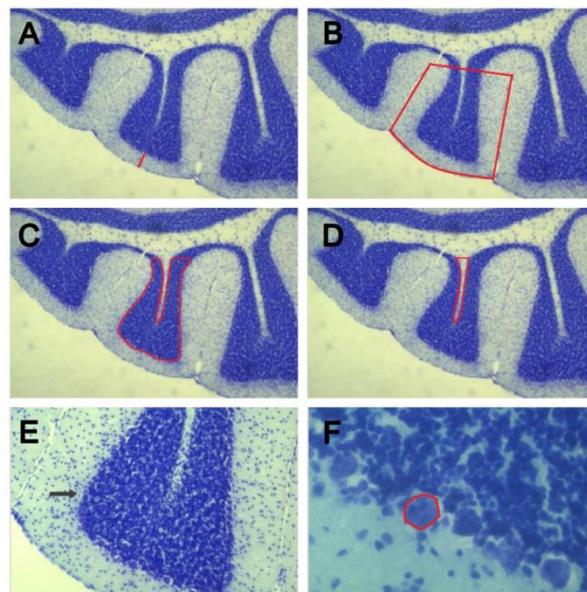


Figura II.15. Fotografías del lóbulo VII del cerebelo. En A se indica en rojo la línea que representa el ancho de la capa molecular, en B se encuentra marcada la superficie total del lóbulo, mientras que en C y D se indican el área de la capa granular y de la sustancia blanca respectivamente (fotos tomadas con el objetivo 4x). En E la flecha marca una CP (fotografía con objetivo 10x). En D se delimitó en rojo la periferia de una CP para calcular su área (fotografía con objetivo 40x).

II.8.5.2. Densidad de células de Purkinje

Se definió la densidad de células de Purkinje (CPs) como el número de células contenidas en una línea virtual proyectada en la capa de Purkinje. La línea virtual se trazó

utilizando el programa ImageJ (Versión 1.48, NIH, USA) en una fotografía tomada con el objetivo 10X (Figura II.15E), mientras que el número CPs se contó con el objetivo de 40X (Figura II.15F). La densidad por lóbulo en cada animal se calculó como el promedio de 3 secciones. Se utilizaron entre 3 y 5 animales por tratamiento

II.8.5.3. Cuantificación de células c-Fos positivas

Luego de realizar la inmunohistoquímica anti c-Fos y la contra-tinción de Nissl se contó manualmente el número de células c-Fos+ en secciones coronales del cerebro. Las regiones de interés fueron la corteza piriforme y el área tegmental ventral (VTA). La cuantificación de las células c-Fos+ se realizó en un aumento de 400x.

Corteza piriforme. La cuantificación se llevó a cabo en la capa 2 de la corteza piriforme. Los cortes se clasificaron en anterior y posterior estableciendo el límite con la ayuda del atlas de ratón (Paxino y Franklin, 2014), como la última sección anterior en donde se puede identificar la rama posterior de la comisura anterior (0.26 mm del bregma). Se calculó la densidad de células c-Fos+ a partir del número de células y el volumen de la capa 2. Este último se determinó estableciendo el área con el programa Image J (Versión 1.48, NIH, USA) y multiplicándolo por el espesor del corte (35 µm).

Área ventral tegmental. Para estudiar la VTA también realizamos una división anatómica discriminando entre la VTA anterior (comprendida entre -2.70 a -3.16 mm del bregma) y la VTA posterior (desde -3.16 hasta -3.40 mm del bregma). Se cuantificó el número de células c-Fos+ en entre 2 y 6 cortes por animal. Se utilizaron entre 6 y 9 animales por tratamiento.

II.8.5.4. Cuantificación de células IBA-1 positivas

Tal como se describió en la sección II.8.4 las fotografías de la inmunofluorescencia contra IBA-1 fueron tomadas en el microscopio confocal y analizadas con el programa Fiji Image J (Versión 1.48, NIH, USA). Para cada ratón se tomaron 3 fotografías del lóbulo VII del cerebelo que incluyeran tanto la capa molecular como la granular. Se clasificó a la microglia según su morfología (Kazlauskas et al., 2016): Tipo I, aquellas con procesos largos, finos y ramificados; Tipo II-III: células con procesos cortos y gruesos; Tipo IV: soma redondo y procesos ausentes. La microglia con morfología Tipo I es la que se

encuentra en estado de reposo, mientras que la Tipo IV tiene forma ameboidea y un grado de activación máximo (Kreutzberg, 1996) (Figura II.16).

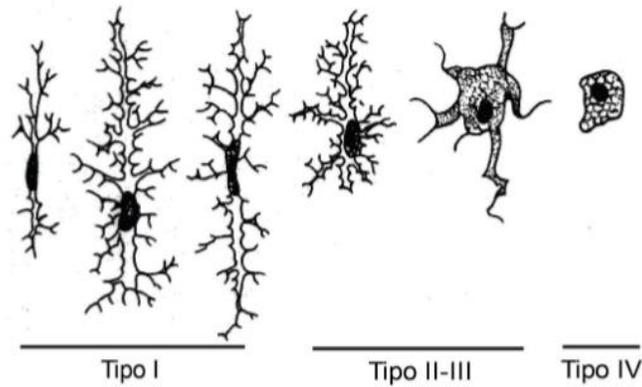


Figura II.16. Diferente morfología de la microglía según su grado de activación (Kreutzberg, 1996).

A partir de la clasificación de las células pudimos calcular el porcentaje de células y la densidad celular. Además, realizando un Z-stack con intensidad máxima se realizó un análisis de Sholl (Norris et al., 2014), utilizando la herramienta del programa Fiji (Ferreira et al., 2014). Este análisis nos permitió estimar el grado de ramificación de la microglía. Adicionalmente medimos en las imágenes el área del soma, el radio mayor de la célula (definida como la distancia desde el centro del soma al extremo de la proyección más alejada), el radio mayor y el radio menor del soma (Figura II.17). Se calculó el coeficiente de esfericidad del soma como el cociente entre el radio mayor y el radio menor.

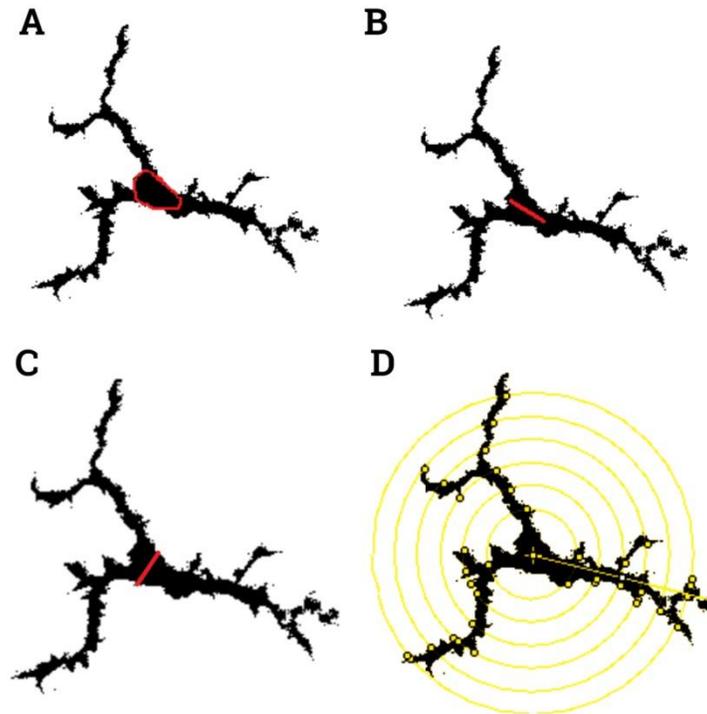


Figura II.17. Diferentes variables medidas en la microglia. En A se encuentra el área, en B y en C el radio mayor y el radio menor del soma, respectivamente. En D se muestra el análisis de Sholl realizado para calcular el número de ramificaciones (intersecciones) y la línea recta representa el radio utilizado para hacer el análisis (radio Sholl).

II.8.6 Análisis de los niveles de catecolaminas mediante HPLC

Se sacrificaron los animales por dislocación cervical, y su cerebro fue extraído. Se recolectó la corteza piriforme, la cual fue rápidamente congelada y mantenida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El tejido fue homogeneizado en 1 ml de ácido perclórico 0.3 M, y sometido a una centrifugación refrigerada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos a 3000g. Se cuantificaron los niveles de Dopamina (DA), su metabolito (DOPAC; ácido 3,4-dihidroxifenilacético), Serotonina (5-HT) y su respectivo metabolito (5-HIAA; ácido 5-hidroindolacético). Las determinaciones se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección electroquímica. Se utilizó la columna de HPLC Phenomenex Luna $5\text{ }\mu\text{m}$, C18, de $250\text{ mm} \times 4,60\text{ mm}$ (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) y el detector electroquímico LC-4C con electrodo de carbono vitreo. El electrodo de trabajo se fijó en $+0.65\text{ V}$ en relación a un electrodo de referencia de Ag / AgCl. La fase móvil contenía NaH_2PO_4 0.76 M, EDTA 0.5 mM, Ácido 1-octanosulfónico 1.2 mM y acetonitrilo al 5%; ajustándose el

pH a 3.0. La concentración de catecolaminas se relativizó con la masa de proteínas totales, las cuales fueron determinadas con el espectrofotómetro Nano Drop 1000 (Thermo Scientific).

II.8.7 Análisis estadístico

Se utilizaron diferentes pruebas estadísticas según el caso, detalladas en cada uno de los resultados. Se realizaron comparaciones que requirieron realizar la prueba t de Student entre muestras independientes, y en otros casos la prueba de t pareada. Cuando se utilizaron estas pruebas se verificó el cumplimiento de homocedasticidad con la Prueba F de igualdad de varianzas y el cumplimiento de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks.

En los ensayos comportamentales en donde se utilizaron más de dos animales provenientes de la misma camada en la misma jaula, se utilizó un modelo lineal y mixto con modelado de la varianzas. En estos casos se incluyó a la madre (camada) de la cual provenía cada ratón y al ratón como factores aleatorios.

Para el análisis del ensayo de habituación/deshabituación olfativa se realizó un modelo lineal general y mixto para cada uno de los olores presentados. En este caso se tomaron a los ratones como factores aleatorios.

En el resto de los análisis se utilizó un sólo animal proveniente de cada camada, por lo que fueron analizados mediante ANOVA de uno o dos factores o de medidas repetidas, según el caso. Los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad se verificaron a través de las pruebas de Levene y de Shapiro-Wilks, respectivamente.

En caso de hallar algún efecto principal o interacción entre los factores, se utilizó el test post-hoc LSD de Fisher para detectar diferencias significativas entre los grupos.

En el caso específico de la variable sobresalto acústico, donde se registró si apareció el reflejo o no, se realizó una prueba de chi-cuadrado para realizar las comparaciones pertinentes.

En todos los casos se asumió la significancia estadística cuando $p < 0.05$.

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico InfoStat versión 2008 (versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Capítulo III. Caracterización del cerebelo en el modelo VPA

III.1. Punto de inicio

Como mencionamos en la sección I.5.1, existen muchos laboratorios que utilizan al modelo VPA como un modelo de autismo en ratón. La principal característica por la que se lo elige es que los animales expuestos prenatalmente a VPA presentan bajos niveles de sociabilidad en la adultez y esto le brinda al modelo validez aparente, ya que recapitula el principal síntoma diagnóstico de los pacientes con DEA, que es la alteración en la sociabilidad. Además de este fenotipo, el modelo que utilizamos en nuestro laboratorio también presenta fenotipos asociados a comportamientos repetitivos y a las comorbilidades observadas en el DEA, como la ansiedad y la depresión (Lucchina & Depino, 2013, Campolongo et al., 2018).

La neuropatología del autismo presenta una gran variedad de regiones cerebrales involucradas, lo cual hace más complejo el estudio de este desorden. Una de las estructuras más afectadas es el cerebelo, en donde se ha reportado la pérdida de células de Purkinje (CPs) (Bauman & Kemper, 1985, Bailey et al., 1998, Allen et al., 2005). Esta alteración también ha sido recapitulada en el modelo animal de autismo asociado a la activación inmune materna (MIA), en donde los ratones expuestos prenatalmente a PolyI:C presentaron una menor densidad de CPs en el lóbulo VII cerebelar, CPs localizadas heterotópicamente, y un retraso en la migración de las células granulares del lóbulo VI/VII (Shi et al., 2009). Ésta no es la única alteración asociada a este tipo celular, ya que Fatemi et al. (2002) reportaron que los pacientes con DEA presentaban un menor tamaño de CPs, por lo que este tipo celular parecería tener un rol clave en el desorden. Otra alteración estructural observada en los pacientes con autismo es la hipoplasia en diferentes lóbulos, en particular el lóbulo VII (Courchesne et al., 1988, Kaufmann et al., 2003). En base a estos antecedentes decidimos estudiar si estas alteraciones estructurales podrían ser la base neurobiológica subyacente al déficit de sociabilidad observado en el modelo VPA.

El **objetivo** de este capítulo fue estudiar la estructura del lóbulo VII en ratones con distintos niveles de sociabilidad, investigando particularmente las alteraciones cerebelares observadas en la neuropatología del autismo.

III.2. Diseño experimental

Para generar el modelo VPA se obtuvieron las crías machos y hembras VPA o SAL según la descripción de la sección II.1.2 de Materiales y Métodos. A estos animales los llamamos ratones F1-VPA o F1-SAL según el tratamiento prenatal recibido. Se utilizaron crías hembras y machos F1-VPA o su control, las cuales fueron sacrificadas a diferentes edades, su cerebelo fue extraído, y se determinó la densidad de CPs en los lóbulos V, VI y VII (Figura III.1). Por otro lado, se cuantificó en animales adultos el área del lóbulo VII, el tamaño de las CPs y el ancho de la capa molecular.

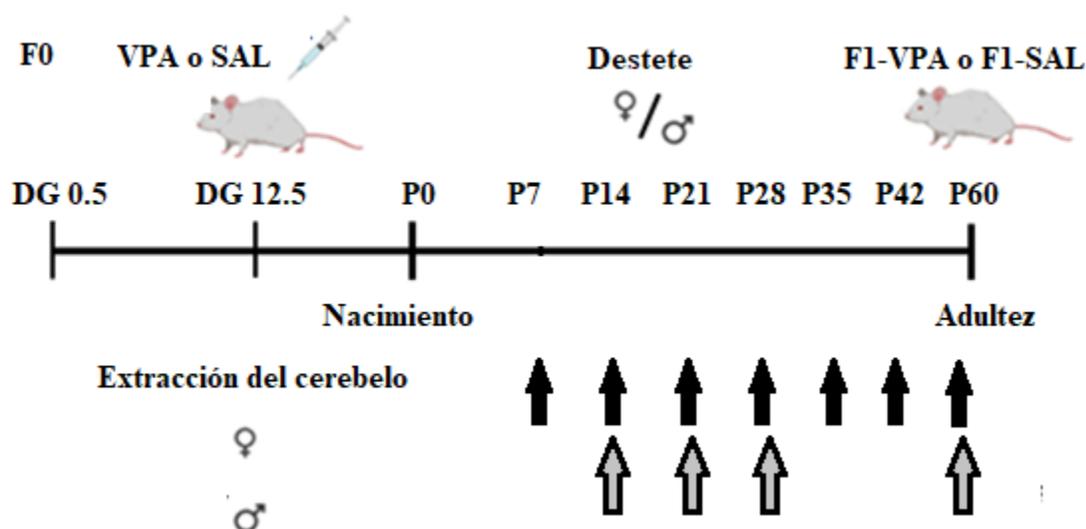


Figura III.1. Esquema del diseño experimental general. Se sacrificaron animales de la F1-VPA o F1-SAL en diferentes edades postnatales y en la adultez para determinar la densidad de las CPs de los lóbulos V, VI, y VII. Adicionalmente se determinaron en animales adultos el ancho de la capa molecular, el área y el tamaño de las CPs del lóbulo VII.

III.3. Resultados

III.3.1. Densidad de células de Purkinje en animales del modelo VPA

En la Figura III.2 podemos observar la densidad de CPs de las hembras en las diferentes edades postnatales analizadas. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las hembras F1-VPA y sus controles (Figura III.2; Tabla III.1).

Densidad de CPs en hembras durante el periodo postnatal

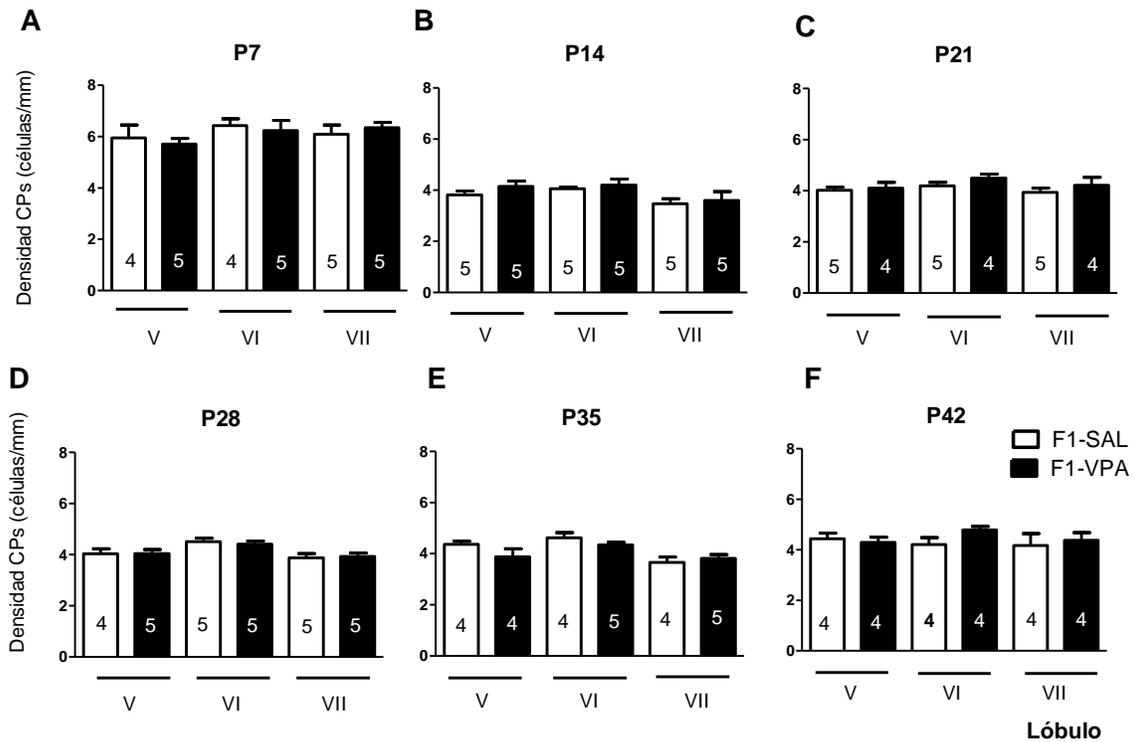


Figura III.2. Densidad de CP en las hembras durante el periodo postnatal. No se observaron diferencias en los lóbulos V, VI y VII. N, se indica en las barras. Se grafica la media + E.E.

Edad	Hembras		
	Lóbulo V	Lóbulo VI	Lóbulo VII
P7	F(1,7)= 0.23 p= 0.6473	F(1,7)= 0.15 p= 0.7100	F(1,8)=0.41 p= 0.5418
P14	F(1,7)= 0.0067 p= 0.9800	F(1,8)= 0.29 p= 0.6060	F(1,8)= 0.06 p= 0.8177
P21	F(1,7)= 0.12 p= 0.7369	F(1,7)= 2.19 p= 0.1821	F(1,7)= 0.70 p= 0.4295
P28	F(1,7)= 0.00067 p= 0.9800	F(1,8)= 0.29 p= 0.6060	F(1,8)= 0.06 p= 0.8177
P35	F(1,6)= 2.04 p= 0.2030	F(1,7)= 1.82 p= 0.2190	F(1,7)= 0.42 p= 0.5381
P42	F(1,6)= 0.21 p= 0.6639	F(1,6)= 3.65 p= 0.1048	F(1,6)= 0.13 p= 0.7277
P60 (Adultez)	F(1,6)= 0.07 p= 0.7981	F(1,6)= 0.20 p= 0.6727	F(1,6)= 0.0041 p= 0.9845

Tabla III.1. Análisis estadístico de la densidad de células de Purkinje en el desarrollo postnatal y adultez de las hembras.

Por otro lado, en los machos se registró una disminución en la densidad de CPs en P14 en los lóbulos V y VI. Llamativamente, en P21 se observó un nivel aumentado de CPs en los lóbulos V y VII (Figura III.3, Tabla III.2).

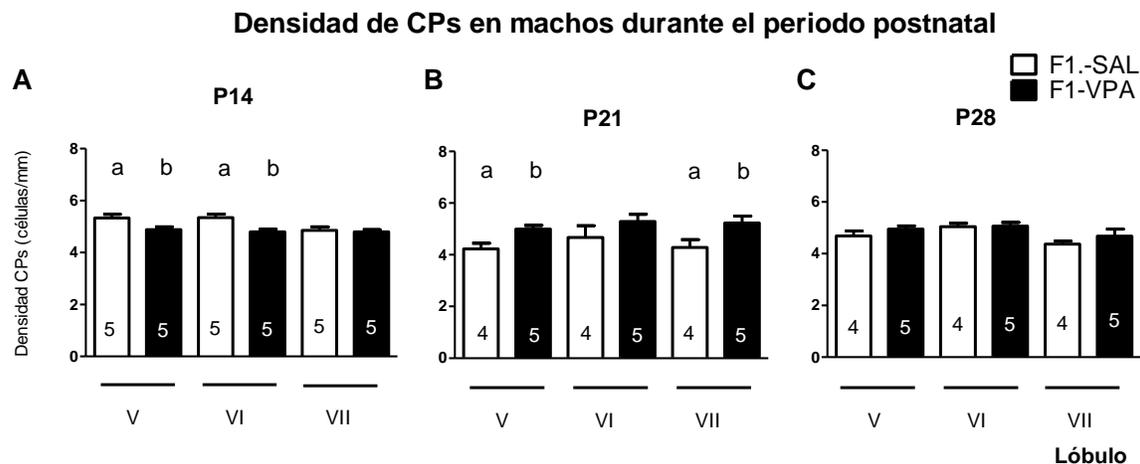


Figura III.3. Densidad de CPs en los machos de edades postnatales P14, P21 y P28. Se observó una reducción en la densidad de CPs en los lóbulos V y VI en P14 para los animales F1-VPA (A). En P21 se registró un nivel aumentado de CPs en los lóbulos V y VII para los animales F1-VPA (B). No se observaron diferencias entre los grupos en P28 (C). N, se indica en las barras. ANOVA de un factor: letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Se grafica la media + E.E.

Edad	Machos		
	Lóbulo V	Lóbulo VI	Lóbulo VII
P14	F(1,8)= 5.74 p= 0.0434	F(1,8)= 11.82 p= 0.0089	F(1,6)= 0.11 p= 0.7492
P21	F(1,7)= 9.04 p= 0.0197	F(1,6)= 1.53 p= 0.2566	F(1,7)= 5.65 p= 0.0491
P28	F(1,7)= 1.46 p= 0.2699	F(1,7)= 0.0012 p= 0.9101	F(1,7)= 0.90 p= 0.3751
P60 (Adultez)	F(1,7)= 3.40 p= 0.1076	F(1,7)= 0.28 p= 0.6117	F(1,7)= 0.79 p= 0.4040

Tabla III.2. Análisis estadístico de la densidad de células de Purkinje en los días P14, P21, P28 y adultez de los machos. ANOVA de un factor. En negrita se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$).

En los animales adultos no se registraron diferencias en la densidad de CPs en ninguno de los lóbulos analizados, independientemente del sexo de los animales (Figura III.4, Tablas III.1 y III.2).

Densidad de CPs en animales adultos

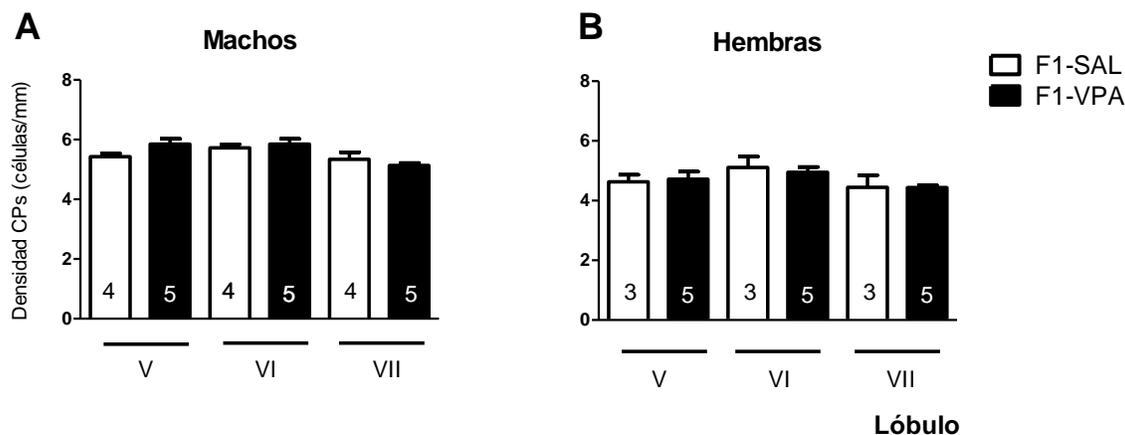


Figura III.4. Densidad de CPs en los lóbulos V, VI y VII en machos y hembras adultos. No se observaron diferencias en la densidad de CPs en los lóbulos analizados en machos (A) ni en hembras (B). N, se indica en las barras. ANOVA de un factor. Se grafica la media + E.E.

III.3.2. Parámetros morfométricos en ratones adultos del modelo VPA

Dado que en los pacientes con autismo se ha reportado una disminución del volumen del lóbulo VII y en el tamaño de las CPs (Fatemi et al., 2002, Kaufmann et al., 2003), se analizaron diferentes parámetros morfométricos en el lóbulo VII de ratones adultos de la F1-VPA y F1-SAL (Figura III.5). Observamos que no hay diferencias significativas en el ancho de la capa molecular, en el área del lóbulo VII ni en el tamaño de las CPs cerebelares (Figura III.6; Tabla III.3)

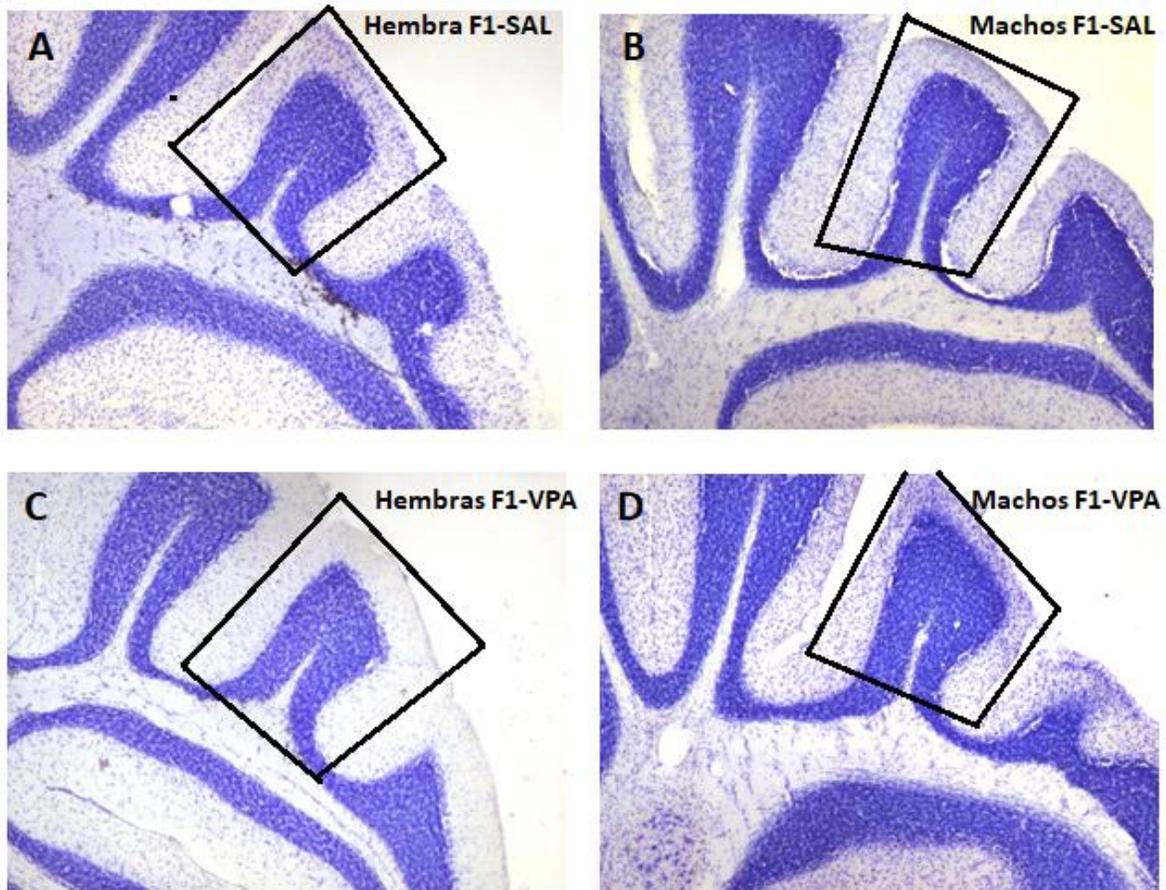


Figura III.5. Aspecto morfológico del cerebelo de ratones del modelo VPA. Fotografías representativas de corte sagital del cerebelo del ratón (4X). En las fotografías se indica el lóbulo VII de las hembras F1-VPA (C) y su control (A), así como el de los machos F1-VPA (D) y su respectivo control (B).

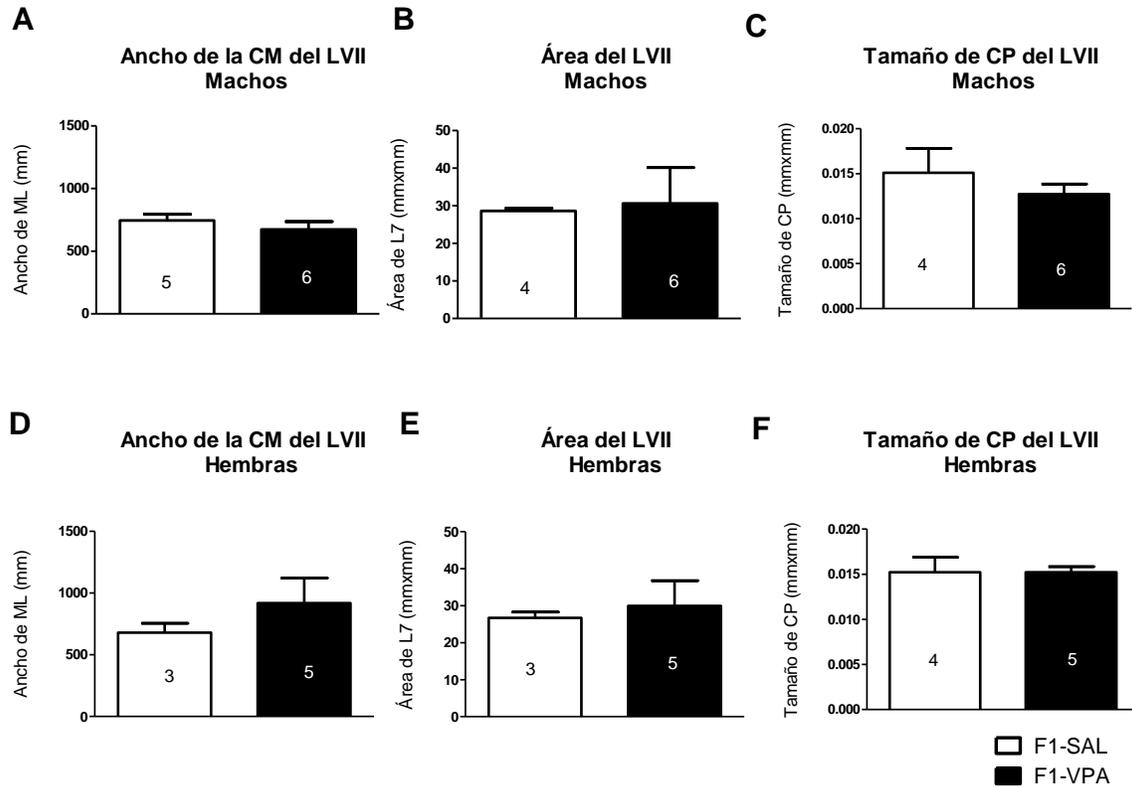


Figura III.6. Parámetros morfométricos del lóbulo VII cerebelar en machos y hembras adultos. No se registraron diferencias en el ancho de la capa molecular (A y D), en el área del lóbulo VII (B y E), ni el tamaño de las CPs (C y F) en los animales analizados. N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

	Machos	Hembras
Ancho de CM	F(1, 9)= 0.77 p= 0.4025	F(1, 6)= 3.69 p= 0.1033
Tamaño del Lóbulo VII	F(1, 8)= 0.16 p= 0.6970	F(1, 6)= 0.61 p= 0.4647
Tamaño de CP	F(1, 8)= 3.80 p= 0.0872	F(1, 7)= 0.00049 p= 0.9946

Tabla III.3. Análisis estadístico de los parámetros morfométricos del lóbulo VII. CM: Capa molecular, CP: Célula de Purkinje.

III.3.3. El cerebelo y el circuito de la recompensa en el modelo VPA: Cuantificación de las células c-Fos-positivas en el área tegmental ventral

El cerebelo ha sido ampliamente estudiado en cuanto a su rol en la coordinación motora, sin embargo cada vez hay más evidencia que sugiere que esta estructura también puede estar involucrada en funciones no motoras (Rapoport et al., 2000).

En el trabajo reciente de Carta et al. (2019) estudiaron la relación estructural y funcional entre el cerebelo y el circuito de la recompensa, el cual está relacionado con el comportamiento social. Las proyecciones dopaminérgicas que llegan al área tegmental ventral (VTA) son una de las principales vías por las cuales el cerebro controla el circuito de la recompensa. Hasta hace poco estaba descripto que las únicas vías por las cuales el cerebelo podía modular a la VTA eran indirectas. En este nuevo trabajo los autores proponen y demuestran que existe una vía directa entre el cerebelo y la VTA, la cual permite la modulación de la sociabilidad y el circuito de la recompensa.

Teniendo en cuenta estos resultados decidimos evaluar la activación del VTA en los animales del modelo VPA. Para esto se realizó la inmunohistoquímica para detectar c-Fos, un gen de respuesta temprana cuya expresión aumenta con la actividad neuronal, en los cortes de ratones de la F1-VPA y sus controles. Para ello, se montaron los cortes y se identificaron aquellos que presentaban la VTA anterior y la VTA posterior utilizando el Atlas (Paxinos & Franklin, 2004). Luego se cuantificaron las células c-Fos-positivas en la VTA de los machos adultos del modelo. En la Figura III.7 podemos observar una tendencia a un aumento en la densidad de células c-Fos-positivas en la VTA posterior, aunque este no es estadísticamente significativo [$F(1, 11) = 1.72$ $p = 0.2159$]. Por otro lado, no se observaron diferencias en la densidad de células c-Fos-positivas en la VTA anterior [$F(1, 13) = 0.14$ $p = 0.7109$] (Figura III.7).

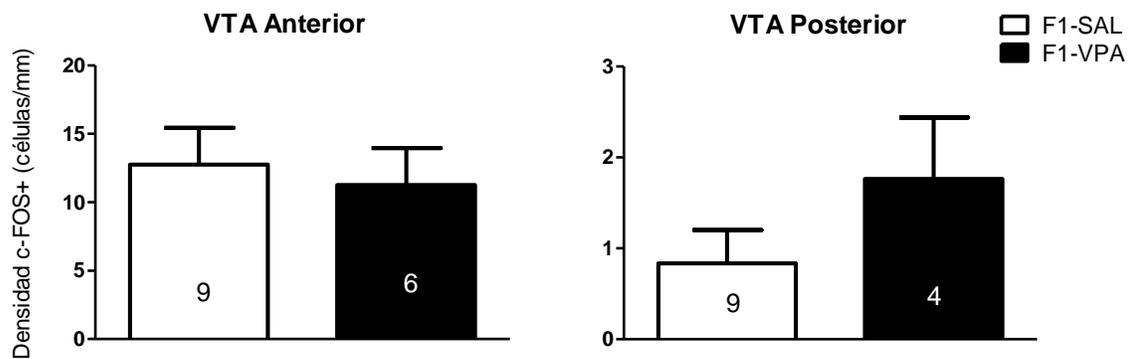


Figura III.7. Densidad de células c-Fos+ en la VTA anterior y posterior de ratones del modelo VPA. No se observaron diferencias en la densidad c-Fos+ en la VTA anterior o posterior de ratones VPA respecto de su control.

III.4. Conclusiones y discusión

Debido a que el modelo VPA es capaz de recapitular el déficit de sociabilidad observado en pacientes con DEA, nuestro interés en este capítulo fue determinar si alguna de las alteraciones estructurales del cerebelo frecuentemente observadas en los individuos con DEA también se encontraban presentes en este modelo. En un trabajo previo del grupo se observaron signos de neuroinflamación cerebelar crónica (Lucchina & Depino, 2013), un fenómeno que también se observa en los pacientes con DEA (Vargas et al., 2005). En base a dichos antecedentes, nos resultó interesante analizar qué otras alteraciones cerebelares estaban presentes en el modelo.

Las CPs son neuronas excitatorias de gran tamaño, que presentan cerca de 200000 sinapsis y una gran demanda metabólica. Kern (2003) propone que estas características hacen que las CPs sean más susceptibles que otras células a sufrir eventos de muerte por isquemia o por la toxicidad generada por la sobreactivación de receptores excitatorios. Los precursores neuronales de las CPs son los primeros tipos celulares de la corteza cerebelosa que se generan, observándose entre el DG13 y el DG15 en los roedores (Carletti & Rossi, 2008). Luego se dividen mitóticamente y migran entre el DG13 y el DG17, a través de las fibras gliales hasta su localización final. Las hipótesis que explican la relación entre la pérdida en las CPs y su efecto sobre el funcionamiento del cerebelo son variables. Algunos

autores sugieren que las alteraciones en la función cerebelar son consecuencia de que ante una eventual pérdida de las CPs, las CPs sobrevivientes podrían presentar multi-inervaciones por parte de las fibras trepadoras provenientes de la oliva inferior (Hampson & Blatt, 2015). Otros autores han encontrado que las CPs remanentes en los hemisferios cerebelares tienen menores niveles de mRNA GAD67, lo que sugeriría una alteración en la conectividad funcional entre esta región y los núcleos profundos del cerebelo (Yip et al., 2017). Por otro lado, autores como Shi et al. (2009) reportaron una reducción en las CPs en el lóbulo VII del cerebelo de ratones adultos utilizando el modelo de MIA. Ellos proponen que el tratamiento prenatal de las hembras preñadas con PolyI:C puede derivar en un aumento de las citoquinas que altere la migración de estas células y que afecte a la proliferación de los precursores de las CPs. Al igual que en el modelo de MIA, para generar el modelo VPA inyectamos a las hembras en el DG12.5, por lo que esto coincide con la ventana en la que los precursores de las CPs se están generando.

En nuestro modelo no hemos observado que los animales adultos mostraran una menor densidad de CPs en el lóbulo VII, sin embargo al analizar diferentes edades del periodo postnatal pudimos observar que hay alteraciones en la densidad de estas células en los machos. Es interesante notar que el desarrollo de las CPs continúa durante las primeras tres semanas postnatales, cuando las células de Purkinje establecen sus conexiones neuronales y dendríticas (Sotelo & Dusart, 2009), por lo que proponemos que si bien no observamos una menor densidad de CPs en los machos adultos, las alteraciones observadas en P14 y P21 podrían estar afectando el normal establecimiento de las sinapsis. En línea con esta idea, es interesante señalar que en nuestro modelo las hembras adultas F1-VPA (que no presentan alteraciones en la densidad de CPs en el periodo postnatal) no muestran una reducción en la sociabilidad, mientras que los machos adultos F1-VPA están menos tiempo oliendo a otro macho en el ensayo de interacción social (Kazlauskas et al., 2019).

En el trabajo de Al Sagheer et al. (2018) se describieron alteraciones motoras en el modelo VPA y también se cuantificó la densidad de CPs cerebelar. Al igual que en lo reportado en nuestro trabajo, ellos no observaron diferencias en la cantidad de CPs en el lóbulo VII (región del vermis cerebelar). Pero reportaron que los animales machos adultos presentaban una reducción del 28% en la densidad de CPs en la región Crus I y una

tendencia a presentar el mismo efecto en las hembras. También reportaron un efecto similar en la región Crus II en hembras, pero no en los machos. Tanto las regiones Crus I como la Crus II son sublóbulos del hemisferio cerebelar que se encuentran circundantes al lóbulo VII vermal. Estos autores sugieren que la reducción de CPs en la región Crus I correlaciona con la disminución de la interacción social en machos. Adicionalmente, Stoodley et al. (2012) caracterizaron que el rol de este sublóbulo estaba vinculado a la comunicación y al habla en humanos. Si bien en nuestros resultados no observamos una disminución de CPs en los lóbulos elegidos, sería interesante analizar la región Crus I en los machos y Crus II de las hembras en nuestro modelo con el fin de determinar si también presentan alteraciones en estas regiones.

Los lóbulos VI y VII son conocidos como el vermis oculomotor, debido a su función asociada al movimiento de los ojos. Pierce & Courchesne (2001) fueron de los primeros en describir la relación entre la hipoplasia vermal del lóbulo VI/VII con la exploración visual-espacial. Estos lóbulos controlan los movimientos sacádicos de los ojos y el movimiento de la cabeza, los cuales son esenciales en la exploración del entorno (Godschalk et al., 1994). Sin embargo, estudios de neuroimágenes sugieren que el cerebelo no está vinculado solamente con funciones de coordinación motora, sino que también participa en funciones cognitivas (Leiner et al., 1993). Estudios más recientes en modelos animales han propuesto que incluso participa en la regulación de las emociones y la interacción social (Carta et al., 2019). Esa asociación entre la anatomía del cerebelo y la sociabilidad también fue reportada en modelos animales de autismo por DeLorey et al. (2008). En este trabajo los autores utilizaron un mutante para el receptor β_3 de GABA_A, el cual presentaba una disminución en los niveles de sociabilidad y una marcada hipoplasia en la zona del vermis del lóbulo II al VII inclusive. En nuestro trabajo no encontramos alteraciones en el área del lóbulo VII, ni en machos ni en hembras adultos. Tampoco encontramos diferencias en el ancho de la capa molecular o el tamaño de las CPs del lóbulo VII, por lo que descartamos que la reducción en la sociabilidad observada en nuestro modelo esté asociada a este tipo de alteraciones estructurales.

Dada la descripción reciente de una conexión directa entre el cerebelo y los circuitos de recompensa (Carta et al., 2019), nos pareció relevante evaluar alteraciones en los niveles

de actividad neuronal en el VTA, que es la estructura que recibe inervación directa cerebelar. Según nuestro conocimiento, hay un solo trabajo que ha estudiado el circuito de recompensa en el modelo VPA (Schiavi et al., 2019). En dicho trabajo buscaron determinar si la disminución en la sociabilidad observada en ratas expuesta prenatalmente a VPA se debía a una alteración en el procesamiento de la recompensa social o si el problema estaba dado por la incapacidad de responder a los estímulos sociales. Ellos encontraron que los animales mostraron bajos niveles de sociabilidad en el ensayo de interacción social, junto con niveles alterados del receptor de dopamina en el Núcleo Acumbens. Además, al evaluar la respuesta de los animales en tres ensayos que revelan alteraciones en los circuitos de recompensa (la respuesta locomotora ante la administración de anfetaminas, la respuesta en el ensayo de preferencia a sacarosa y la respuesta ante un condicionamiento de preferencia social), observaron que los animales no mostraban diferencias respecto del control. En base a estos resultados concluyeron que las alteraciones en la sociabilidad de los animales no está vinculada a la incapacidad de experimentar el placer de la interacción social, sino más bien a aspectos cognitivos como la poca capacidad de adaptarse a los cambios en el contexto social. Estos resultados van en el mismo sentido de nuestra observación sobre los niveles de actividad basal de la VTA en los animales del modelo VPA, es decir, los animales no parecerían presentar alteraciones en esta región perteneciente al circuito de la recompensa. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder concluir sobre el correcto funcionamiento del circuito en su totalidad. En particular, sería interesante estudiar los niveles de activación del VTA frente a la exposición a un estímulo social.

En resumen, nuestros resultados indican que los animales VPA presentan alteraciones en la densidad de CPs durante el periodo postnatal, pero que estas no persisten hasta la adultez. Adicionalmente, la reducción de la sociabilidad en nuestro modelo no está acompañada por alteraciones en el tamaño lobular, el ancho de la capa molecular del lóbulo VII, o en el tamaño de las CPs presentes en el mismo, que sí se observan en algunos cerebros *postmortem* de individuos con DEA. Nuestros resultados también sugieren que no hay alteraciones en regiones claves del circuito de la recompensa como la VTA en este modelo.

Si bien la mayor parte de este análisis del cerebelo de animales VPA arrojó resultados negativos, los mismos fueron muy relevantes para descartar alteraciones en esta estructura en condiciones donde observamos cambios en la activación glial, y por ello fueron incluidos en dos publicaciones:

Kazlauskas, N., Campolongo, M., Lucchina, L., Zappala, C., Depino, A.M. (2016).

Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, 72, 11–21.

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*, 110:104441.

Capitulo IV. Rol de la neuroinflamación del lóbulo VI/VII cerebelar en la sociabilidad

IV.1. Punto de inicio

Como ya mencionamos, diferentes estudios en la clínica sugieren que existe una relación entre el estado inflamatorio exacerbado y el autismo. Las causas que subyacen a esta respuesta exacerbada están relacionadas con alteraciones en el funcionamiento del sistema inmune (Vargas et al., 2005, Li et al., 2009, Tetreault et al., 2012, Kern et al., 2016). Además, sabemos que ciertas regiones del cerebro (en particular el cerebelo) de pacientes con autismo muestran signos de neuroinflamación crónica (Vargas et al., 2005). Nuestro grupo ha descrito que existe una relación funcional entre la neuroinflamación cerebelar y la sociabilidad (Lucchina & Depino, 2013). Se reportó que la inyección estereotáxica de LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo de ratones genera una disminución en la interacción social. En este trabajo, nos preguntamos si con un tratamiento previo con anti-inflamatorios sistémicos se puede impedir que se manifieste el efecto del LPS sobre la conducta. Además, buscamos discernir entre posibles mecanismos de acción del agente inflamatorio sobre el tejido nervioso y evaluar el rol de la microglia en los mismos.

El **objetivo general** de este capítulo fue identificar los mecanismos mediante los cuales la neuroinflamación en el lóbulo VI/VII del cerebelo genera una reducción en la sociabilidad.

IV.2. Diseño experimental

Elegimos el ensayo de interacción social para determinar los niveles de sociabilidad en los ratones. El mismo presentó dos etapas: la primera fue una habituación, en la cual el ratón recorrió una arena experimental con la posibilidad de visitar dos cámaras que contienen dos cilindros vacíos. En la segunda etapa, se colocó en uno de los cilindros un ratón (estímulo social) o en el otro un objeto. Se registró el tiempo que el ratón olió cada uno de los cilindros en ambas etapas. La etapa de habituación nos permitió determinar si el animal presentaba preferencia por alguno de los lados antes de colocar el estímulo social y el objeto en los cilindros. La siguiente etapa nos brindó información sobre los niveles de sociabilidad de los animales.

En este experimento trabajamos con ratones naive machos adultos de la cepa CF1. El diseño experimental que utilizamos comenzó con la realización de un ensayo de interacción social (ensayo de interacción “social inicial”, para diferenciarlo de otro ensayo posterior) (Figura IV.1). La cepa CF1 es exocriada y presenta gran variabilidad en cuanto al tiempo que huelen un estímulo social, por ello establecimos un criterio para incluir a los animales en el experimento: solamente elegimos a los ratones que mostraron niveles de sociabilidad altos en el ensayo “social inicial”. Así, el criterio de inclusión fue que hubiesen olido el estímulo social por más de 70 segundos y que hubiesen explorado poco tiempo el estímulo no social. Por otro lado, se excluyeron los animales que habían olido el lado social más de 200 segundos, para mantener los grupos homogéneos.

Seis días más tarde del ensayo de interacción social inicial realizamos una inyección estereotáxica de LPS o salina (SAL) en el lóbulo VI/VII del cerebelo (una hora antes realizamos una inyección intraperitoneal de SAL). A estos grupos los llamamos SAL-LPS y SAL-SAL respectivamente. La inyección la realizamos en esta zona basados en antecedentes que indican que este lóbulo está implicado en la conducta social en ratones (Shi et al., 2009, Lucchina & Depino, 2013, Al Sagheer et al., 2018). Con el fin de conocer el mecanismo de acción por el cual la inyección de LPS cerebelar genera la reducción en la sociabilidad, se inyectaron los animales de manera intraperitoneal con ibuprofeno (IBU) o dexametasona (DEXA) una hora antes de la inyección estereotáxica de LPS o SAL. A estos grupos los llamamos IBU-LPS, IBU-SAL, DEXA-LPS y DEXA-SAL. Estos dos anti-inflamatorios fueron elegidos porque actúan a través de diferentes mecanismos moleculares (Teeling et al., 2010).

Luego de que los animales se recuperaron de la anestesia, fueron devueltos a su jaula y a la sala del comportamiento del Bioterio Central. Transcurridas las 24 horas de la operación, evaluamos en un segundo ensayo la sociabilidad de los animales (este nuevo ensayo lo llamamos “social post-inyección”).

Dos horas después de evaluar la interacción social post-inyección los animales fueron perfundidos y sus cerebelos fueron extraídos, congelados y cortados. Se realizó la tinción de Nissl en cortes seriados y se confirmó la correcta inyección en el lóbulo VI/VII.

Los animales que no recibieron la inyección estereotáxica en el sitio de interés fueron descartados del experimento.

Cabe aclarar que en nuestro laboratorio se demostró que el hecho de exponer a los ratones a un test de interacción social y repetirlo a la otra semana no genera cambios en el tiempo absoluto o relativo que el animal pasa explorando al estímulo social o en su locomoción (y esto también se puede verificar en el grupo SAL-SAL).

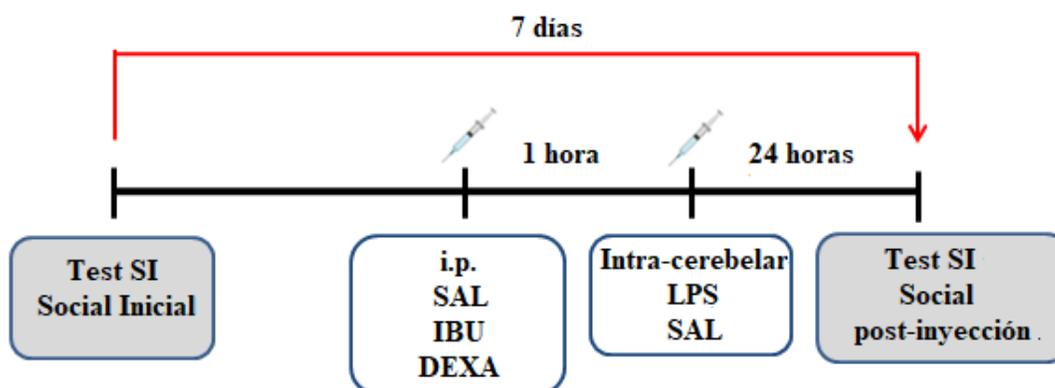


Figura IV.1. Diseño experimental utilizado. Utilizamos ratones naive machos adultos de la cepa CF1. Se realizó un test de interacción social (SI) para determinar la sociabilidad basal de los animales (ensayo social inicial) y se seleccionó a los animales sociables. Seis días después se realizó una inyección estereotáxica intra-cerebelar en el lóbulo VI/VII de LPS o SAL. Según el grupo experimental asignado los animales recibieron una inyección intraperitoneal de SAL, IBU o DEXA 1 hora antes de la inyección estereotáxica en el cerebelo. Se evaluaron los niveles de sociabilidad 24 horas después de la operación (ensayo social post-inyección).

IV.3. Resultados

IV.3.1. Efecto del tratamiento sistémico con drogas anti-inflamatorias sobre la sociabilidad en animales inyectados con LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo.

En la Figura IV.2 observamos la respuesta de los animales durante los dos ensayos: el ensayo social inicial y ensayo social post-inyección. Reportamos las dos etapas del test: la exploración de los animales en la etapa de habituación (tiempo oliendo el cilindro de los lados izquierdo y derecho), y el tiempo oliendo el cilindro conteniendo el estímulo social (lado social) y el que contenía el objeto (lado no social).

Los animales inyectados con LPS olieron menos tiempo el lado social en el ensayo post-inyección respecto al ensayo social inicial [$t(4)= 3.94$ $p= 0.017$]. También registramos una reducción en el tiempo que huelen el lado no social [$t(4)=3.94$ $p= 0.0408$] (Figura IV.2B). Estos resultados confirman los reportados en el trabajo de Lucchina & Depino (2013), en cuanto a que la inyección de LPS en el lóbulo VI/VII disminuye los niveles de sociabilidad. Sin embargo, los niveles de exploración en la etapa de habituación fueron similares a los del social inicial, indicando que los resultados obtenidos no se deben a una disminución generalizada en la exploración causada por el LPS.

Por otro lado, en el grupo SAL-SAL no se observaron diferencias en el tiempo oliendo el lado social [$t(4)= 0.20$ $p= 0.8506$] o el lado no social luego de la inyección estereotóxica de salina [$t(4)= 0.17$ $p= 0.8755$] (Figura IV.2A). Esto nos indica que la pequeña lesión que genera el capilar *per se*, o el hecho de haber atravesado la operación, no afectan los niveles de sociabilidad de los animales.

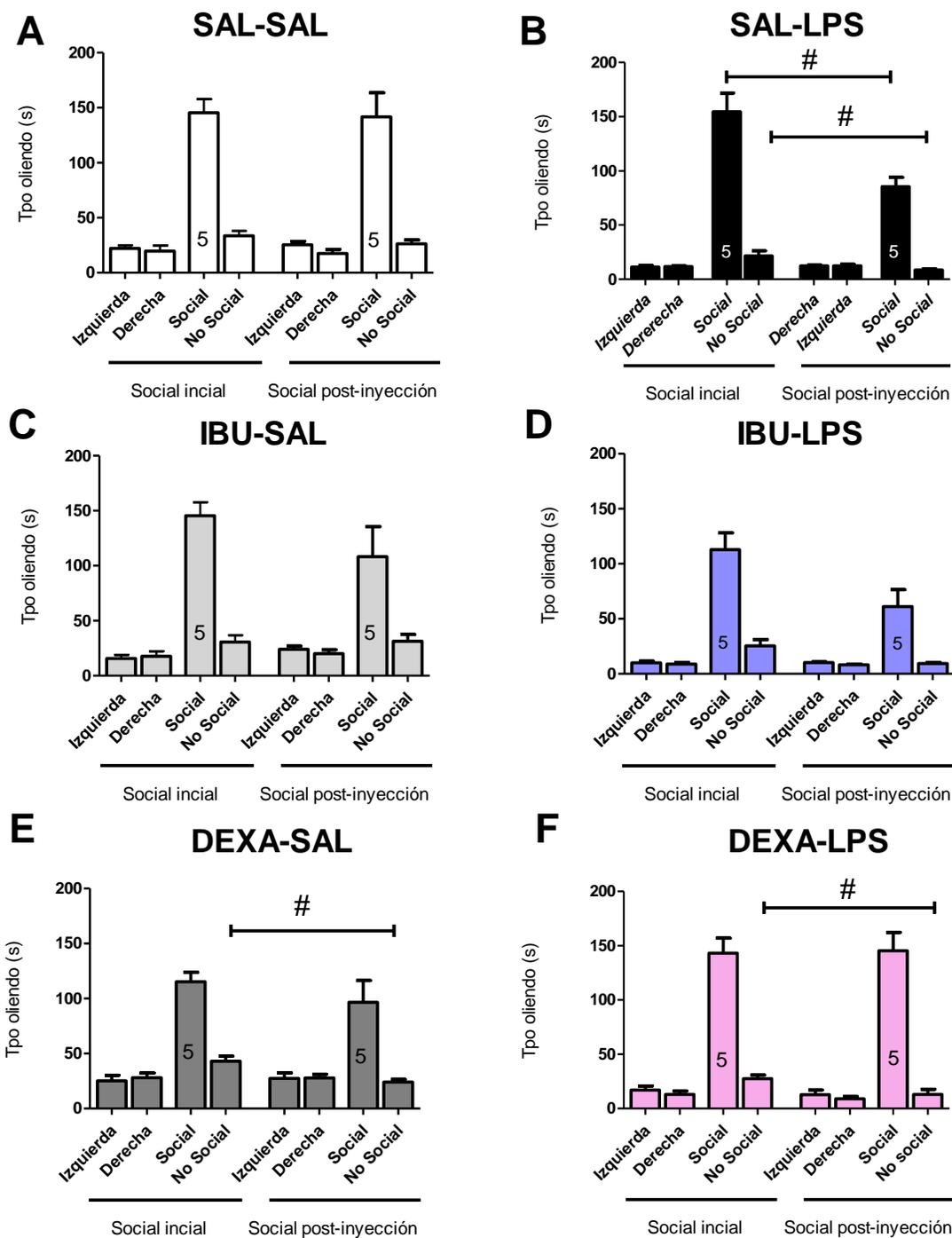


Figura IV.2. Efecto del tratamiento sistémico con drogas anti-inflamatorias sobre la sociabilidad en animales inyectados con SAL o LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo. La inyección de LPS intra-cerebelar reduce los niveles sociabilidad (B). El pretratamiento con ibuprofeno bloquea parcialmente este efecto (D), mientras que el pretratamiento con dexametasona lo hace totalmente (F). No se observan efectos del ibuprofeno, la dexametasona o la inyección por sí mismos en los niveles de sociabilidad (A, C y E). N, en cada barra. Prueba de t-pareada # $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E.

Para evaluar por cuáles mecanismos de acción el LPS podría desencadenar cambios en la sociabilidad, decidimos analizar el efecto de dos anti-inflamatorios distintos. Como mencionamos, estos agentes tienen diferentes blancos moleculares y fueron administrados una hora antes de la inyección estereotáxica.

En la Figura IV.2D observamos que el efecto esperado por la inyección de LPS puede ser evitado parcialmente con la administración sistémica de ibuprofeno una hora antes. En el grupo IBU-LPS no encontramos diferencias significativas en el tiempo oliendo el lado social post-inyección y el tiempo registrado en el lado social la semana anterior [$t(4) = 2.53$ $p = 0.0645$], sin embargo hay que mencionar que hay una tendencia marcada a que la exploración del estímulo social sea menor (Figura IV.2D). En base a este resultado, concluimos que el ibuprofeno estaría impidiendo que se manifieste el efecto del LPS sobre la sociabilidad de manera parcial.

Por otro lado, los animales tratados con dexametasona una hora antes de la inyección con LPS mostraron tiempos de exploración post-inyección muy parecidos a los observados en el test de interacción inicial [$t(4) = -0.18$ $p = 0.8638$]. La administración previa de dexametasona estaría impidiendo por completo el efecto del LPS sobre la conducta (Figura IV.2F). Un efecto llamativo e inesperado que registramos es que los animales tratados con DEXA olieron menos tiempo el lado no social en el ensayo post-inyección (Figura IV.2F y IV.2E). Como veremos más adelante, los niveles de exploración del grupo DEXA-SAL y DEXA-LPS no muestran diferencias en el tiempo total de exploración entre el social inicial y el post-inyección (Figura IV.3), por lo que el hecho de que los animales hayan olido menos tiempo el lado no social en el ensayo post-inyección no cambia nuestra interpretación sobre el efecto de la dexametasona sobre la sociabilidad observada en el grupo DEXA-LPS. Suponemos que esta disminución en el tiempo oliendo el lado no social puede ser consecuencia de que los animales hayan presentado mucho menos interés por el lado no social en el ensayo post-inyección respecto del social inicial. Si bien este efecto debe ser estudiado en más detalle, consideramos que el mismo no cambia la interpretación de los resultados en cuanto a la sociabilidad de los animales (tiempo oliendo el lado social), ya que este efecto se observa en ambos grupos experimentales. Además podemos considerar que el hecho de que los animales pasen menos tiempo en el lado no social no

quiere decir que estén forzados a estar más tiempo en el lado social, ya que pueden estar también en centro de aparato. Finalmente, estamos reportando el tiempo que los animales pasan oliendo activamente alguno de los cilindros, lo cual nos permite independizarnos del lugar que eligen los animales por ejemplo para descansar.

Al analizar el tiempo oliendo el lado social antes y después de la inyección cerebelar en los grupos IBU-SAL y DEXA-SAL descartamos que la inyección sistémica de ibuprofeno o dexametasona tengan algún efecto en la sociabilidad [IBU-SAL: $t(4)= 1.524$ $p= 0.2022$, DEXA-SAL: $t(4)= 0.6801$ $p= 0.5344$] (Figuras IV.2C y IV.2E). Al analizar el tiempo que los animales huelen el lado no social, vemos que tanto el grupo SAL-SAL, como los inyectados con IBU muestran similares niveles de exploración antes y después de la inyección intra-cerebelar.

Ninguno de los grupos experimentales mostró una preferencia por alguno de los lados durante la etapa de habituación en el ensayo social inicial o post-inyección (Figura IV.2, Tabla IV.1).

Tratamiento	Social inicial (Habituaación)			Social post-inyección (Habituaación)		
	Tpo izquierda vs Tpo Derecha			Tpo izquierda vs Tpo Derecha		
	gl	t	P	gl	t	P
SAL-SAL	4	1.13	0.3233	4	1.86	0.1368
SAL-LPS	4	0.39	0.7136	4	0.00	>0.9999
IBU-SAL	4	0.6	0.5836	4	1.13	0.3201
IBU-LPS	4	0.47	0.6609	4	1.85	0.1378
DEXA-SAL	4	0.47	0.6613	4	0.12	0.9078
DEXA-LPS	4	0.83	0.4524	4	1.73	0.1593

Tabla IV.1. Análisis estadístico del tiempo oliendo los cilindros ubicados en la cámara derecha e izquierda durante la etapa de habituación de los ensayos de interacción social. Se muestran los parámetros obtenidos en la prueba de t-pareada obtenida por la comparación. gl, grados de libertad.

Está descripto que la administración sistémica de LPS puede generar un comportamiento conocido como *sickness behavior* (Layd et al., 1994, Dantzer, 2001). Por lo tanto, debimos controlar que los resultados obtenidos en los grupos inyectados con LPS no se debiesen a este comportamiento relacionado a enfermedad. El *sickness behavior* está

caracterizado por una disminución en la exploración del ambiente, de los estímulos sociales, una reducción en la actividad locomotora y pérdida de peso.

Para descartar que la reducción en el tiempo oliendo el lado social por el grupo SAL-LPS no fuera consecuencia de una disminución en la exploración general, analizamos el tiempo de exploración total durante la habituación: la suma del tiempo oliendo en el lado derecho e izquierdo. Esto nos dio una idea de los niveles de exploración y el interés del animal en ausencia del estímulo social. En la Figura IV.3D vemos que el tiempo total oliendo en la fase de habituación antes o después de la inyección no muestra diferencias significativas [$t(4) = 1.15$ $p = 0.3140$]. Lo mismo se observa en el grupo SAL-SAL (Figura IV.3.A). De haber existido una reducción en la locomoción o en la exploración del ambiente, hubiésemos esperado observarlo en la habituación post-inyección. Por lo tanto vemos que el LPS no está reduciendo el interés por la exploración en general.

Tampoco observamos diferencias en el tiempo total que los otros grupos experimentales huelen los cilindros durante las habituaciones de los ensayos de sociabilidad [IBU-SAL: $t(4) = 1.16$ $p = 0.3096$, IBU-LPS: $t(4) = 0.20$ $p = 0.8514$, DEXA-SAL: $t(4) = 0.15$ $p = 0.8709$, DEXA-LPS: $t(4) = 1.34$ $p = 0.2505$]. Esto nos indicó que la exploración general de los animales no se vio afectada por la administración de anti-inflamatorios (Figuras IV.3B y IV.3C) o por la combinación entre el anti-inflamatorio y la inyección intracerebelar de LPS (Figuras IV.3E y IV.3F).

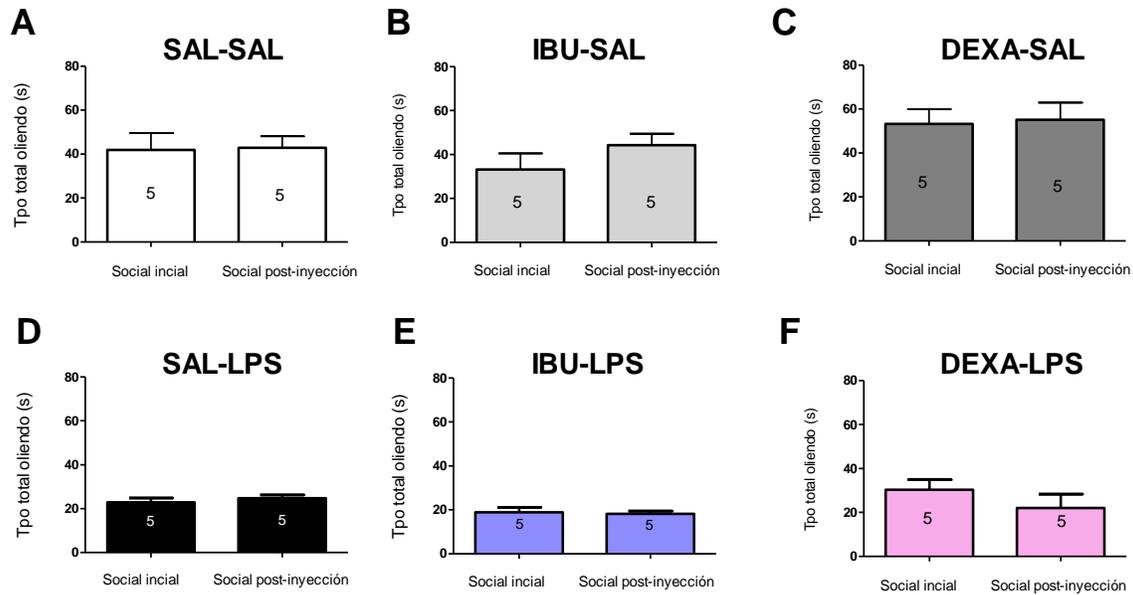


Figura IV.3. Tiempo total oliendo durante la fase de habituación antes y después de los tratamientos. En todos los grupos experimentales podemos observar que el tratamiento no alteró significativamente el tiempo que los animales huelen los cilindros durante la etapa de habituación en los ensayos de interacción social. N, en cada barra. Se grafica la media + E.E.

Además de analizar la exploración general, registramos el peso de los ratones antes y después de la inyección, y se calculó el porcentaje de pérdida de peso (Figura IV.4). Es esperable que luego de una operación estereotáxica el animal pierda un poco de peso, en particular porque pasan una hora sin comer o beber agua hasta que se despiertan de la misma y por un período posterior. Por lo general se espera que la pérdida de peso no supere en promedio el 10%.

El análisis estadístico mostró que no hay efecto asociado a la inyección intracerebelar, pero sí asociado a la inyección intraperitoneal, en cuanto al porcentaje de pérdida de peso [interacción: $F(2, 24) = 2.12$ $p = 0.1424$, iny. cer= $F(1, 24) = 0.42$ $p = 0.5251$, iny. ip: $F(2, 24) = 7.68$, $p = 0.0026$; Figura IV.4]. La prueba de comparaciones múltiples LSD Fisher indicaron que los grupos DEXA-SAL y DEXA-LPS presentaron una mayor pérdida de peso respecto a los otros grupos experimentales. Este aumento podría estar asociado a un efecto agudo mediado por la dexametona. Jahng et al. (2008) han reportado que un sola inyección de dexametasona generó a las 2 hs un aumento en los niveles de leptina en el

plasma de ratas adultas. Este efecto fue acompañado por una reducción en la ganancia en peso a las 24 hs luego de 4 inyecciones diarias. Ellos proponen que esta hormona podría estar mediando los efectos anorexígenos desencadenados a corto término por la dexametasona. Los resultados reportados en el trabajo de Jahng et al. (2008) fueron obtenidos utilizando una dosis de 1 mg/kg, mientras que nosotros utilizamos una dosis de 2 mg/kg, por lo que consideramos que nuestras observaciones son consistentes con el efecto descrito para la dexametasona.

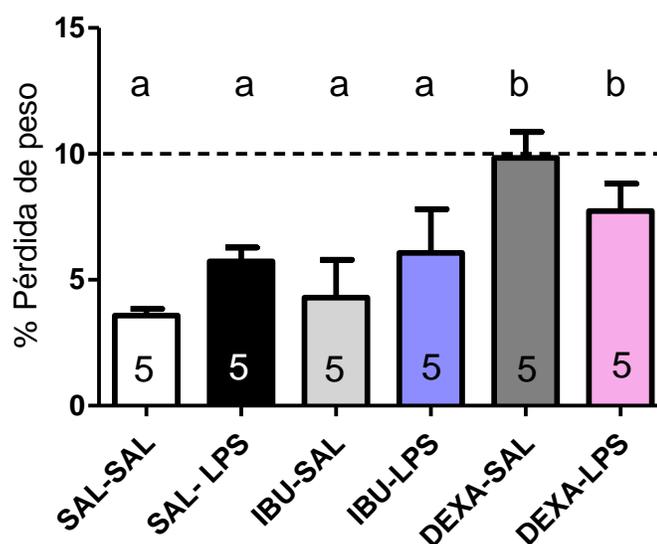


Figura IV.4. Efecto del tratamiento sistémico con drogas anti-inflamatorias sobre la pérdida de peso en animales inyectados con SAL o LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo. Podemos observar que en todos los grupos experimentales la pérdida de peso en promedio es menor al 10%. Por otro lado los animales inyectados con dexametasona muestran una mayor pérdida de peso con respecto a los otros grupos. N, en cada barra. ANOVA de dos factores seguida de la prueba de LSD Fisher: letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E

Independientemente de esto, debemos observar que la pérdida de peso de estos grupos fue prácticamente un 10%, y no superó los criterios establecidos. Por otro lado, lo más importante es indicar que estos dos grupos no mostraron un efecto diferente al de los otros en su exploración general durante la habituación luego de los tratamientos (Figuras IV.3C y IV.3F). Así que si bien estos grupos perdieron más peso que los otros, no creemos que esto haya tenido una influencia importante en la respuesta conductual.

A partir de los resultados de la exploración y del porcentaje de pérdida de peso de los grupos inyectados con LPS, concluimos que los animales no manifiestan síntomas de *sickness behavior*.

Con el fin de poder comparar los efectos de los distintos tratamientos sobre la sociabilidad, calculamos el porcentaje de tiempo oliendo el lado social (Figura IV.5). Este índice nos indica el porcentaje de tiempo oliendo el lado social en el test de interacción social post-inyección (social post-inyección) respecto del ensayo realizado una semana antes (social inicial).

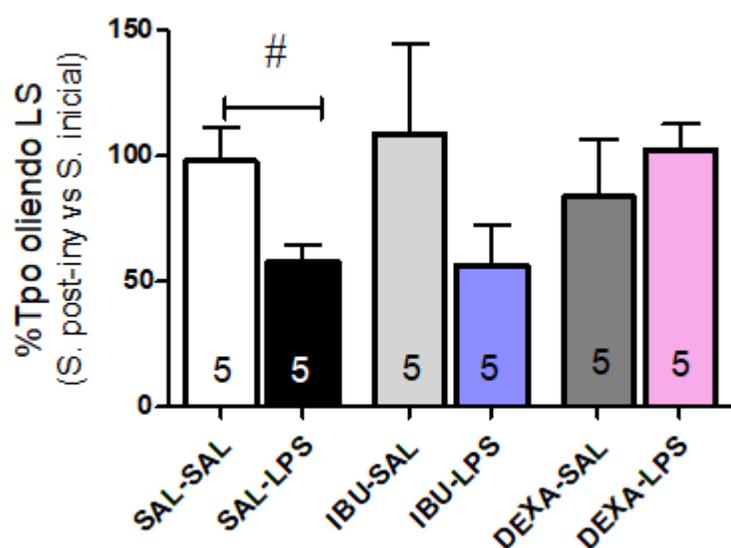


Figura IV.5. La inyección estereotáxica de LPS en el cerebelo genera una disminución en la sociabilidad que es bloqueada parcialmente mediante el pretratamiento con ibuprofeno y totalmente con dexametasona. El porcentaje de tiempo oliendo el lado social representa cuánto cambió el tiempo que el ratón huele al estímulo social en el social post-inyección en relación a los niveles de sociabilidad que presentaba inicialmente el mismo ratón. La inyección de LPS genera una disminución significativa en el tiempo que el ratón huele el estímulo social respecto a su control. Esta misma tendencia se observa entre los grupos IBU-LPS e IBU-SAL, aunque no alcanza significancia estadística. No se observan diferencias entre el grupo DEXA-SAL y DEXA-LPS. N, en cada barra. Prueba de t no pareada # $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E.

El grupo SAL-SAL presenta un porcentaje de tiempo oliendo el lado social cercano al 100%, es decir que no cambió mucho su comportamiento entre el ensayo de interacción social inicial y el ensayo de interacción social post-inyección. Esto demuestra la estabilidad

del parámetro de sociabilidad utilizado. Por otro lado, el grupo SAL-LPS mostró una reducción en el porcentaje de tiempo de un 50%, evidenciando el efecto del LPS intracerebelar sobre la sociabilidad. La comparación entre grupos muestra una reducción de la sociabilidad estadísticamente significativa [$t(8) = 2.66$ $p = 0.0287$]. Observamos esta misma tendencia entre los grupos IBU-SAL e IBU-LPS, aunque la diferencia entre grupos no es estadísticamente significativa [$t(8) = 1.33$ $p = 0.2207$]. La falta de significancia podría estar asociada al bajo número de individuos estudiados y a la dispersión observada en el grupo IBU-SAL. Por otro lado, la comparación entre el grupo DEXA-SAL vs DEXA-LPS no muestra diferencias significativas [$t(8) = 0.7436$ $p = 0.4786$].

Finalmente, concluimos que el efecto esperado de reducción de la sociabilidad generado por la inyección estereotáxica de LPS en el cerebelo puede ser bloqueado totalmente mediante el pretratamiento con dexametasona y parcialmente con ibuprofeno.

IV.3.2. Efecto del tratamiento sistémico con drogas anti-inflamatorias sobre la neuroinflamación en animales inyectados con LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo

IV.3.2.1. Cuantificación de la microglia

Para estudiar la neuroinflamación del tejido realizamos la cuantificación y caracterización de la microglia en cortes cerebelares del lóbulo VII del vermis. Para detectar a estos tipos celulares realizamos inmunofluorescencias con un anticuerpo anti-IBA-1. Dividimos además el análisis del lóbulo en capa molecular y capa granular.

En cuanto a la densidad total de microglia en la **capa molecular**, mediante un ANOVA de dos factores podemos observar un efecto de interacción entre el pretratamiento y la inyección estereotáxica [interacción: $F(2,22) = 3.64$ $p = 0.0430$], además de los efectos simples [iny. cer: $F(1,22) = 58.09$ $p < 0.0001$, iny. ip: $F(2,22) = 3.67$ $p = 0.0422$] (Figura IV.6A). La comparación entre grupos mostró que la inyección de LPS lleva a un aumento en la densidad de células microgliales en la capa molecular en todos los grupos, pero que dicho aumento es significativamente menor en el grupo DEXA-LPS.

Por otro lado, la densidad total de células microgliales en la **capa granular** mostró un efecto de la inyección estereotáxica [interacción: $F(2,22)= 2.62$ $p= 0.0957$, iny. cer: $F(1,22)= 40.81$ $p<0.0001$, iny. ip: $F(2,22): 2.38$ $p= 0.1160$]. Se observó en los grupos inyectados con LPS una densidad total significativamente mayor respecto a los grupos cuya inyección estereotáxica contenía solución salina (Figura IV.6B).

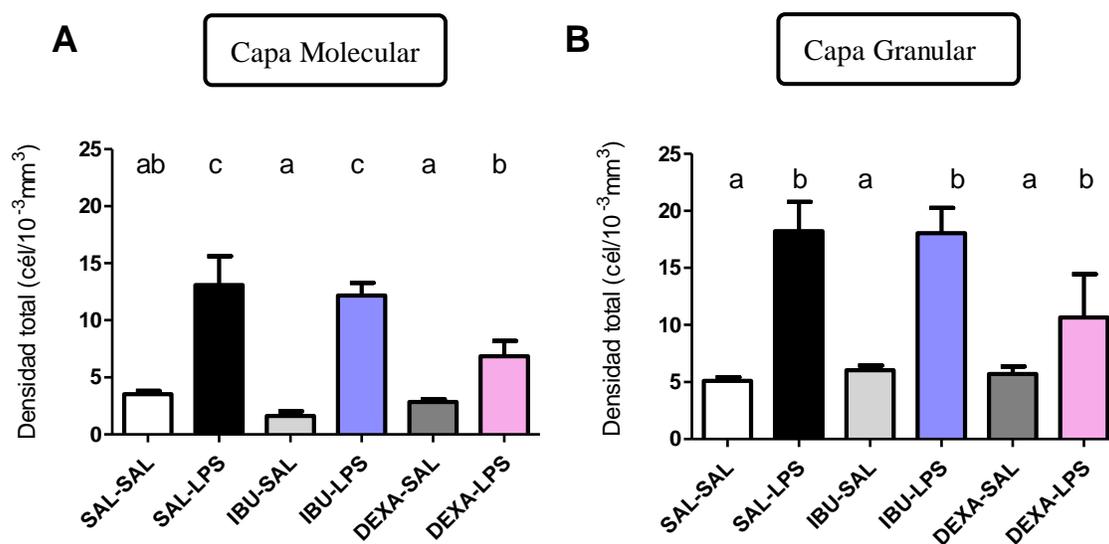


Figura IV.6. Efecto sobre la densidad total de la microglia de los anti-inflamatorios sistémicos en ratones inyectados estereotáxicamente con SAL o LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo. Los ratones de los tratamientos SAL-LPS e IBU-LPS presentan una densidad total de microglia mayor en la capa molecular que los otros grupos. A su vez no hay diferencias entre el grupo SAL-SAL y en DEXA-LPS (A). Por otro lado, se observó que la inyección estereotáxica de LPS genera un aumento en la densidad de microglia total en la capa granular, un aumento que es menos marcado en el grupo DEXA-LPS pero igualmente significativo. Todos los grupos experimentales poseen N= 5, salvo el IBU-LPS y DEXA-LPS con N= 4. ANOVA de dos factores seguido de la prueba de LSD Fisher: letras distintas indican diferencias significativas $p< 0.05$. Se grafica la media + E.E.

A partir de estos resultados concluimos que el LPS desencadenó una respuesta inflamatoria que derivó en un aumento en la densidad de microglia, incluso en presencia de las drogas anti-inflamatorias. La magnitud de la densidad de microglia observada en presencia de ibuprofeno demuestra que este tratamiento no fue eficiente para evitar que se desarrolle la respuesta inflamatoria inducida por el LPS. En cambio, los ratones tratados previamente con dexametasona desencadenaron una respuesta inflamatoria menor.

El siguiente paso fue identificar y cuantificar los diferentes fenotipos de la microglia para reconocer cuál es el que se encuentra aumentado en los diferentes grupos experimentales. Se caracterizó la morfología de la microglia según lo descrito en la Sección II.8.5.4 de Materiales y Métodos. Pudimos detectar células microgliales en reposo o tipo 1 (con procesos celulares finos y muy ramificados), aquellas que están comenzando un proceso de activación o tipo 2 (con procesos que se van acortando y engrosando), y las que alcanzan la morfología activada o tipo 4 (morfología redondeada sin procesos).

En nuestra hipótesis esperamos que los grupos tratados con el inflamógeno LPS muestren un aumento en la densidad de células de tipo 4, que corresponden al fenotipo más activado, y una menor densidad de microglia tipo 1 (estadio de reposo). En los grupos a los que se le inyectó LPS y se los trató con drogas anti-inflamatorias nuestra hipótesis es que se parecerán a los grupos control y no al grupo SAL-LPS.

En la Figura IV.7 observamos que los grupos control muestran un porcentaje predominante de microglia de tipo 1. En cambio, en los grupos SAL-LPS e IBU-LPS se observan perfiles parecidos entre sí, caracterizados por un porcentaje alto de células tipo 4, seguido por microglia de tipo 2 y por último una reducida cantidad de células de tipo 1. En el grupo DEXA-LPS este perfil parecería ser diferente, ya que en este caso observamos una menor cantidad de células de tipo 4 y una mayor cantidad de células tipo 1 con respecto a los grupos SAL-LPS e IBU-LPS. Esta tendencia se mantuvo tanto en la capa molecular como en la granular.

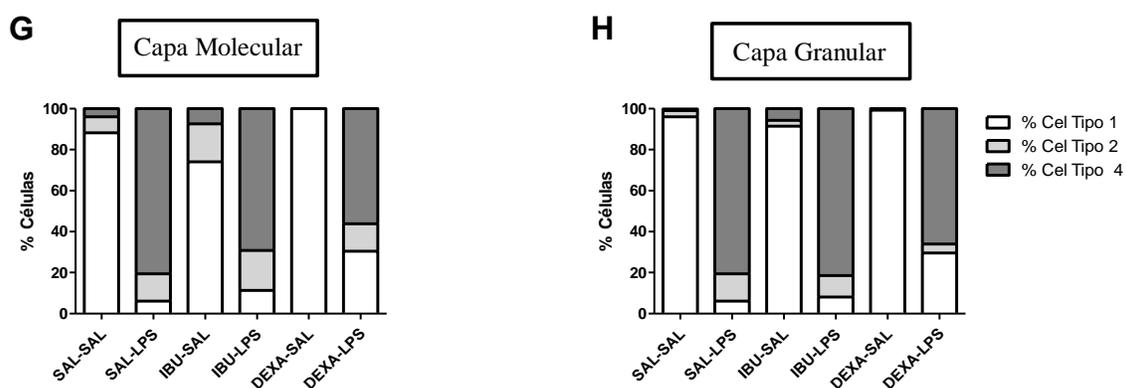
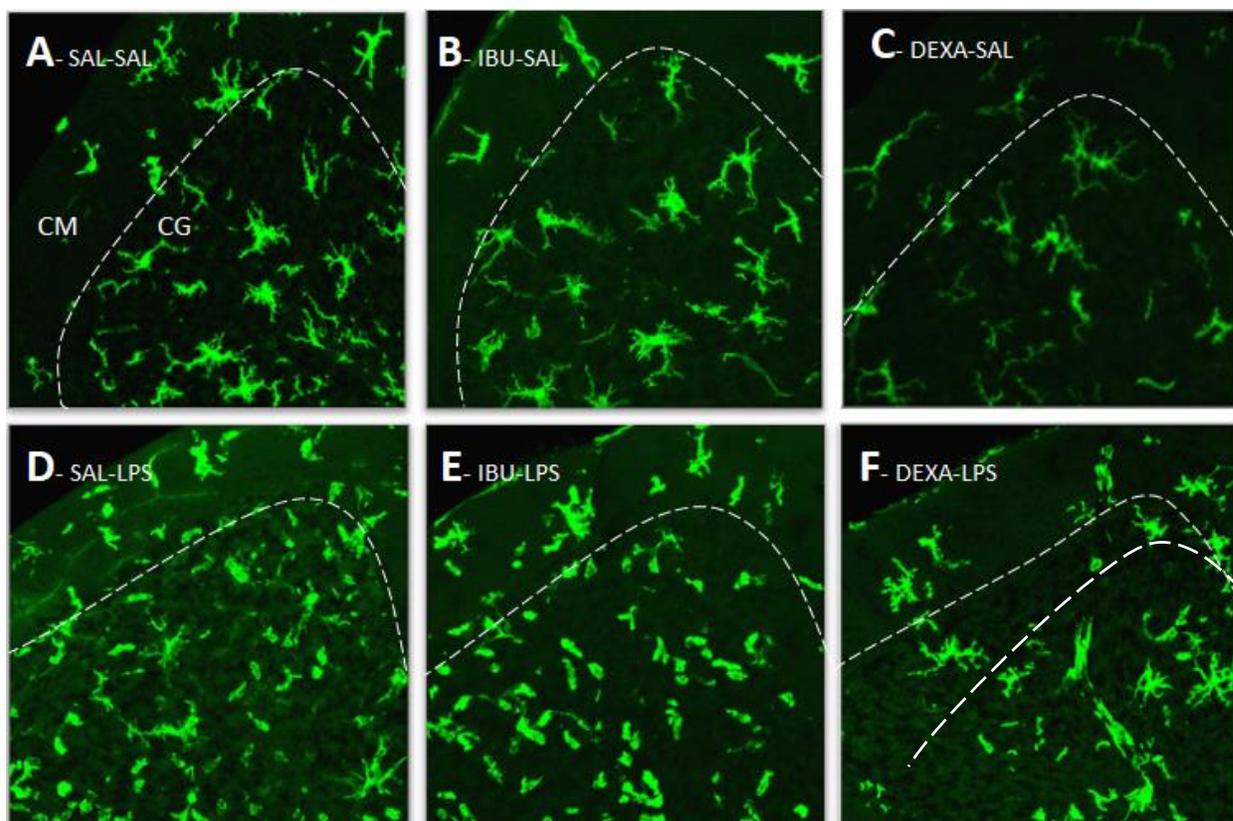


Figura IV.7. Efecto sobre la activación de la microglia de los anti-inflamatorios sistémicos en ratones inyectados estereotáxicamente con SAL o LPS en el lóbulo VI/VII del cerebelo. A-F. Inmunofluorescencia para visualizar microglia (anti-IBA-1) en ratones tratados con anti-inflamatorios sistémicos e inyectados estereotáxicamente con LPS o SAL en el lóbulo VI/VII. **G-F.** Porcentaje de los diferentes fenotipos de microglia en los diferentes grupos experimentales. En los grupos control hay un mayor porcentaje de microglia de tipo 1, mientras que en los inyectados con LPS predomina la microglia activada. El pretratamiento con dexametasona parecería reducir el efecto generado por el LPS.

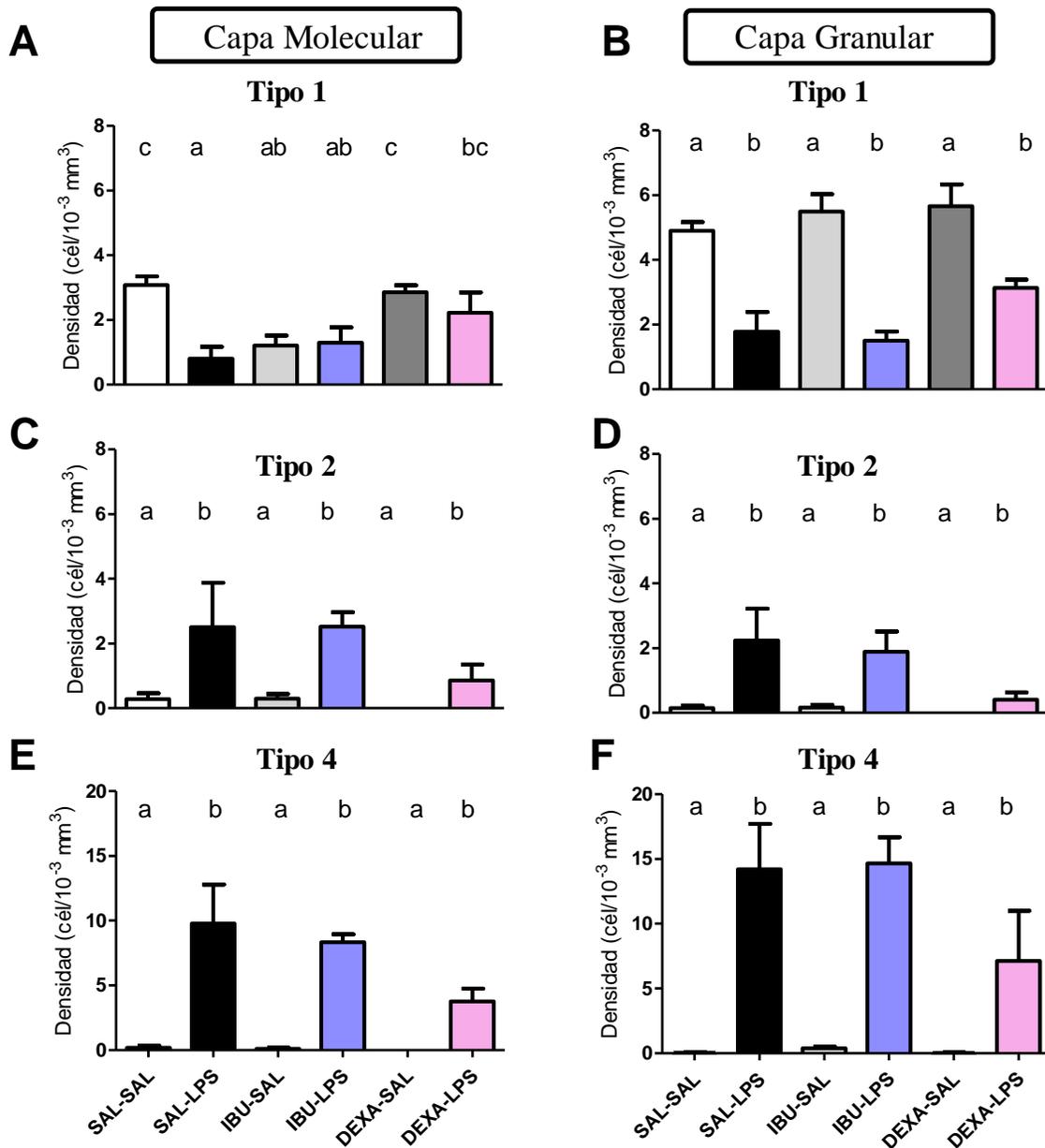


Figura IV.8. Cuantificación de los diferentes estadios morfológicos de la microglia en ratones tratados sistémicamente con anti-inflamatorios e inyectados con SAL o LPS en el cerebelo. En la capa molecular de los ratones SAL-SAL y DEXA-SAL es donde se registró la mayor densidad de microglia de tipo 1, y los niveles más bajos de la misma se observaron en el grupo SAL-LPS. Por otro lado, la microglia de tipo 2 y 4 está más representada en los ratones que recibieron la inyección estereotáxica de LPS. En la capa granular, los grupos control fueron los que mostraron una mayor densidad de microglia ramificada, mientras que en los grupos inyectados con LPS predominó la microglia de tipo 2 y la ameboides. El pretratamiento con dexametasona muestra una tendencia a disminuir el efecto del LPS en esta capa. Todos los grupos experimentales poseen N= 5, salvo el IBU-LPS y DEXA-LPS con N= 4. ANOVA de dos factores seguida de la prueba de LSD Fisher: letras distintas indican diferencias significativas $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E.

Dado que la expresión en porcentajes no nos permite realizar un análisis estadístico apropiado, comparamos a continuación la densidad de cada tipo celular.

En la **capa molecular** pudimos ver que los grupos que recibieron la inyección de LPS poseen un aumento en la densidad de microglia de tipo 2 [interacción: $F(2,22)= 0.71$ $p= 0.5034$, iny. cer: $F(1,22)= 11.02$ $p= 0.0031$, iny. ip: $F(2,22)= 1.44$ $p= 0.2582$] y activada o tipo 4 [interacción: $F(2,22)= 2.40$ $p= 0.1145$, iny. cer: $F(1,22)= 39.87$ $p< 0.0001$, iny.ip: $F(2,22)= 2.67$ $p= 0.0914$]. En cuanto a la microglia de tipo 1, vemos en la Figura IV.8A un efecto de interacción entre la inyección cerebelar y el pretratamiento con anti-inflamatorios [interacción: $F(2,22)= 5.34$ $p= 0.0129$, iny. cer: $F(1,22)= 9.30$ $p= 0.0059$, iny. ip: $F(2,22)= 5.34$ $p= 0.0107$]. Los grupos SAL-SAL y DEXA-SAL fueron los que presentaron la mayor densidad de este tipo celular, mientras que el grupo SAL-LPS fue el que mostró niveles significativamente más bajos (aunque no se registraron diferencias con respecto a los grupos IBU-SAL y el IBU-LPS). Por otro lado, el grupo DEXA-LPS mostró una densidad de microglia en reposo que resultó significativamente mayor que la del grupo SAL-LPS, y similar a la de los grupos SAL-SAL y DEXA-SAL.

En los 3 fenotipos de microglia de la **capa granular** se observa un efecto de la inyección estereotáxica [tipo 1: interacción: $F(2,22)= 1.05$ $p= 0.3676$, iny.cer: $F(1,22)= 61.71$ $p< 0.0001$, iny. ip: $F(2,22)= 2.99$ $p= 0.0978$; tipo 2: interacción: $F(2,22)= 1.57$ $p= 0.2313$, iny. cer: $F(1,22)= 12.00$ $p= 0.0022$, iny. ip: $F(2,22)= 2.26$ $p= 0.1285$; tipo 4: interacción: $F(2,22)= 1.78$ $p= 0.1919$, iny. cer: $F(1,22)= 44.97$ $p< 0.0001$, iny. ip: $F(2,22)= 1.96$ $p= 0.1647$]. Los grupos control muestran una densidad significativamente mayor de células tipo 1, mientras que los grupos que recibieron LPS mostraron un aumento significativo en los niveles de microglia tipo 2 y activada. Cabe destacar que los grupos SAL-LPS e IBU-LPS son los más parecidos entre sí en su perfil celular de neuroinflamación, mientras que el grupo DEXA-LPS tiende a tener una mayor densidad de células de tipo 1 y menor cantidad de microglia activada en comparación con los otros grupos tratados con LPS, aunque esas diferencias no son estadísticamente significativas (Figura IV.8).

En resumen, el LPS reduce la densidad de microglia de tipo 1, y aumenta los niveles de tipo 2 y 4, resultados que son consistentes con su efecto inflamatorio. El aumento de

microglia de tipo 4 puede estar directamente relacionado con la reducción de microglia de tipo 1, ya que ésta podría estar diferenciándose en microglia de tipo 2 y 4. Además, el estímulo inflamatorio puede llevar al reclutamiento de monocitos periféricos que se diferencien en el parénquima cerebral a macrófagos. Nuestro diseño experimental no nos permite diferenciar entre estas dos posibles fuentes de microglia tipo 4.

Por otro lado, el pretratamiento con dexametasona parecería evitar con mayor eficiencia que el ibuprofeno la activación de la microglía y el reclutamiento de macrófagos, ya que el grupo DEXA-LPS presenta una menor reducción de la microglia de tipo 1 y menor aumento de la microglia de tipo 4.

IV.3.3.2. Caracterización morfológica de los diferentes fenotipos de la microglia.

A partir de que encontramos diferentes fenotipos de la microglia en el lóbulo VII del cerebelo de los ratones tratados, decidimos caracterizar ciertos aspectos morfológicos de estas células que podrían darnos más información o una información más detallada sobre el grado de activación de la microglia. Por ello, en las células de tipo 1 decidimos cuantificar el grado de ramificaciones, así como el largo de la proyección más larga de la microglia (radio de Sholl), el área y la esfericidad del soma. Dado que la microglia de tipo 1 no es el fenotipo celular más representado en los animales inyectados con LPS (Figura IV.8A y IV.8B), decidimos analizar en conjunto la microglia de la capa granular y la capa molecular. Esto nos permitió trabajar con una muestra más representativa de este tipo celular.

A partir del análisis de Sholl pudimos cuantificar el número de ramificaciones de la microglia de tipo 1 en función a la distancia del soma (distancia) y comparamos cada tratamiento con su grupo control (Figura IV.9). Esperábamos encontrar un menor grado de ramificaciones en la microglia del tipo 1 en el grupo SAL-LPS y evaluar el efecto del ibuprofeno y la dexametasona sobre las mismas. En la ramificación de la microglia encontramos un efecto de interacción entre el tratamiento y la distancia al soma entre los grupos SAL-SAL y SAL-LPS [ANOVA de medidas repetidas: interacción: $F(11,77)= 2.58$ $p= 0.0077$, distancia: $F(11,77)= 105.51$ $p< 0.0001$, tto: $F(1,77)= 0.14$ $p= 0.7203$], aunque

las comparaciones *a posteriori* no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura IV.9A). Por otro lado, solamente se registró un efecto de la distancia en las comparaciones de los grupos IBU-SAL vs IBU-LPS [interacción: $F(8,48)= 1.72$ $p= 0.1182$, distancia: $F(8,48)= 76.49$ $p= 0.6746$, tto: $F(1,48): 0.19$ $p= 0.6746$] y DEXA-SAL vs DEXA-LPS [interacción: $F(11,77)= 0.83$ $p= 0.6124$, distancia: $F(11,77)= 88.07$ $p< 0.0001$, tto $F(1,77)= 0.14$ $p= 0.7240$] (Figuras IV.9B y IV.9C)

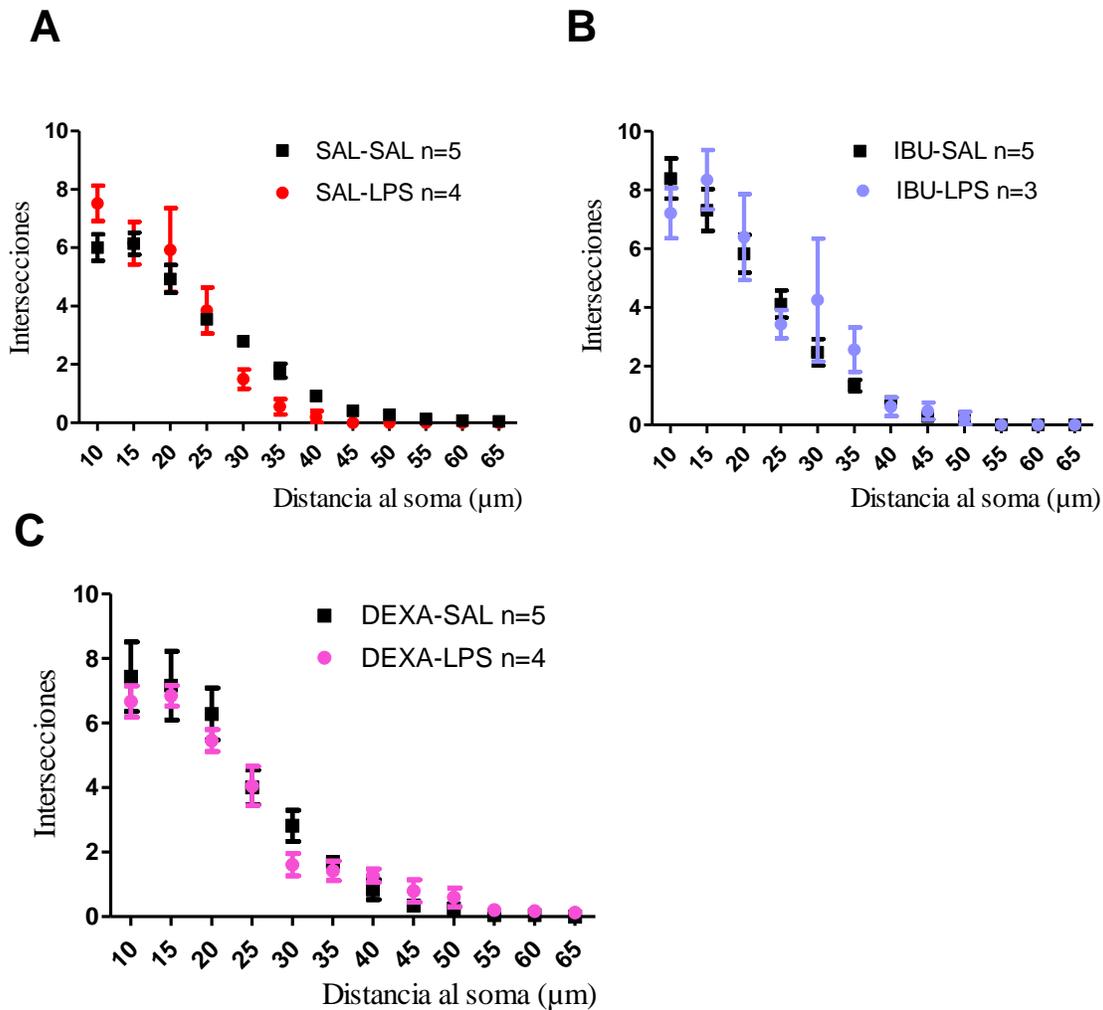


Figura IV.9. Análisis de Sholl para conocer el grado de ramificación de la microglia tipo 1 cerebelar de ratones inyectados estereotáxicamente con SAL o LPS y tratados con anti-inflamatorios sistémicos. El grado de ramificación de la microglia no mostró un efecto significativo asociado al tratamiento. Se grafica la media \pm E.E.

En relación al soma de la microglia de tipo 1, estudiamos el área y la esfericidad del mismo. Inicialmente esperábamos que si la microglia de tipo 1 estaba iniciando un proceso de activación, el tamaño de su soma debería ser mayor y la esfericidad cada vez más cercana a 1, es decir más redondeada. Lo que podemos observar en la Figura IV.10A es un aumento en el tamaño del soma en aquellos grupos que recibieron ibuprofeno [interacción: $F(2,20)= 1.52$ $p= 0.2424$, iny. cer: $F(1,20)= 0.04$ $p= 0.8382$, iny. ip: $F(2,20)= 5.96$ $p= 0.0093$], pero no en los grupos tratados con LPS. Dado que este efecto parece estar más bien asociado al ibuprofeno, concluimos que las células de tipo 1 no mostraron cambios morfológicos en el tamaño del soma asociados al efecto esperado por el LPS.

Por otro lado, al estudiar la esfericidad de las células observamos un efecto de interacción entre el estímulo inflamatorio y el tratamiento anti-inflamatorio [interacción: $F(2,20)= 11.28$ $p= 0.0005$, iny. cer: $F(1,20)= 8.44$, $p= 0.088$, iny.ip: $F(2,20)= 0.71$ $p= 0.5024$] (Figura IV.10B). Los ratones SAL-LPS presentaron un índice más cercano a 1, un efecto que no es evitado por el pretratamiento con dexametasona pero sí con el de ibuprofeno. Por otro lado, el grupo SAL-SAL es el que mostró un índice de esfericidad mayor, es decir cuyo soma era el más alargado, tal como era de esperarse (Figura IV.10B).

Finalmente, no observamos diferencias en la proyección más larga de la microglia (radio de Sholl) [interacción: $F(2,20)= 1.22$ $p= 0.3162$, iny. cer: $F(1,20)= 1.14$ $p= 0.2992$, iny. ip: $F(1,20)= 0.05$ $p= 0.5579$] (Figura IV.10C).

En resumen, en base a los parámetros morfológicos celulares analizados en la microglia de tipo 1, no observamos alteraciones en los marcadores de activación, salvo por la esfericidad del soma. Posiblemente esto hubiese sido más fácil de detectar en una microglia de tipo 2 que ya presentan un mayor grado de activación que la microglia en reposo, sin embargo estas células no estaban representadas en los cortes.

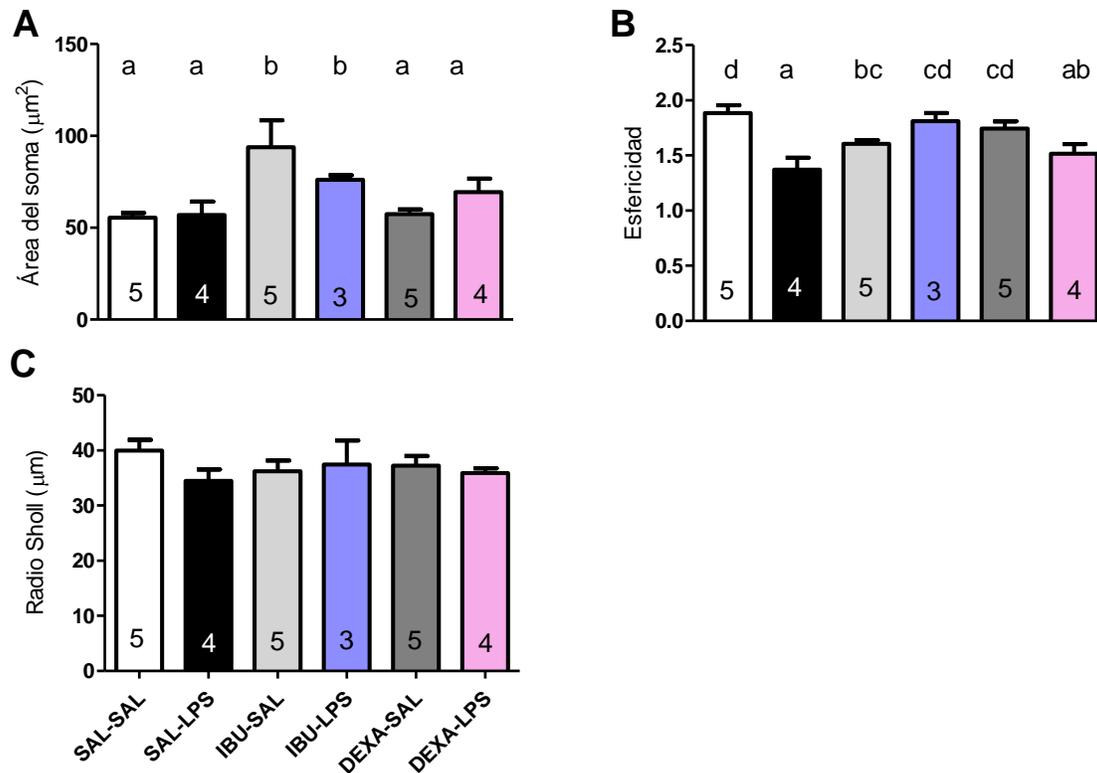


Figura IV.10. Caracterización de la morfología de la microglia de tipo 1 cerebelar en ratones tratados con anti-inflamatorios sistémicos e inyectados estereotácticamente con SAL o LPS. (A) Se registró un aumento en el tamaño del soma en los ratones inyectados intraperitonealmente con ibuprofeno. (B) La esfericidad más cercana a 1 se observó en los grupos SAL-LPS y DEXA-LPS. (C) No se observaron diferencias en el radio de Sholl en la microglia de los diferentes grupos experimentales. N, en las barras. ANOVA de dos factores seguida de la prueba de LSD Fisher: letras distintas indican diferencias significativas $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E.

También estudiamos la morfología de las microglia activada. Como esta célula no posee proyecciones no pudimos realizar un análisis de Sholl. Tampoco pudimos incluir en este análisis a los grupos control inyectados estereotácticamente con SAL, ya que la microglia tipo 4 no se observaba frecuentemente en los cortes de estos grupos.

Lo que pudimos determinar es que el pretratamiento con anti-inflamatorios no tuvo ningún efecto modulando el área del soma [capa molecular: $F(2,10) = 0.38$ $p = 0.6960$, capa granular: $F(2,10) = 0.01$ $p = 0.5909$] o en la esfericidad de la microglia tipo 4 [capa molecular: $F(2,10) = 0.10$ $p = 0.9027$, capa granular: $F(2,10) = 0.37$ $p = 0.6986$] (Figura IV.11).

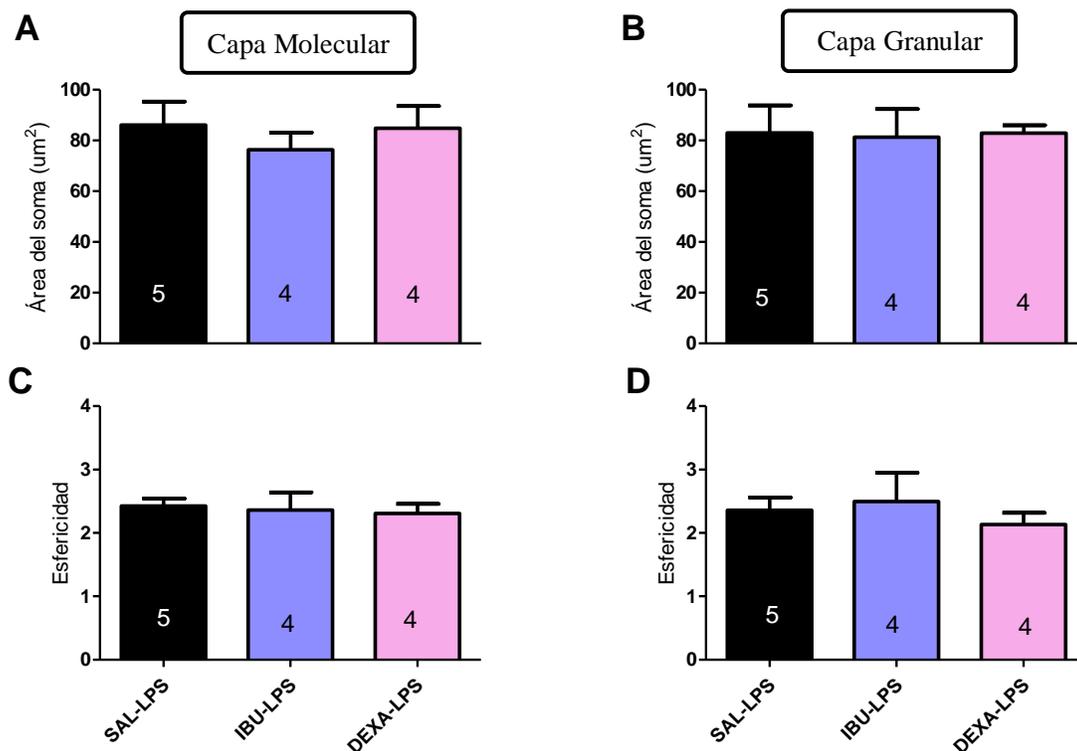


Figura IV.11. Caracterización de la morfología de la microglia de tipo 4 cerebelar en ratones tratados con anti-inflamatorios sistémicos e inyectados estereotáxicamente con LPS. No se observaron diferencias en el área del soma (A y B) o en la esfericidad (C y D) de la microglia activada. N, en cada barra. Se grafica la media + E.E.

IV.3.3. Efecto del tratamiento sistémico con drogas anti-inflamatorias sobre la densidad de células de Purkinje y el área del lóbulo VII cerebelar en animales inyectados estereotáxicamente con LPS

Con el fin de determinar si el LPS generaba algún efecto apoptótico o necrótico sobre las neuronas, se decidió cuantificar la densidad de células de Purkinje (CPs), dado que estas células suelen ser sensibles a diferentes agentes (Fonnum & Lock, 2000) y a que incluso la microglia puede inducir su apoptosis (Marín-Teva et al., 2004). Además, para determinar el estado macroscópico del lóbulo se registró el área de la capa molecular y granular del lóbulo VII (Figura IV.12). No se observaron diferencias en la densidad lineal de CPs [$F(2,9)= 0.69$ $p= 0.5344$], ni en el área de la capa molecular [$F(1,8)= 0.0024$ $p= 0.9621$] o granular del lóbulo VII [$F(1,9)= 1.60$ $p= 0.2415$]. Dado que no se observaron

alteraciones en el grupo SAL-LPS, no se procedió al análisis de los grupos inyectados con drogas anti-inflamatorias.

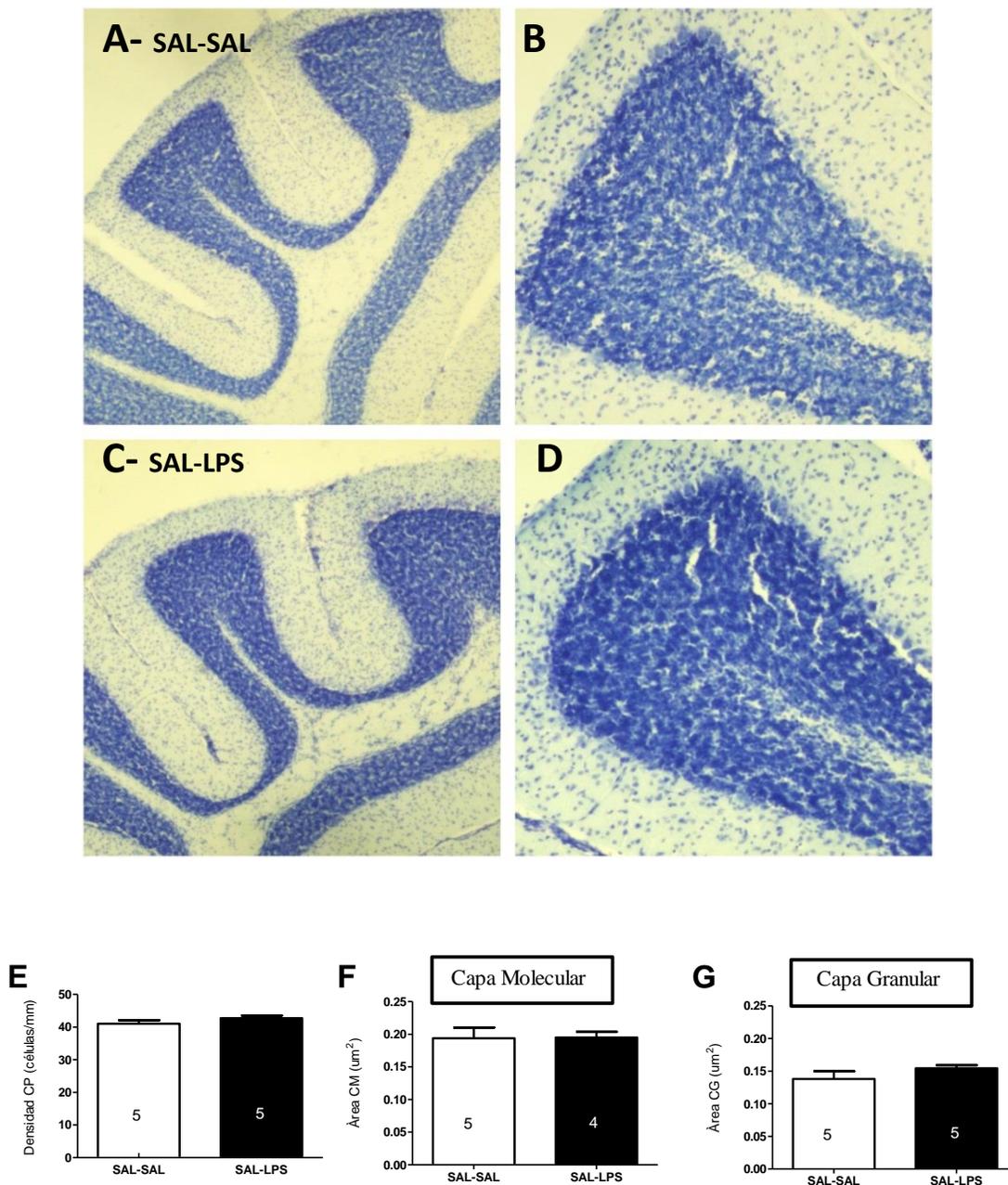


Figura IV.12. Efecto del tratamiento sistémico con drogas anti-inflamatorias sobre la densidad de células de Purkinje y el área del lóbulo VII cerebelar en animales inyectados estereotáxicamente con SAL o LPS. Fotografías representativas del lóbulo VII de los diferentes tratamiento a 4X (A y C), y su imagen aumentada a 10X (B y D). No se observaron diferencias en la densidad de CPs del lóbulo VII (E), así como tampoco en el área de la capa molecular (F) ni granular del mismo lóbulo. Se grafica la media + E.E.

Concluimos que 24 hs luego de transcurrida la inyección estereotáxica, cuando se observan las alteraciones conductuales, no se evidencia muerte neuronal de las CPs ni alteraciones macroscópicas en el lóbulo.

IV.4. Conclusiones y Discusión

En base a los resultados presentados en este capítulo podemos proponer diferentes explicaciones en cuanto al efecto de la neuroinflamación sobre la sociabilidad y su relación funcional con el cerebelo. En este trabajo observamos que la neuroinflamación cerebelar producida por la inyección estereotáxica de LPS en el lóbulo VI/VII produce una reducción en la sociabilidad que puede ser evitada parcialmente con un anti-inflamatorio no esteroideo como el ibuprofeno. Además, la inyección de dexametasona una hora antes de la inyección estereotáxica bloquea totalmente el efecto del LPS sobre la sociabilidad. En ambos casos pudimos comprobar que el LPS generó neuroinflamación, caracterizada por una reducción de la densidad de la microglia en reposo y un aumento de la microglia activada. El ibuprofeno no fue eficiente en reducir esta respuesta celular, a diferencia de la dexametasona que mostró una tendencia a presentar niveles más bajos de microglia activada y mayor densidad de microglia de tipo 1.

Trabajos previos analizaron la neuroinflamación y el autismo en el contexto del desarrollo y evaluaron cómo la alteración del estado inflamatorio en diferentes periodos críticos puede derivar en un fenotipo asociado a autismo (Bauman et al., 2014, Ardalan et al., 2019). En este capítulo demostramos que incluso un estímulo neuroinflamatorio agudo en un cerebro que ya estaba desarrollado puede derivar en una reducción de la sociabilidad. Además elegimos una región característica de la neuropatología del autismo, el cerebelo. De esta forma pudimos establecer una relación causal entre la neuroinflamación cerebelar y la conducta. De manera indirecta también demostramos que modulando el grado de neuroinflamación a través de agentes anti-inflamatorios podemos modular la sociabilidad.

Los anti-inflamatorios elegidos presentan diferentes blancos moleculares a las concentraciones utilizadas (Teeling et al., 2010) y fueron elegidos para determinar qué componentes presentaban un rol principal en la neuroinflamación mediada por el LPS y

eran necesarios para afectar la conducta. Como observamos en los resultados, ninguno de los dos tuvo un efecto farmacológico tan largo ni eficiente para bloquear totalmente la respuesta inflamatoria desencadenada por la inyección cerebelar de LPS, ya que observamos presencia de microglia activada tanto en animales inyectados con ibuprofeno como en animales inyectados con dexametasona. Sin embargo, podemos asumir que por una determinada cantidad de horas entre la inyección de LPS y el tiempo que duró el efecto farmacológico de las drogas anti-inflamatorias estuvieron bloqueadas vías inflamatorias específicas.

En el caso de los ratones que recibieron la inyección de ibuprofeno, razonamos que durante un periodo de tiempo, modulamos negativamente la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2, que tienen un rol importante en la producción de prostaglandinas y tromboxanos (Vane & Botting, 1996, Mazaleuskaya et al., 2015). Esto tuvo un efecto sobre la conducta, ya que los ratones no mostraron diferencias significativas en la sociabilidad antes y después de la inyección de LPS. Sin embargo este efecto parece parcial, ya que el tiempo que los ratones olieron el lado social post-inyección de LPS tendió a ser llamativamente más bajo. Así, reducir la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2 tuvo un efecto beneficioso pero no alcanzó para recuperar los niveles de sociabilidad iniciales. Por otro lado, el perfil de neuroinflamación descrito por la densidad de microglia en este grupo fue muy parecido al grupo SAL-LPS. Esto es de esperarse dado que el ibuprofeno, a las concentraciones utilizadas, no tiene un efecto directo sobre las vías que regulan la activación y proliferación de la microglia (Dheen et al., 2007).

Por otro lado, los ratones que fueron tratados con dexametasona antes de la inyección estereotáxica mostraron niveles de sociabilidad parecidos antes y después de la inyección, y una tendencia a presentar una densidad de microglia activada menor que los otros grupos tratados con LPS. Esta tendencia en la respuesta celular probablemente esté relacionada con el blanco de acción de la dexametasona. Los glucocorticoides generan su efecto farmacológico regulando negativamente la expresión de genes asociados a la vía de NFκB, una de las principales vías de activación inflamatoria (Heck et al., 1997, Tischner et al., 2007, Schweingruber et al., 2012). Este fármaco posee un efecto inhibitorio sobre la expresión del mRNA de COX-2 (Bauer et al., 1997, Lasa et al., 2001), así como numerosos

efectos sobre las células del linaje de macrófagos y microglia. Estudios *in vitro* demostraron que es un inhibidor de la activación de la microglia y macrófagos mediada por IFN- γ (Loughlin et al., 1993, Hinkerohe et al., 2010), además de regular negativamente la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en macrófagos *in vivo* e *in vitro* (Snyder & Unanue, 1982, Kiefer & Kreutzberg, 1991). Se demostró que este glucocorticoide *in vitro* reduce la liberación de citoquinas como interleuquina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral- γ (TNF- γ) de la microglia (Forshammar et al., 2013) e inhibe reversiblemente su proliferación (Ganter et al., 1992). En base a estos antecedentes, proponemos que el mecanismo de acción a partir del cual el LPS genera la reducción en la sociabilidad está relacionado con el aumento en la densidad de microglia activada, el reclutamiento de macrófagos y posiblemente el contexto inflamatorio producido por las citoquinas liberadas por estas células. Aunque en este trabajo no llegamos a evaluar el rol de las citoquinas, hay extensa bibliografía que la relaciona con el autismo.

Nuestros resultados son consistentes con el estudio realizado por Suzuki et al. (2013) donde utilizaron la tomografía de emisión de positrones (PET) para detectar la distribución de la microglia en el cerebro de pacientes con autismo. Ellos pudieron determinar un aumento en la abundancia de microglia activada en distintas regiones del cerebro, una de ellas el cerebelo (Suzuki et al., 2013). Los autores proponen que una activación de la microglia que inicie en el periodo prenatal y continúe hasta la adultez puede ser considerado un factor etiológico, ya que los síntomas suelen manifestarse tempranamente a la edad de 3 años. En 2005 el grupo de Vargas et al. también encontró un aumento en la abundancia en la microglia activada en tejido *postmortem* de pacientes con autismo, particularmente en el cerebelo, y además demostraron que la misma presenta alteraciones ya que las células eran más largas y densas (Vargas et al., 2005). Los resultados de esta tesis sugieren que la neuroinflamación no sólo puede ser un factor etiológico que subyace a los impedimentos sociales, sino que su persistencia puede en realidad causar la persistencia del déficit social.

Capítulo V. Herencia a través de las generaciones de los fenotipos asociados a autismo en el modelo VPA

V.1. Punto de inicio

Si bien el autismo tiene un fuerte componente genético, cada vez hay más estudios que indican que hay factores no genéticos que juegan un rol importante en la etiología de este desorden (Hallmayer et al., 2011, Rangasami et al., 2013).

Los mecanismos epigenéticos fueron definidos tradicionalmente como los cambios heredables en la expresión de genes que no involucran alteraciones en la secuencia de ADN (Peschansky & Wahlestedt, 2014). Estos eventos son críticos para regular la condensación de la cromatina, el acceso de la maquinaria de transcripción al ADN y la expresión de genes. Las marcas epigenéticas involucran metilaciones del ADN, acetilaciones de histonas y cambios en el ARN no codificante, incluyendo a los microARN. Cada vez hay más evidencia que indica que diferentes modificaciones en la cromatina están distribuidas por el cerebro y son parte de regulaciones dinámicas en el sistema nervioso (Tsankova et al., 2007). Es por este motivo que cada vez hay un mayor interés en el estudio de la epigenética en el marco de los desórdenes psiquiátricos (Albert, 2010, Kumsta, 2019, Petronis & Labrie, 2019).

En el contexto del autismo, un estudio realizado con gemelos discordantes - cuando en uno de los individuos se observa un fenotipo y en el otro no - demostró que éstos presentaban un patrón diferencial de marcas epigenéticas, dado por diferentes metilaciones del ADN en regiones asociadas a autismo (Wong et al., 2014). Por otro lado, distintos síndromes que comparten características con el DEA, como el síndrome de Rett y el de X Frágil, también han reportado alteraciones relacionadas a componentes epigenéticos (Schanen, 2006, Rangasamy et al., 2013). En particular, el síndrome de Rett es un trastorno del desarrollo ligado al cromosoma X que se manifiesta predominantemente en niñas. Quienes presentan este síndrome suelen desarrollarse normalmente hasta los 18 meses de edad, cuando se comienzan a manifestar alteraciones en su conducta social y en el lenguaje, acompañado de la pérdida de sus capacidades motoras, cognitivas y la aparición de comportamientos repetitivos (Zoghbi, 2005). El síndrome es causado por una mutación en el gen *MeCP2* (*methyl CpG binding protein 2*) que codifica para una proteína que se une al ADN metilado (Shah & Bird, 2017). En el caso del Síndrome de X Frágil, los pacientes que lo presentan poseen características conductuales similares al DEA, convulsiones,

hipersensibilidad a estímulos sensoriales, ansiedad y alteraciones en la coordinación motora (Hatton et al., 2002, Bailey et al., 2008). Este desorden es causado por un aumento de secuencias CGG en la región 5'-UTR (región no traducida) del gen *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*), las cuales generarían una hipermetilación de la región y el silenciamiento de este gen, provocando la deficiencia en la proteína FMRP1 (Verkerk et al., 1991). Estos y otros estudios indican que la epigenética es un factor importante a considerar en cuanto a la etiología del desorden de espectro autista (Schanen et al., 2006, Grafodatskaya et al., 2010, Rangasamy et al., 2013).

Las modificaciones epigenéticas pueden ser generadas tanto por factores intrínsecos como por factores externos, como la desnutrición prenatal, el humo del cigarrillo, la radiación ultravioleta, etc. Estos cambios pueden estabilizarse o revertirse, lo que le confiere a la epigenética un rol importante en la modulación de la respuesta celular ante estímulos patofisiológicos (De Majo & Calore, 2018). Como mencionamos en el capítulo anterior, la inyección prenatal de ácido valproíco (VPA) en el DG 12.5 es un modelo validado para el estudio del autismo en roedores (Favre et al., 2013, Lucchina & Depino, 2013). Uno de los efectos biológicos del VPA es la inhibición de las enzimas deacetilasas de histonas (HDACs) (Gottfried et al., 2013, Bambini-Junior et al., 2014). Estas enzimas remueven los grupos acetilos de las histonas, promoviendo un mayor empaquetamiento del ADN. Por lo tanto, el VPA al inhibirlas favorece que el ADN esté más laxo y más accesible a proteínas reguladoras de la transcripción. En línea con este mecanismo, diferentes estudios han descrito que el VPA puede afectar la expresión de una gran variedad de genes (Fukuchi et al., 2009, Boudadi et al., 2013, Bambini-Junior et al., 2014). Así, el VPA puede considerarse un factor extrínseco, capaz de alterar directamente los patrones epigenéticos de acetilación de histonas e indirectamente los patrones de metilación del ADN.

Dado que cada vez se describen más enfermedades psiquiátricas que presentan componentes epigenéticos, hay un gran interés en estudiar si las marcas epigenéticas y los rasgos de los fenotipo pueden heredarse a las sucesivas generaciones (Bale, 2015, Yeshurun & Hannan, 2019). En el contexto de la epigenética, se han descrito dos formas por las cuales un fenotipo puede heredarse: a través de herencia intergeneracional o

transgeneracional, dependiendo de si hubo exposición directa de la descendencia o sus células germinales al agente, o no.

En base a lo mencionado, hipotetizamos que la exposición prenatal a VPA puede generar alteraciones epigenéticas que resultan en alteraciones en la conducta y que las mismas pueden ser heredadas a las siguientes generaciones.

El **objetivo general** de este capítulo fue estudiar si las alteraciones reportadas en los animales tratados prenatalmente con VPA (F1-VPA) podían ser heredadas a la siguiente generación a través de una herencia inter- o transgeneracional. Por ser un modelo prenatal, esperamos observar herencia intergeneracional en la F2 y transgeneracional en la F3. Además analizamos si la herencia de los fenotipos de la F1-VPA se establece en la F2 a través las madres VPA (linaje materno) o de los padres VPA (linaje paterno). Con este aporte esperamos comprender si los niveles de sociabilidad pueden ser heredados, y proporcionar información sobre los factores que contribuyen al desarrollo del trastorno. También buscamos determinar, en el caso de observar herencia de los niveles de sociabilidad, si estos pueden ser modulados mediante intervenciones postnatales con conspecíficos (estimulación social), como demostramos para la F1 (Campolongo et al., 2018).

V.2. Nomenclatura

En este capítulo usamos una serie de abreviaciones para poder describir con mayor facilidad a los grupos experimentales y al linaje. Con F0 nos referimos a las hembras que fueron inyectadas subcutáneamente con VPA o SAL en el DG 12.5 y a partir de las cuales se estableció el modelo VPA. A las crías expuestas *in útero* a VPA las llamamos F1-VPA y a su control F1-SAL (Figura V.1A). Cuando las hembras F1-VPA o F1-SAL alcanzaron la adultez fueron cruzadas con machos *naïve* y se obtuvo una F2 por linaje materno (F2/LM), haciendo referencia a que estas crías son descendientes de hembras tratadas prenatalmente con VPA o SAL (Figura V.1B). Mientras que si la F2 se obtuvo a partir de la cruce de un macho F1-VPA y una hembra *naïve*, llamamos a su descendencia F2 por linaje paterno (F2/LP) para denotar que su progenitor es un macho F1-VPA o F1-SAL (Figura V.1C). De

la misma manera cruzando a los machos F2-VPA obtenidos por linaje paterno con hembras *naïve* obtuvimos las crías de la F3 por linaje paterno (F3/LP) (Figura V.1D).

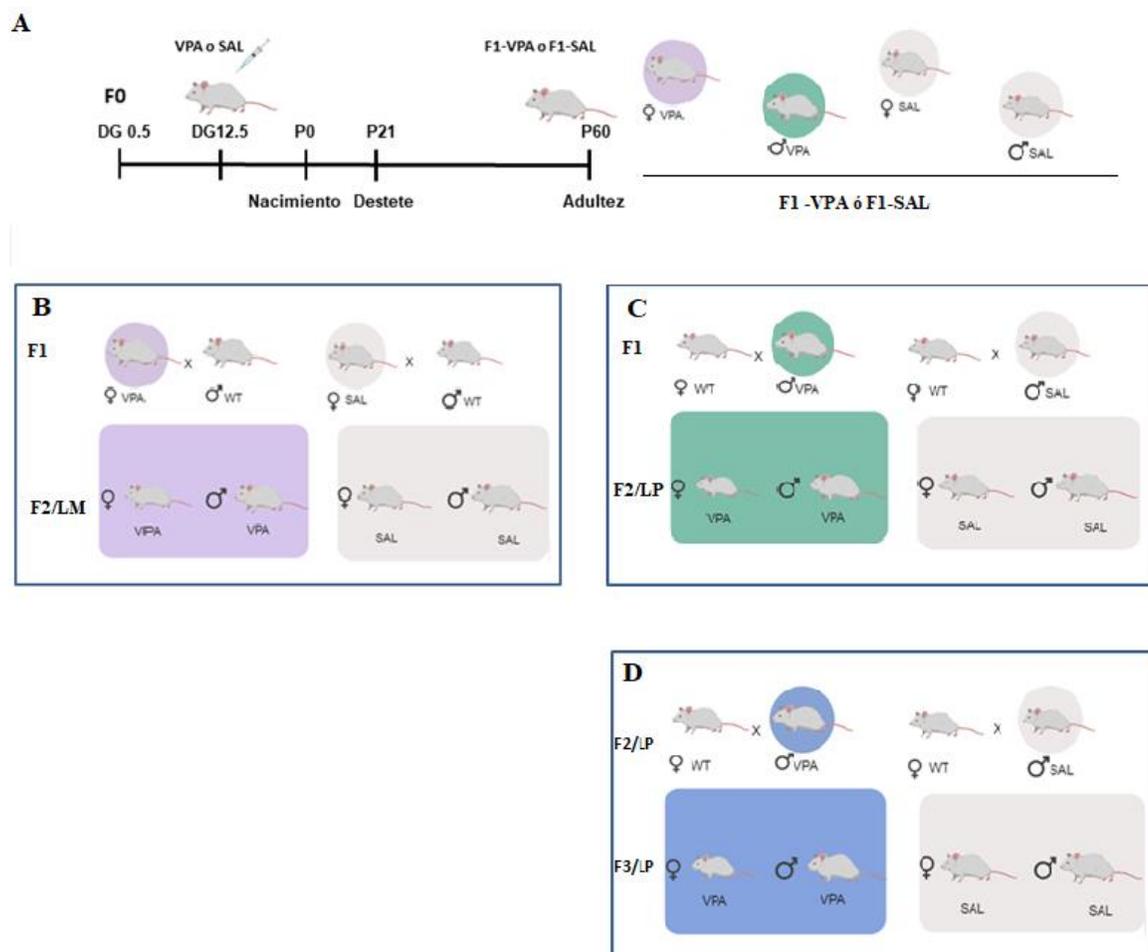


Figura V.1. Nomenclatura adaptada para la descripción de los linajes. (A) Representación temporal del modelo VPA. Este diseño fue utilizado para obtener la F1 de machos y hembras VPA o SAL. (B) A partir de la cruce de hembras F1-VPA o F1-SAL con machos *naïve* se obtiene la F2 de linaje materno (F2/LM). (C) La cruce de machos F1-VPA o F1-SAL con hembras *naïve* permite obtener la F2 por linaje paterno (F2/LP). (D) La F3 por linaje paterno (F3/LP) surge de la cruce de machos F2/LP-VPA o F2/LP-SAL con hembras *naïve*.

Por otro lado, en este capítulo hablaremos del **pedigrí** para referirnos al tratamiento que recibió el progenitor del cual derivan (pedigrí VPA o pedigrí SAL). Por ejemplo los animales F2-VPA son descendientes de primer grado de animales F1-VPA, y un ratón F3-VPA es descendiente de primer grado de un animal F2-VPA y de segundo grado de un F1-VPA; todos estos animales pertenecen al pedigrí VPA. Cabe aclarar que hablaremos que

existe un **efecto de pedigrí significativo** cuando encontremos diferencias entre grupos F2-VPA vs F2-SAL, o F3-VPA vs F3-SAL respectivamente.

V.3. Características descriptas en la F1 del modelo VPA

Para determinar si hubo herencia del comportamiento presente en la F1-VPA a la F2-VPA se utilizó la información sobre el modelo VPA publicada por nuestro laboratorio. Contamos con una descripción del comportamiento postnatal en hembras y en la adultez de machos y hembras de la F1-VPA, publicada en los trabajos de Kazlauskas et al. (2016), Kazlauskas et al. (2019) y Campolongo et al. (2018). Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla V.2.

Comportamiento postnatal F1-VPA *¹	
Peso	Disminución (P8 a P21)
Enderezamiento en una superficie	Tendencia a mayor latencia de enderezamiento (P3-P5)
Sobresalto acústico	Menor % de animales (P15)
Fuerza de agarre	Mayor latencia al caer (P13)
Comportamiento en la adultez *² (Machos F1-VPA)	
Interacción social	Menor tiempo oliendo al estímulo social
Reconocimiento de objeto novedoso	No hay diferencias en el tiempo oliendo el objeto novedoso
Habituaación/Deshabituaación Olfativa	Alterada
Laberinto en Y	Menor % de alternancias
Autoacicalamiento	Mayor tiempo de autoacicalamiento
Suspensión de cola	Tendencia a estar mayor tiempo inmóvil
Nado forzado	Mayor tiempo de inmovilidad
Exploración a campo abierto	Menor distancia total recorrida y tiempo de autoacicalamiento
Otras alteraciones *²	
Inmunoreactividad C-Fos +	Aumentada en la corteza piriforme
Metabolismo de dopamina (DA)	DOPAC/DA aumentado
Comportamiento en la adultez (Hembras F1-VPA)	
Interacción social * ³	No presenta fenotipo de reducción de la sociabilidad

Tabla V.2. Resumen de las características descriptas del modelo VPA en la F1. *¹ Kazlauskas et al., 2016; *² Campolongo et al., 2018; *³ Kazlauskas et al., 2019.

V.4. Resultados Herencia intergeneracional a través del linaje materno

V.4.1. Diseño experimental

Los animales de la F1 se obtuvieron a partir del modelo VPA descrito previamente (Figura V.2A). En la Figura V.2B se muestran las cruzas realizadas para obtener la F2 a través del linaje materno. La batería de ensayos realizados a estos animales se resume en la Figura V.2C.

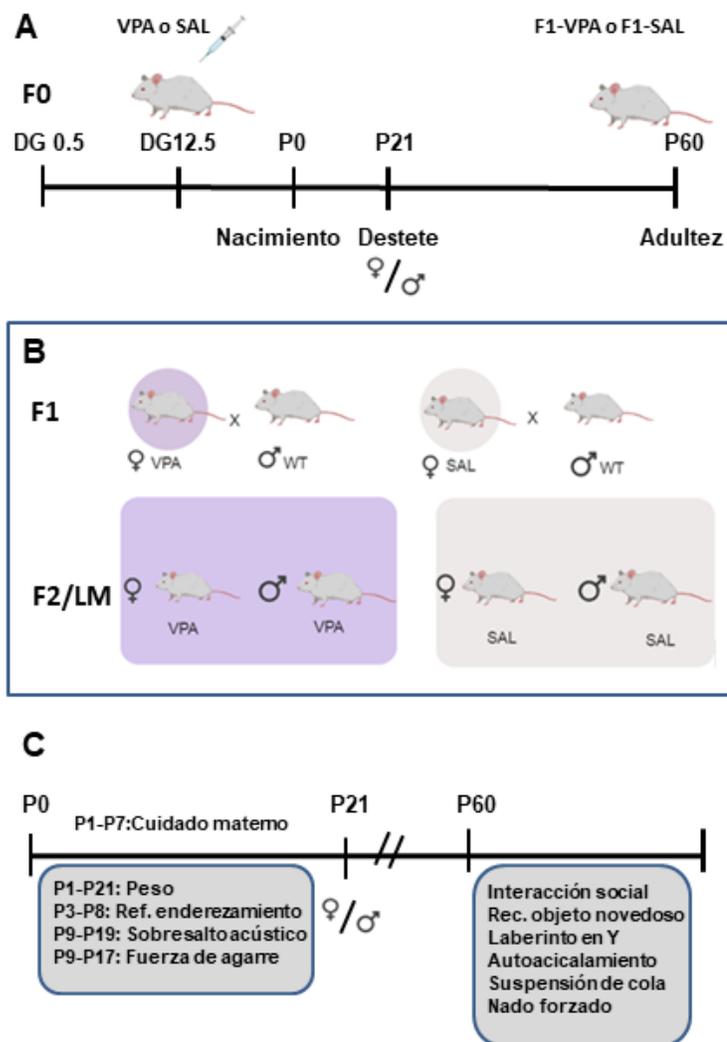


Figura V.2. Diseño experimental utilizado para obtener la F2 por linaje materno (F2/LM). (A) Se inyectaron a hembras preñadas (F0) al DG 12.5 con VPA o SAL generando el modelo. (B) En la adultez, las crías hembras tratadas prenatalmente con VPA o SAL (F1-VPA o F1-SAL) fueron cruzadas con machos *naïve*. Se obtuvo de estos apareos una F2 que descende de hembras VPA (F2-VPA) o hembras SAL (F2-SAL). (C) A estos animales se les realizó una batería de ensayos conductuales.

V.4.2. Cuidado materno de la F1-VPA

Numerosos estudios han demostrado que eventos estresantes en etapas de la vida temprana pueden tener un efecto a largo plazo en el comportamiento. Un cuidado materno deficiente, además de ser un factor estresante, puede producir alteraciones en la expresión de genes y en el comportamiento de las crías (Caldji et al., 1998; Liu et al., 2000). Por este motivo, el cuidado materno debe ser tenido en cuenta al evaluar el desarrollo de las crías, ya que sus efectos pueden mantenerse hasta la adultez y ser transmitidos a las siguientes generaciones (Francis et al., 1999, Champagne & Meaney, 2007).

Si bien sabíamos que las hembras F1-VPA presentan alteraciones en su comportamiento postnatal (Kazlauskas et al., 2016), su comportamiento social en la adultez parece no estar alterado (Kazlauskas et al., 2019). Por otro lado, desconocíamos si la exposición prenatal a VPA tenía algún efecto sobre su comportamiento materno. Dado que el objetivo de esta sección fue determinar si las alteraciones presentes en la F1 pueden heredarse a la F2/LM, debimos controlar que dichas alteraciones en el comportamiento de las crías no fueran consecuencia de un cuidado materno deficiente. Por lo tanto, estudiamos el comportamiento de las hembras F1-VPA en cuanto al cuidado de sus crías.

El cuidado de la madre a las crías suele relacionarse con el tiempo que ésta pasa amamantándolas (*arched-back nursing*, ABN) y acicalándolas (*licking and grooming the pups*, LGP). Para determinarlo realizamos observaciones de las madres registrando su actividad desde P1 hasta P7. No observamos diferencias en el cuidado materno de las hembras F1-VPA y su control [Modelo lineal general y mixto; interacción tto-tiempo: $F(6,60) = 0.61$ $p = 0.7187$, tto: $F(1,60) = 0.00$ $p = 0.9536$, tiempo: $F(6,60) = 3.43$ $p = 0.0056$, Figura V.3]. El hecho de no encontrar cambios significativos en el cuidado materno nos permite descartar que cualquier alteración encontrada en la F2/LM sea debido a este factor específico de estrés en la vida temprana de las crías.

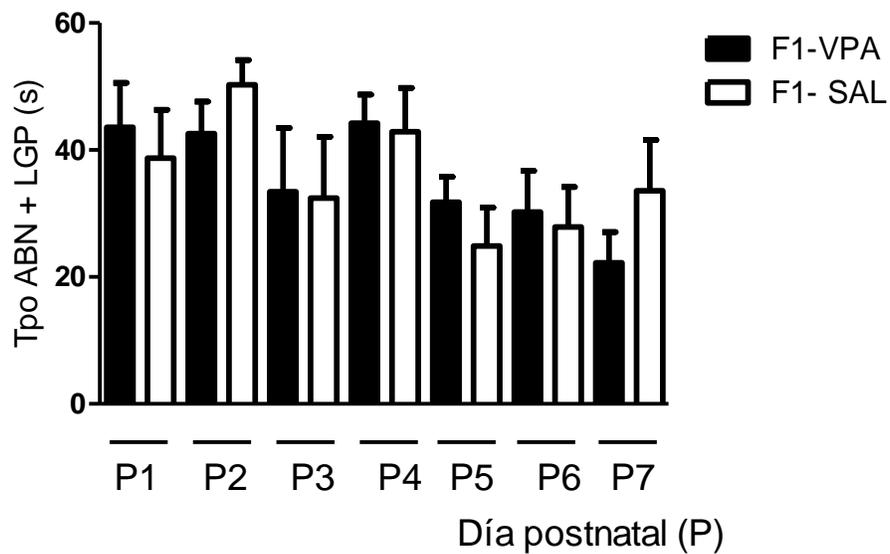


Figura V.3. Cuidado materno de la hembras F1-VPA. No se observaron diferencias en el tiempo que las hembras F1-VPA dedicaron a amamantar (ABN) y acicalar (LGP) a las crías. $N_{F1-SAL} = 7$, $N_{F1-VPA} = 5$. Modelo lineal general y mixto. Se grafica la media + E.E.

V.4.3. Crías F2: linaje materno

V.4.3.1. Comportamiento postnatal de las crías de la F2 -linaje materno

Como se ha visto en diferentes estudios, el tratamiento prenatal con VPA genera alteraciones que pueden expresarse en el periodo postnatal (Kazlauskas et al., 2016, Yang et al., 2016, Hou et al., 2018). Basándonos en las alteraciones reportadas en la F1 (Kazlauskas et al., 2016), decidimos evaluar si estos cambios podían ser heredados a la siguiente generación a través del linaje materno. Para esto realizamos las cruza indicadas en la Figura V.2B y analizamos el comportamiento postnatal de las crías de la F2/LM (Figura V.2C y Figura V.4). Las conductas estudiadas están relacionadas con el desarrollo neurológico de las crías.

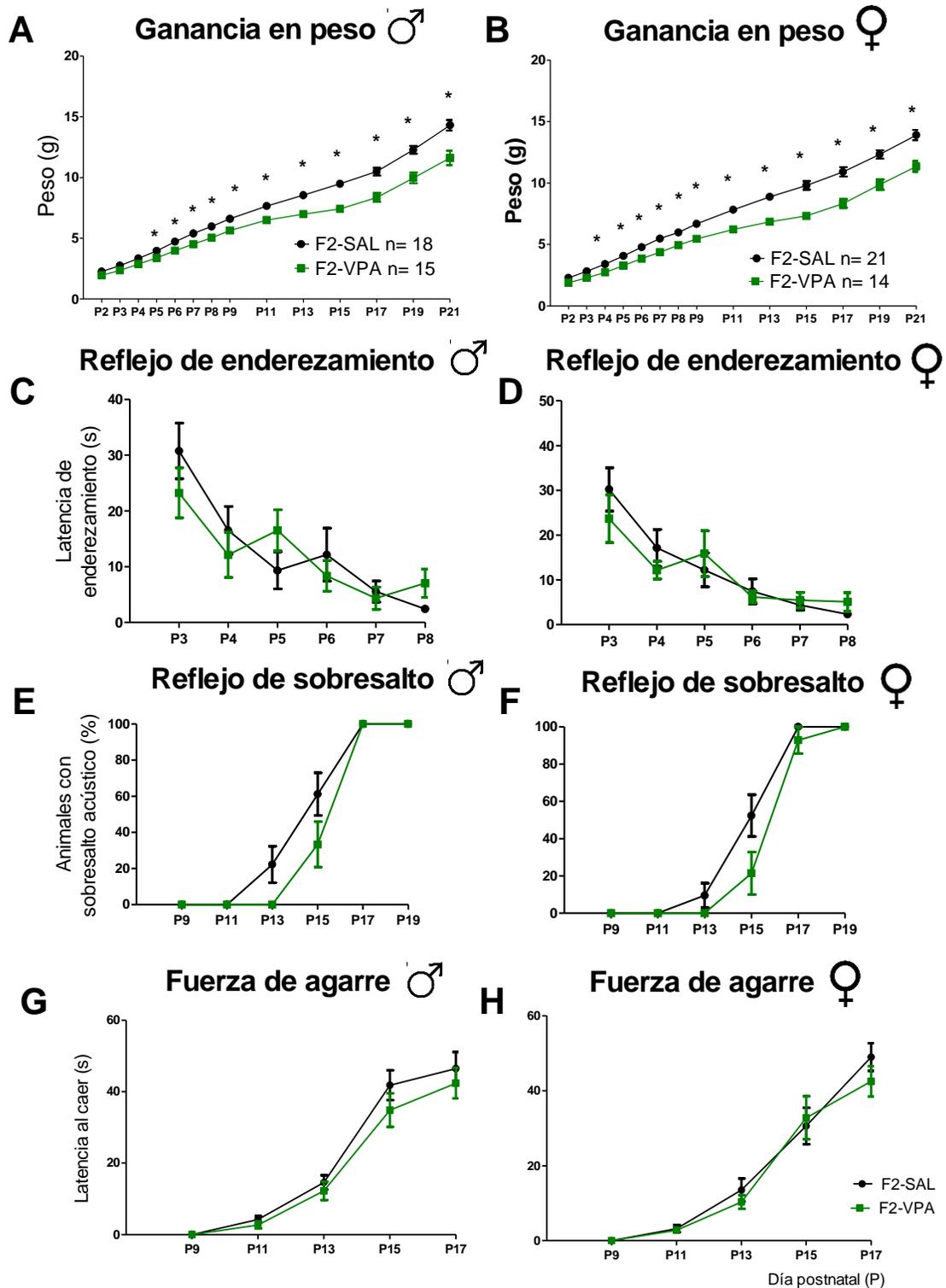


Figura V.4. Comportamiento postnatal de la F2/LM. Los ratones de la F2-VPA mostraron una menor ganancia de peso desde P5 en el caso de los machos (A) y desde P4 en el caso de las hembras (B). No se observaron diferencias en la latencia a enderezarse (C y D) o en la latencia a caer (G y H), aunque se observó una marcada tendencia al retraso en el desarrollo del reflejo por

sobresalto acústico en P15 (E y F). Machos: $N_{F2-SAL} = 18$, $N_{F2-VPA} = 15$, Hembras: $N_{F2-SAL} = 21$, $N_{F2-VPA} = 14$. A-D y G-H: Modelo lineal general y mixto seguido de la prueba LSD Fisher; * indican diferencias significativas $p < 0.05$. E-F: Test de chi-cuadrado. Se grafica la media \pm E.E.

Ganancia en peso

Últimamente la detección temprana del autismo ha cobrado cada vez más importancia y se ha demostrado que el bajo peso al nacer es uno de los marcadores de desarrollo temprano que correlaciona con el autismo (Losh et al., 2011, Dudova et al., 2014). Por más que la característica más saliente del modelo VPA es la reducción de la sociabilidad, numerosos autores han reportado que los animales tratados prenatalmente con VPA presentan un déficit en la ganancia de peso corporal (Schneider et al., 2006, Tsujino et al., 2007) y de su cerebro (Ingram et al., 2000).

Se utilizó un modelo lineal general y mixto y se observó una interacción significativa entre el pedigrí y el tiempo, tanto en los machos como en las hembras (Machos: interacción pedigrí-tiempo: $F(13) = 1.30$ $p < 0.0001$, pedigrí: $F(1) = 21.54$ $p = 0.0009$, tiempo: $F(13) = 1362.41$ $p < 0.0001$, Hembras: interacción pedigrí-tiempo: $F(13) = 16.44$ $p < 0.0001$, pedigrí: $F(1) = 19.06$ $p = 0.0014$, tiempo: $F(13) = 1206.72$ $p < 0.0001$). Observamos que las crías machos de la F2-VPA muestran un peso menor que los controles desde P5 hasta P21 (Figura V.4A), mientras que las hembras desde P4 (Figura V.4B). Esta característica también se registró en la F1-VPA desde P8 a P21 (Kazlauskas et al., 2016).

Enderezamiento en la superficie

El enderezamiento en una superficie es un reflejo que se adquiere temprano en el desarrollo. Se lo estima como el tiempo en que el ratón tarda en reincorporarse sobre sus 4 patas luego de ser colocado de cúbito dorsal. Sabemos que en la F1 la latencia a enderezarse tiende a ser mayor en los ratones VPA durante los primeros días postnatales (P3 a P5) (Kazlauskas et al., 2016). En la F2/LM, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los sexos, pero sí un efecto de la edad (tiempo) consistente con la idea de que al ir creciendo los animales van mejorando su desempeño en esta tarea (Modelo lineal general y mixto; Machos: interacción pedigrí-tiempo: $F(5) = 2.71$ $p = 0.029$, pedigrí: $F(1) = 1.07$ $p = 0.3257$, tiempo: $F(5) = 5.39$ $p = 0.0004$,

Figura V.4C; Hembras: interacción pedigrí-tiempo: $F(5) = 1.63$ $p = 0.1680$, pedigrí: $F(1) = 0.05$ $p = 0.8261$, tiempo: $F(5) = 5.42$ $p = 0.0004$, Figura V.4D).

Reflejo de sobresalto

Como respuesta a un estímulo auditivo los ratones realizan un sobresalto, que puede o no estar seguido de una respuesta de freezing. Este reflejo también se adquiere postnatalmente. En las crías de la F1-VPA el reflejo de sobresalto presenta un retraso en su aparición que se manifiesta como un menor porcentaje de ratones en los que se observa este reflejo a P15 (Kazlauskas et al., 2016).

En el caso de los machos de la F2/LM, no registramos la aparición del reflejo en P9 ni P11. Sin embargo, observamos una tendencia al retraso en la aparición del reflejo, que llamativamente se presentó más temprano que en la F1, durante P13 [P13: $X^2(1) = 3.793$ $p = 0.0515$]. Esta tendencia a la disminución en la proporción de ratones que presentan el reflejo se mantuvo durante P15, aunque este efecto no fue significativo [P15: $X^2(1) = 2.528$ $p = 0.1119$] y a partir de P17 todos los machos adquirieron el reflejo (Figura V.4E).

Las hembras de la F2/LM, al igual que los machos comenzaron a expresar el reflejo durante P13 aunque no se registró un efecto asociado al pedigrí [P13: $X^2(1) = 1.414$ $p = 0.2344$]. Sin embargo se observó una tendencia en el retraso de la aparición del reflejo a P15 [P15: $X^2(1) = 3.353$ $p = 0.0671$], la cual desapareció durante P17 y P19 cuando todas las hembras adquirieron el reflejo (Figura V.4F)

Fuerza de agarre

Con el fin de evaluar la fuerza y coordinación neuromuscular de los animales, realizamos el ensayo de fuerza de agarre. Los ratones de la F1-VPA presentan a P13 una mayor latencia a caerse de la red colgante (Kazlauskas et al., 2016). Si bien un aumento en la latencia no es lo que uno esperaría en caso de que hubiese una alteración neurológica, este efecto desaparece dos días después y tiende a ser menor durante P15 y P17. En el trabajo de Kazlauskas et al. (2016) se propone que este aumento observado en P13 puede estar influenciado por el menor peso de los animales F1-VPA.

En la F2/LM podemos observar que el patrón de desarrollo de la fuerza de agarre es muy parecido al del grupo control y que no se observan diferencias asociadas al pedigrí en

machos ni en hembras [Modelo lineal general y mixto: Machos: interacción pedigrí-tiempo: $F(4)= 0.41$ $p= 0.8042$, pedigrí: $F(1)= 1.47$ $p= 0.2528$, tiempo: $F(4)= 9.381$ $p<0.0001$, Figura V.4G; Hembras: Interacción pedigrí-tiempo: $F(4)= 0.65$ $p= 0.6245$, pedigrí: $F(1)= 0.23$ $p= 0.6385$, tiempo: $F(4)= 89.74$ $p<0.0001$, Figura V.4H].

En **resumen**, el efecto más saliente encontrado en los animales de la F2/LM fue el menor peso de las crías hembras y machos del pedigrí VPA. Tanto las madres tratadas prenatalmente con VPA (F1-VPA) como su descendencia, presentaron una menor ganancia de peso desde edades tempranas en el desarrollo. En cuanto a los marcadores de desarrollo neurológico que se encontraron alterados en la F1-VPA, vemos que la descendencia (F2-VPA) presenta tendencias que van en el mismo sentido que las alteraciones reportadas previamente: una menor proporción de animales que expresan el reflejo de sobresalto entre P13 y P15 en el caso de las hembras y en P13 en el caso de los machos.

V.4.3.2. Comportamiento en la adultez de la F2 - linaje materno

Como mencionamos en la introducción, las principales características diagnósticas del autismo son la disminución en los niveles de sociabilidad y la presencia de comportamientos repetitivos. El autismo suele estar asociado a otros desórdenes psiquiátricos que se presentan con alta comorbilidad, como la ansiedad y la depresión. El modelo VPA que utilizamos recapitula estas características así como también las enfermedades asociadas (Tabla V.2, Campolongo et al., 2018). Sin embargo, es importante aclarar que estas alteraciones se encuentran descritas principalmente en machos, debido principalmente a que la incidencia del autismo es 4:1 en varones respecto a mujeres. Si bien actualmente la tendencia está cambiando hacia el estudio de los dimorfismos sexuales dentro del modelo (Kazlauskas et al., 2019, Tartaglione et al., 2019), la mayoría de las descripciones han sido realizadas en machos. Sabemos que en nuestro modelo existe un dimorfismo sexual en cuanto a la sociabilidad: la reducción de la sociabilidad se observa en machos de la F1-VPA pero no en hembras (Kazlauskas et al., 2019). Sin embargo, no contamos con una caracterización de la conducta en la adultez de las hembras tan completa como en los machos.

Como mencionamos, el VPA es un inhibidor de las deacetilasas de histonas que podría afectar la expresión de genes, tanto de células somáticas como de células germinales. Por lo tanto, creemos que podría generar cambios epigenéticos heredables a través del linaje materno, por más que las alteraciones conductuales (como la reducción de la sociabilidad) no se observen en las hembras adultas de la F1-VPA. Por este motivo incluimos su estudio en este trabajo y tomamos de referencia para determinar si hubo herencia del fenotipo a nivel conductual en la adultez, los ensayos realizados en los machos adultos F1-VPA. En la Figura V.2C se indica la batería de ensayos conductuales realizado a los animales adultos de la F2/LM.

Análisis sobre los niveles de sociabilidad en la F2/LM: Test de Interacción social

Como mencionamos recientemente, los machos de la F1-VPA y no las hembras, muestran una reducción en el tiempo que huelen un ratón estímulo durante el ensayo de interacción social (Campolongo et al., 2018, Kazlauskas et al., 2019). En la F2/LM, el ANOVA reveló que no hay diferencias en el tiempo que los ratones machos o hembras huelen el estímulo social independientemente de su pedigrí [ANOVA de un factor: Machos: $F(1,30) = 0.25$ $p = 0.6185$, Hembras: $F(1,38) = 0.53$ $p = 0.4722$; Figura V.5A]. Además tanto los machos como las hembras presentan preferencia por el lado social [Prueba de t-pareada: Machos F2-VPA: $t(15) = 3.98$ $p = 0.0011$, Machos F2-SAL $t(16) = 5.90$ $p < 0.0001$, Hembras F2-VPA: $t(19) = 4.51$ $p = 0.0002$, Hembras F2-SAL: $t(19) = 5.36$ $p < 0.0001$].

Otra manera de analizar la conducta social es a partir de un índice de sociabilidad. El mismo se calcula como la diferencia del tiempo que el ratón está oliendo al estímulo social respecto al tiempo que está oliendo el objeto. En este caso tampoco observamos un efecto asociado al pedigrí [ANOVA de un factor: Machos: $F(1,31) = 0.47$ $p = 0.4999$, Hembras: $F(1,38) = 0.14$ $p = 0.7062$; Figura V.5B].

El análisis de la etapa de habituación mostró que los animales huelen una cantidad de tiempo parecida cada una de las cámaras [Prueba de t-pareada: Machos F2-VPA: $t(16) = 0.07$ $p = 0.8013$, Machos F2-SAL: $t(14) = 0.10$ $p = 0.9234$, Hembras F2-VPA: $t(19) = 0.26$ $p =$

0.8013, Hembras F2-SAL: $t(19) = 0.77$ $p = 0.4833$; Figura V.5C], mostrando que no existe una preferencia por lado.

Estos resultados muestran que en la F2/LM no se expresa la reducción en los niveles de sociabilidad observada en los machos F1-VPA, y nos permite concluir que no hay transmisión de este rasgo por la línea materna.

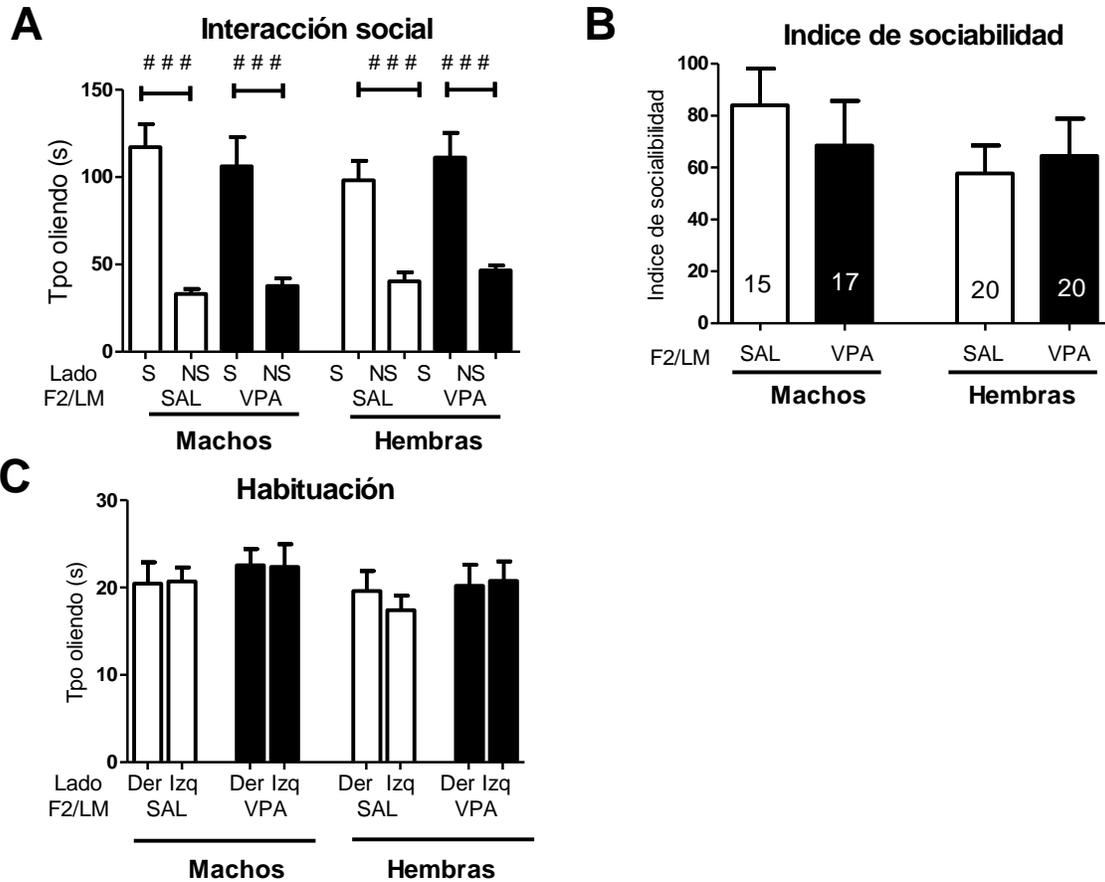


Figura V.5. Niveles de sociabilidad de la F2/LM. Los machos y las hembras de la F2/LM mostraron una preferencia por el estímulo social (A). No se registraron diferencias en el índice de sociabilidad entre los individuos descendientes de madres F1-VPA o F1-SAL (B). En la sesión de habituación los animales no presentaron preferencia por ninguna de las cámaras (C). N, en las barras en B. Prueba de t-pareada: ### $p < 0.001$. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre la neofobia en la F2/LM: Ensayo de Reconocimiento de un objeto novedoso

La reducción en la exploración durante el ensayo de interacción social puede deberse a un comportamiento neofóbico, relacionado a la novedad que representa el estímulo social. El ensayo de reconocimiento de un objeto novedoso (NOR) nos permitió determinar la capacidad de un ratón de distinguir un objeto familiar de uno desconocido (novedoso) y evaluar su respuesta al mismo, así como evaluar su memoria de corto término. En caso de observar un comportamiento neofóbico es de esperar que el ratón explore menos tiempo el objeto novedoso durante este ensayo, resultado que también puede indicar fallas en la adquisición, consolidación o evocación de la memoria de corto término.

Los machos F1-VPA no muestran diferencias en el tiempo de exploración del estímulo novedoso (Campolongo et al., 2018), consistente con la idea de que no presentan indicios de neofobia ni alteraciones en este tipo de memoria.

En la F2/LM calculamos el índice de discriminación entre el objeto desconocido y el familiar como la diferencia entre el tiempo que se explora el objeto novedoso respecto del conocido, relativizado al tiempo total de exploración. En cuando al índice no registramos un efecto asociado al pedigrí en ninguno de los dos sexos analizados [ANOVA de un factor: Machos: $F(1,31)= 2.54$ $p= 0.1214$, Hembras: $F(1,38)= 1.13$ $p= 0.2971$; Figura V.6A], pero observamos una disminución en la exploración de la arena durante la presentación del objeto novedoso por parte de los machos F2-VPA [ANOVA de un factor: Machos: $F(1,30)= 6.80$ $p= 0.0140$, Hembras: $F(1, 38)= 0.02$ $p= 0.0859$; Figura V.6B].

Así, los machos F2-VPA mostraron una menor distancia total recorrida que los machos F2-SAL en la sesión en la que se presenta el objeto novedoso, pero dado que esto no tuvo un efecto significativo sobre el índice de discriminación, concluimos que los animales no presentan un comportamiento neofóbico. En las hembras, ni la distancia recorrida ni el índice de discriminación mostraron diferencias, lo que indica que las hembras no estarían evitando el objeto novedoso.

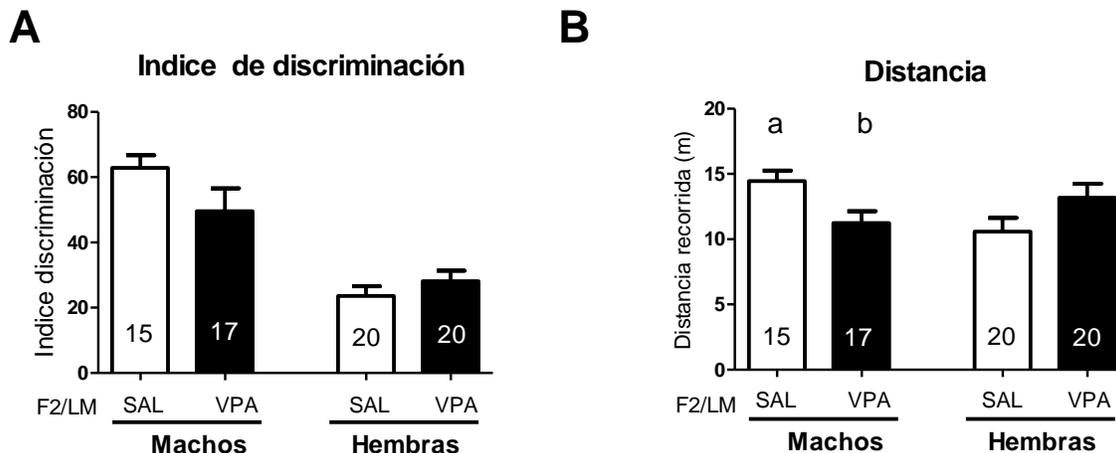


Figura V.6. Reconocimiento de un objeto novedoso en la F2/LM. Los machos y hembras descendientes de hembras expuestas prenatalmente a VPA no mostraron alteraciones en el índice de discriminación de un objeto novedoso (A). Adicionalmente, la locomoción de los machos F2-VPA durante el ensayo fue menor que la de los machos F2-SAL, mientras que no se observaron diferencias en las hembras (B). N, en las barras. ANOVA un factor; letras distintas indican diferencias significativas $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre comportamientos repetitivos en la F2/LM: Ensayos de Laberinto en Y y autoacicalamiento

El ensayo del laberinto en Y generalmente es utilizado para evaluar memoria de trabajo, pero también puede ser utilizado para determinar si un animal está realizando comportamientos repetitivos. El ensayo se basa en la característica de los roedores de preferir explorar espacios novedosos frente a espacios conocidos. Durante este ensayo uno puede determinar cuáles son los brazos que visita el ratón y el orden en que lo hace, lo cual permite calcular las alternancias en el laberinto. Un menor número de alternancias está asociado a la presencia de un comportamiento repetitivo, ya que si el ratón no alterna está eligiendo volver a un brazo que acaba de visitar por sobre uno nuevo.

Los ratones F1-VPA muestran un menor porcentaje de alternancias que los controles en este ensayo (Campolongo et al., 2018). Sin embargo este rasgo no parece ser heredado por vía materna, ya que no se observa un efecto asociado al pedigrí en los ratones de la F2/LM [ANOVA de un factor: Machos: $F(1,30) = 1.58$ $p = 0.2181$, Hembras: $F(1,38) = 0.02$ $p = 0.8895$; Figura V.7A]. A modo de control evaluamos las diferencias de

exploración, registrando la distancia recorrida en el laberinto. El ANOVA no mostró diferencias en la distancia recorrida por los diferentes grupos [Machos: $F(1,30)= 0.05$ $p= 0.8171$, Hembras: $F(1,38)= 2.54$ $p= 0.1195$; Figura V.7B].

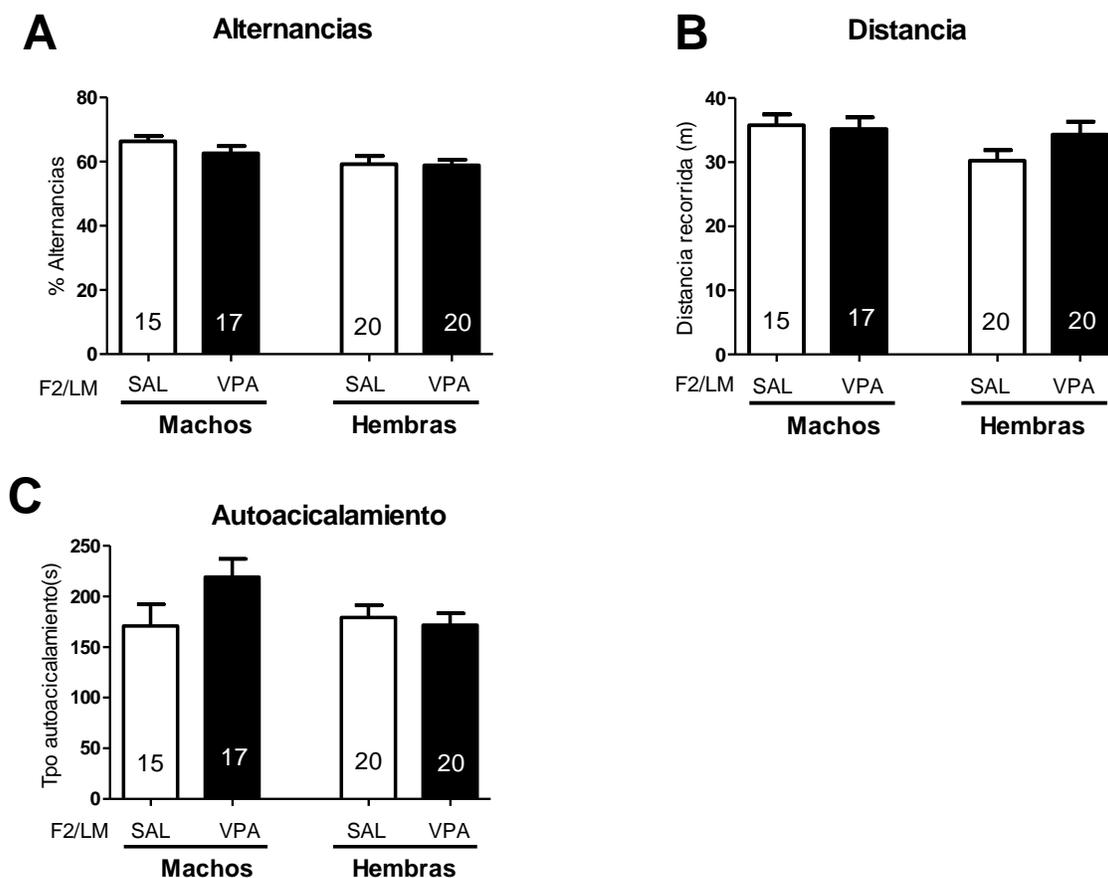


Figura V.7. Comportamientos repetitivos en la F2/LM. No se observaron diferencias en el porcentaje de alternancias en el laberinto en Y (A) o el tiempo de autoacicalamiento (C) en función al pedigrí. Tanto las hembras como los machos recorrieron distancias similares a la de sus controles en el laberinto en Y (B). N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

Por otro lado, acicalarse a sí mismo es un comportamiento espontáneo y natural en los roedores. Esta conducta puede intensificarse si los ratones son expuestos a una situación estresante. Durante el ensayo de autoacicalamiento, el animal fue colocado en un tubo que limita la cantidad de movimientos que pueden hacer y además los estresa, y se cuantifica el tiempo que el animal pasa autoacicalándose. Campolongo et al. (2018) describió que la F1-

VPA muestra un aumento del tiempo que los ratones se acicalan a sí mismos respecto a los controles. Sin embargo, en los ratones de la F2/LM no se observaron diferencias entre los grupo F2-VPA y su control [ANOVA de un factor: Machos: $F(1,30)= 3.08$ $p= 0.0892$, Hembras: 1.58 $p= 0.2167$; Figura V.7C].

Los resultados obtenidos tanto en el laberinto en Y como el test de autoacicalamiento demuestran que no se heredan los comportamientos repetitivos a la siguiente generación a través del linaje materno.

Análisis sobre comportamientos asociados a depresión en la F2/LM: Ensayos de suspensión de la cola y de nado forzado

Los ensayos de suspensión de la cola y de nado forzado se fundamentan en la desesperanza como un comportamiento relacionado con la depresión. Durante estos ensayos los animales intentan liberarse de una situación adversa hasta que eventualmente empiezan a dejar de hacerlo, lo que se interpreta como desesperanza. Se mide entonces el tiempo que el animal se mantiene inmóvil, como expresión de dicha desesperanza. Estos ensayos han sido ampliamente empleados en modelos de depresión debido a que la administración de antidepresivos disminuye el tiempo de inmovilidad en ratones.

Los animales del modelo VPA (F1-VPA) muestran una tendencia marcada a un mayor tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión de la cola (Campolongo et al., 2018). Sin embargo en la F2/LM el análisis estadístico no mostró un efecto sobre el tiempo de inmovilidad asociado al pedigrí [ANOVA de un factor: Machos: $F(1,29)= 0.06$ $p= 0.8104$, Hembras: $F(1,34)= 1.28$ $p= 0.2167$; Figura V.8A]. Por otro lado, en el ensayo de nado forzado, los ratones F1-VPA muestran un tiempo de inmovilidad significativamente mayor que su control (Campolongo et al., 2018). En la F2/LM los machos muestran niveles similares de inmovilidad, mientras que las hembras descendientes de madres F1-VPA presentan menor tiempo inmóvil que su control [Machos: $F(1,30) = 2.92$ $p= 0.0980$, Hembras: $F(1,38)= 5.40$ $p= 0.0255$; Figura V.8B]. Este resultado es llamativo, ya que esperábamos que el tiempo hubiese sido mayor en caso de existir la herencia de un fenotipo a través de las generaciones.

En base a lo observado concluimos que no se heredan los comportamientos asociados a depresión en la F2 a través del linaje materno.

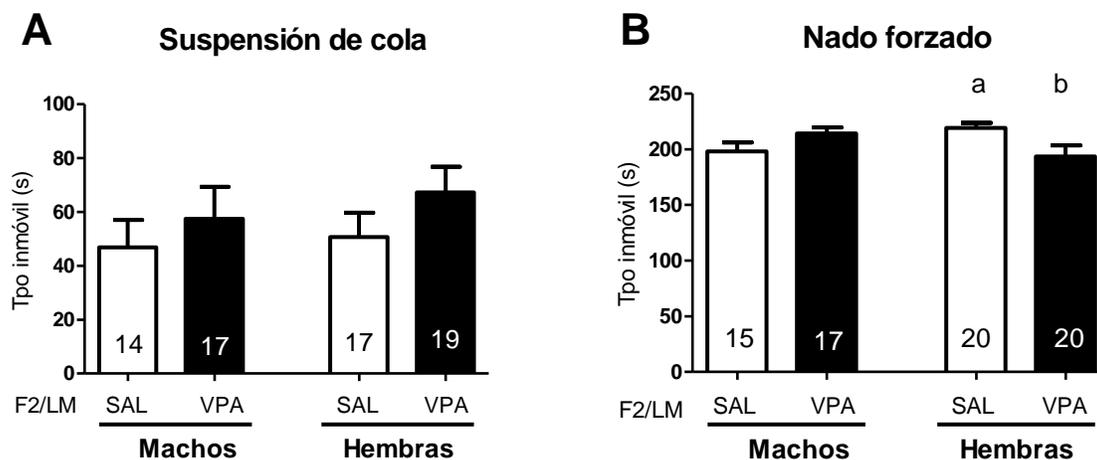


Figura V.8. Comportamientos asociados a la depresión en la F2/LM. No se observaron diferencias en el tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión de la cola en machos y hembras de la F2/LM (A). Las hembras F2-VPA mostraron menor tiempo de inmovilidad en el ensayo de nado forzado, mientras que en los machos F2-VPA no mostraron diferencias respecto de su control (B). ANOVA de un factor; letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E.

V.4.4. Conclusiones y discusión sobre la herencia intergeneracional a través del linaje materno

Como mencionamos, el cuidado materno en roedores puede afectar la fisiología, la expresión de genes y la conducta de la descendencia (Champagne et al., 2001, Curley et al., 2017). Francis et al. (1999) describieron que las crías hembras cuyas madres presentaban altos niveles de LGP también mostraban elevados niveles de este comportamiento hacia su propia descendencia. Adicionalmente, las crías descendientes de madres con altos o bajos niveles de cuidado materno presentaron una respuesta diferencial ante el estrés, mediada en parte por alteraciones en la expresión del receptor de glucocorticoides. Esta expresión diferencial se encontró asociada a marcas epigenéticas determinadas por metilaciones diferentes del promotor de este gen (Champagne & Curley, 2005). Uno de los avances más interesantes en el campo del cuidado materno en roedores es que los niveles del LGP y las respectivas marcas epigenéticas pueden ser transmitidos a las siguientes generaciones hasta

la F3 inclusive (Francis et al., 1999, Champagne et al., 2003, Champagne & Curley, 2005). De manera similar, estudios en macacos rhesus demostraron que las crías de madres que expresaban niveles altos de comportamiento abusivo repetían este patrón con su propia descendencia; sin embargo, si a las crías se les cambiaba la madre abusiva por una madre adoptiva no-abusiva este patrón no era heredado (Maestripieri, 2005). Esto provee un mecanismo de herencia o transmisión de un comportamiento a través de las sucesivas generaciones determinado por la propia conducta de las madres (algunos autores lo consideran modificaciones epigenéticas contexto-dependiente).

Existen diferentes opiniones en relación a si el cuidado materno opera a través de un mecanismo de herencia transgeneracional. Algunos autores lo consideran como un tipo de herencia transgeneracional ya que la conducta y las marcas puede heredarse hasta la F3 inclusive (Francis et al., 1999, Champagne, 2008). Mientras que otros autores, si bien lo reconocen como una forma de herencia transgeneracional, lo diferencian del mecanismo de herencia mediado por las gametas (Daxinger et al., 2012). La principal crítica radica en que las modificaciones epigenéticas que presentan las crías descendientes de madres con diferentes niveles de cuidado materno son dependientes del contexto (niveles de LGP) y en cada generación el estímulo debe estar presente para que se propague la conducta. Por otro lado, autores más conservadores proponen que “la verdadera” herencia transgeneracional es la que se encuentra basada en las modificaciones epigenéticas en la línea germinal (Crews & Gore, 2014).

Dado que las hembras F1-VPA fueron tratadas prenatalmente con VPA, y que como comentamos recientemente el cuidado materno puede representar por sí mismo un potencial mecanismo de herencia transgeneracional, resultaba importante describirlo para poder interpretar con más claridad los resultados observados en la F2/LM. En base a nuestros resultados concluimos que la exposición prenatal al VPA no genera en las hembras alteraciones en su cuidado materno y nos permite descartar que los cambios observados en las crías de la F2 fuesen consecuencia de un cuidado materno alterado.

Llamativamente son pocos los estudios que han descripto la transmisión de los fenotipos del modelo VPA a través de las generaciones, y mucho más escasos los que estudiaron el linaje materno. Esto podría estar relacionado a que las condiciones maternas afectan a la descendencia durante la gametogénesis así como en su desarrollo postnatal

como mencionamos previamente, por lo que un fenotipo dado suele ser una combinación de estos dos efectos (Mitchell et al., 2016), haciendo más difícil la interpretación de los resultados.

El trabajo de Tartaglione et al. (2019) describe el comportamiento postnatal en la F1, F2 y F3 a través del linaje materno y paterno en ratones de la cepa CD1. Ellos no observaron efectos en el crecimiento somático (largo del cuerpo y de la cola) en la F2 ni en la F3 (Tartaglione et al., 2019). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las crías de la F2/LM presentan un peso menor que su control desde edades muy tempranas del desarrollo. También reportamos en la F2/LM la presencia de un marcador de desarrollo neurológico que presentó una tendencia en el mismo sentido que las alteraciones reportadas en la F1 por Kaslauskas et al. (2016): una menor proporción de animales que desarrollaron el reflejo de sobresalto en P13 y P15 en el caso de los machos F2-VPA y P15 en el caso de las hembras F2-VPA. Esto nos llevó a preguntarnos si esta tendencia podría estar influenciada por el número de animales que se utilizaron, ya que el ensayo de sobresalto acústico fue el único en el que se utilizó un menor número de animales que el reportado en Kaslauskas et al. (2016). Sería interesante determinar si esta tendencia podría ser significativa utilizando un número de animales mayor. Alternativamente, es posible que en la segunda generación se exprese un fenotipo atenuado.

En base a los resultados obtenidos en el periodo postnatal, sólo pudimos concluir que hay herencia intergeneracional del bajo peso de las crías a través del linaje materno.

Por otro lado, este es el primer trabajo (dentro de nuestro conocimiento) donde se estudia la herencia de comportamientos asociados al modelo VPA en animales adultos a través del linaje materno. Nuestros resultados sugieren que no hay herencia intergeneracional de la reducción de la sociabilidad. En cuanto a los comportamientos repetitivos, los resultados obtenidos indican que, si bien los machos F2-VPA tienden a autoacicalarse un tiempo mayor que los machos F2-SAL, este aumento no es significativo. Por otro lado, el porcentaje de alternancias en el laberinto en Y no mostró diferencias, por lo que concluimos que no hay herencia intergeneracional de los comportamientos repetitivos a la F2 a través del linaje materno.

En base a los resultados del ensayo de interacción social y de los ensayos para evaluar comportamientos repetitivos concluimos que las características más salientes del modelo parecerían no ser heredadas. Inicialmente hipotetizamos que esto puede deberse a tres motivos: 1) las alteraciones observadas en los machos de la F1-VPA no son generadas por la inhibición de las deacetilasas de histonas, sino por otros mecanismos de acción del VPA; 2) las alteraciones sí están asociadas a un mecanismo de acción epigenético pero el mismo no ocurre en las gametas o es eliminado durante la gametogénesis, por lo cual no es heredado a través del linaje materno; 3) los efectos epigenéticos son sexo-dependiente, no ocurriendo en las hembras F1-VPA y por tanto no pudiendo transferirse a la descendencia. Lamentablemente nuestro diseño no nos permite discriminar entre estas tres hipótesis.

Si bien muchos estudios sugieren que la depresión presenta un fuerte componente genético, estudios más recientes en modelos animales sugieren que este desorden psiquiátrico también puede ser modulado por componentes epigenéticos (Melas et al., 2012, Sales et al. 2011, Fuchikami et al., 2009). Al analizar el comportamiento asociado a depresión en la F2/LM vemos que por más que los machos y hembras de la F2-VPA tienden a pasar más tiempo inmóvil en el ensayo de suspensión de la cola, este efecto no es significativo. Por otro lado, observamos que las hembras F2-VPA presentaron un menor tiempo de inmovilidad en el ensayo de nado forzado, lo cual no es la respuesta esperada en caso que los animales tengan un fenotipo asociado a depresión. En base a estos resultados concluimos que no hay herencia intergeneracional de los comportamientos asociados a depresión en la F2-VPA de crías machos obtenidos por linaje materno, y que, mínimamente, sería necesario agregar otra cohorte de animales al experimento o evaluar la conducta a través de otro ensayo para poder llegar a una conclusión más clara en cuanto al fenotipo asociado a depresión en las hembras de la F2/LM.

En **resumen**, a través del linaje materno se registró la herencia intergeneracional de la menor ganancia en peso durante el desarrollo postnatal y ciertas tendencias en los marcadores de desarrollo en el mismo sentido de las alteraciones reportadas en la F1. Sin embargo, las conductas en la adultez más representativas del autismo (como la sociabilidad

y los comportamientos repetitivos) y las comorbilidades del modelo (comportamiento asociado a depresión) no mostraron una fuerte evidencia de herencia a través de las madres.

Debido a que no observamos herencia a través del linaje materno de las características más salientes del modelo, no proseguimos con el estudio de la herencia transgeneracional por línea materna (en la F3).

V.5. Resultados Herencia intergeneracional a través del linaje paterno

V.5.1. Diseño experimental

Dado que el objetivo de esta sección fue estudiar la conducta de los animales de la F2 descendientes de machos prenatalmente expuestos a VPA o SAL, se llevó a cabo el diseño experimental indicado en la Figura V.9A y detallado en la sección II.1.3.1 de Materiales y Métodos. A las hembras y machos de la F2/LP se les realizó una batería de ensayos postnatales, y luego los animales fueron destetados por sexo. Las hembras fueron separadas según el linaje VPA o SAL, mientras que en el caso de los machos se realizó un modelo de **rescate social** según Campolongo et al. (2018), el cual será detallado en la siguiente sección. Tanto a los machos como a las hembras adultas se les realizó la batería de ensayos indicados en la Figura V.9B en la adultez.

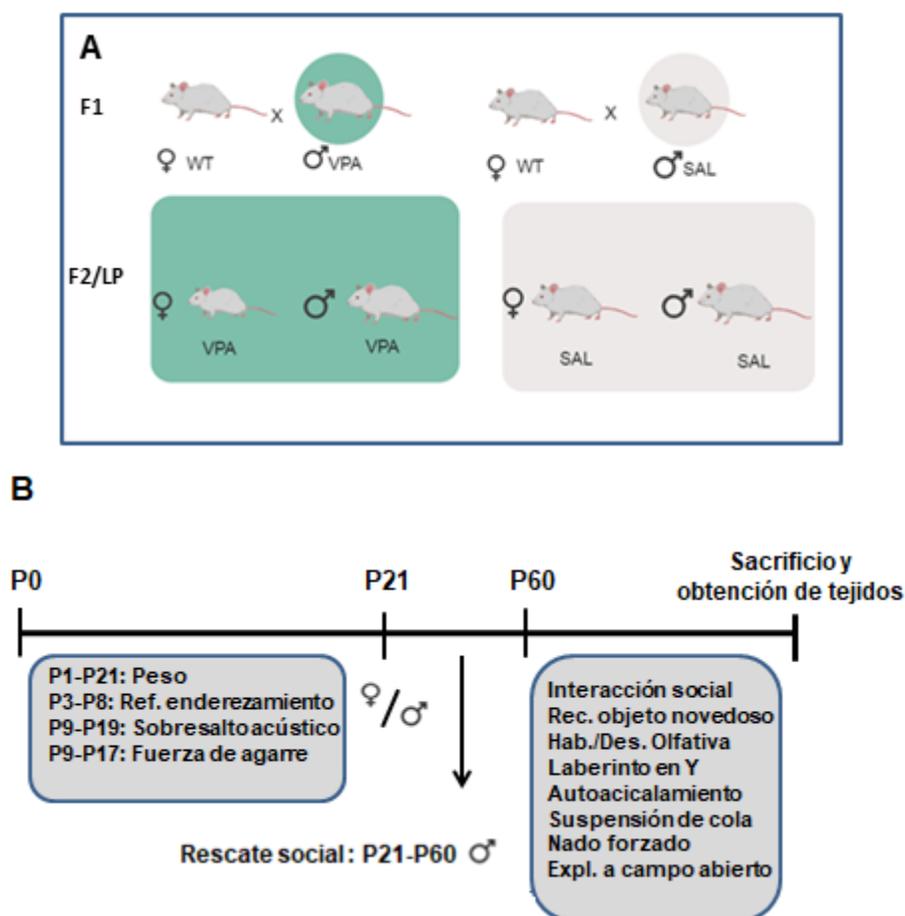


Figura V.9. Diseño experimental utilizado para obtener una F2 de linaje paterno (F2/LP). Se inyectaron a hembras preñadas (F0) el DG 12.5 con VPA o SAL generando el modelo. En la

adulthood, the male offspring treated prenatally with VPA or SAL (F1-VPA or F1-SAL) were crossed with female naïve. From these pairings, an F2 generation was obtained, descending from male VPA (F2-VPA) or male SAL (F2-SAL) (A). These animals underwent a battery of tests during the postnatal period indicated in (B). At P21, the animals were weaned. Females were weaned in cages with other females of the same treatment, while in the case of the males, cages were arranged according to the social rescue model (see section V.5.3). In adulthood, the animals were evaluated in a series of behavioral tests detailed in B.

V.5.2. Comportamiento postnatal de las crías de la F2 -linaje paterno

Con el objetivo de determinar si las alteraciones registradas en el comportamiento postnatal de la F1-VPA (Kazlauskas et al., 2016; Tabla V.1) podían heredarse a través del linaje paterno, se realizó una serie de determinaciones en las crías F2/LP machos y hembras (Figura V.9B).

Ganancia en peso

Se registró el peso de los animales durante el periodo postnatal y se analizó su efecto en función del pedigrí, el tiempo y la interacción entre ambos, tanto en machos como en hembras. El análisis reveló que los machos presentan un efecto significativo en la interacción entre el pedigrí y el tiempo [Modelo lineal general y mixto: interacción pedigrí-tiempo: $F(13)= 4.22$ $p < 0.0001$, pedigrí: $F(1)= 1.49$ $p= 0.2418$, tiempo: $F(13)= 1411.41$ $p < 0.0001$; Figura V.10A]. El análisis *post-hoc* mostró que existe un menor peso de los machos F2-VPA desde P17 a P21. Las hembras también mostraron diferencias en la ganancia de peso, evidenciadas como una interacción entre el pedigrí y el tiempo [Modelo lineal general y mixto: interacción pedigrí-tiempo: $F(13)= 4.93$ $p < 0.0001$, pedigrí: $F(1)= 1.44$ $p= 0.2508$, tiempo: $F(13)= 1300.66$ $p < 0.0001$; Figura V.10B], registrando pesos significativamente más bajos en el grupo F2-VPA en P17 y P21.

Estos resultados concuerdan con los observados en la generación anterior, ya que en la F1-VPA también se registró un menor peso en los animales expuestos prenatalmente a VPA, aunque en dicha generación este rasgo se observó más tempranamente (a partir de P8).

Enderezamiento en la superficie

Se procedió a evaluar la latencia de enderezamiento de los animales descendientes de machos F1-VPA, en comparación con los descendientes de machos F1-SAL. Tanto en machos como en hembras el análisis estadístico no mostró efectos significativos asociados al pedigrí, al tiempo o a su interacción [Modelo lineal general y mixto: Machos: interacción pedigrí-tiempo: $F(5)= 1.92$ $p= 0.0923$, pedigrí: $F(1)= 0.40$ $p= 0.5387$, tiempo: $F(5)= 17.80$ $p< 0.0001$; Figura V.10C; Hembras: interacción pedigrí-tiempo: $F(5)=1.62$ $p=0.1669$, pedigrí $F(1)= 0.06$ $p= 0.8901$, tiempo: $F(5)= 1.72$ $p= 0.1428$; Figura V.10D].

Sobresalto acústico

En los machos de la F2/LP no observamos la aparición del reflejo de sobresalto hasta P13 (Figura V.10E). Durante P13 (que ya aparece la respuesta en algunos animales) y P15 no registramos un efecto asociado al pedigrí con la prueba de χ^2 -cuadrado [P13: $\chi^2(1)= 0.794$ $p= 0.3730$, P15: $\chi^2(1)= 0.653$ $p= 0.4190$]. A partir de P17 el 100% de los machos han adquirido este reflejo. En las hembras F2/LP el reflejo también aparece en P13 y tampoco se observaron diferencias respecto del control [P13 $\chi^2(1)= 1.978$ $p= 0.1596$, P15: $\chi^2(1)= 1.544$ $p= 0.2140$; Figura V.10F]. Al igual que en los machos, para el P17 todas de las hembras han adquirido esta respuesta.

En la F1-VPA se observó en P15 un menor porcentaje de animales con este reflejo, por lo que podemos concluir que este rasgo no ha sido heredado a los machos o hembras de la F2/LP.

Fuerza de agarre

En el caso de los machos F2/LP observamos que la fuerza de agarre se mantiene similar entre los grupos hasta P13. A edades posteriores se registró un incremento en la latencia a caer en los machos F2-VPA (Figura V.10G). El análisis estadístico no mostró un efecto de la interacción entre pedigrí y el tiempo [Modelo lineal general y mixto: interacción pedigrí-tiempo: $F(4)= 1.92$ $p= 0.1107$], pero sí se observó un efecto asociado al pedigrí [$F(1)= 4.94$ $p= 0.0432$] y al tiempo [$F(4)= 70.77$ $p< 0.0001$] por separados. Los machos F2-VPA/LP muestran una mayor latencia a caer, particularmente evidente a partir de P15.

Por otro lado, en las hembras F2-VPA/LP se observó una latencia a caer similar a la de sus controles hasta P13, sin embargo el análisis no reveló un efecto de interacción entre el pedigrí y la edad [Modelo lineal general y mixto: $F(4)= 0.30$ $p= 0.8736$] ni un efecto del pedigrí [$F(1)= 1.51$ $p= 0.238$]. Se observó un efecto significativo del tiempo [$F(4)= 145.60$ $p<0.0001$; Figura V.10G] evidenciando el desarrollo de los animales.

Como mencionamos previamente, en la generación anterior se ha observado una mayor latencia a caer de los animales F1-VPA durante P13, que luego se comportan de manera similar a los controles. En la F2/LP observamos un comportamiento similar en los machos, aunque aparece más tardíamente (en P15). Como desarrollaremos en la conclusión, esto puede estar influenciado por el peso de los animales.

En resumen, al igual que lo observado en el linaje materno, la menor ganancia de peso parece ser un rasgo heredado a través del linaje paterno en hembras y machos, aunque en el caso de la F2/LP se expresa a edades posnatales más cercanas a P21. De los marcadores de desarrollo analizados, en líneas generales no observamos herencia de las alteraciones en los mismos. Por otro lado, un resultado llamativo fue que los machos de la F2-VPA obtenidos por linaje paterno mostraron un marcado aumento en la fuerza de agarre a partir de P15, siendo esta alteración más marcada que la observada en la F1-VPA.

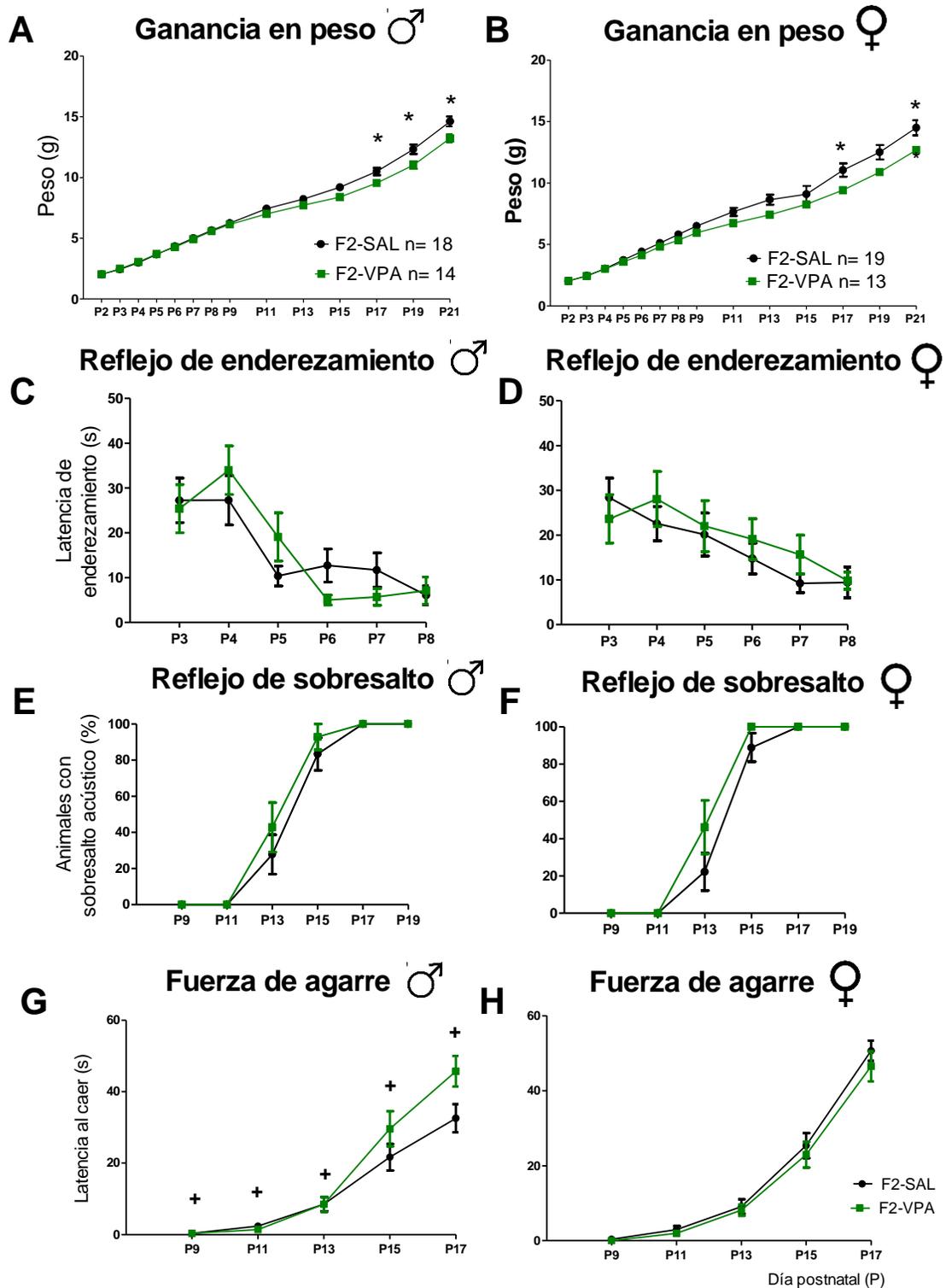


Figura V.10. Comportamiento postnatal de la F2/LP. Los ratones machos cuyos padres fueron expuestos prenatalmente a VPA tienen un peso menor que sus controles desde P17 a P21 (A), mientras que en las hembras esta disminución se observó en P17 y P21 (B). No se observaron diferencias en la latencia a enderezarse de los machos (C) ni las hembras F2-VPA (D). No se

encontraron diferencias en el porcentaje de machos (E) o hembras F2-VPA (F) que respondieron al estímulo sonoro a las distintas edades postnatales. Los machos F2-VPA presentaron un efecto asociado al linaje expresado como una mayor fuerza de agarre (G), mientras que en las hembras F2-VPA mostraron latencias a caer similares a las de las hembras F2-SAL (H). Machos: $N_{F2-SAL} = 18$ y $N_{F2-VPA} = 14$; Hembras: $N_{F2-SAL} = 18$ y $N_{F2-VPA} = 13$; en todos los ensayos salvo en la ganancia en peso que se indica en el gráfico. A-D y G-H: Modelo lineal generalizado y mixto seguido de la prueba LSD Fisher: * indican diferencias significativas $p < 0.05$. E-F: Ensayo de Chi cuadrado. Se grafica la media \pm E.E.

V.5.3. Comportamiento en la adultez de las hembras de la F2 - linaje paterno

Análisis sobre los niveles de sociabilidad en las hembras F2/LP: Ensayo de Interacción social

Pudimos observar que las hembras descendientes de machos VPA o SAL tienen una preferencia marcada por el lado social [Prueba de t-pareada: F2-SAL: $t(11) = 4.90$ $p = 0.0005$, F2-VPA: $t(8) = 53.87$ $p = 0.0085$; Figura V.11A]. El ANOVA nos indica que no hay un efecto asociado al pedigrí en el tiempo que huelen el ratón estímulo [ANOVA de un factor: $F(1,19) = 1.18$ $p = 0.2903$; Figura V.11A]. En el índice de sociabilidad tampoco detectamos diferencias entre los grupos [ANOVA de un factor: $F(1,19) = 0.66$ $p = 0.4273$; Figura V.11B]. Por último, en la fase de habituación confirmamos que los ratones no muestran preferencia por ninguna de las cámaras [Prueba de t-pareada: F2-SAL: $t(11) = 1.26$ $p = 0.2336$, F2-VPA: $t(8) = 0.74$ $p = 0.4704$; Figura V.11C]. Considerando estos resultados concluimos que no hay herencia de los niveles de sociabilidad a través del linaje paterno a las crías hembras.

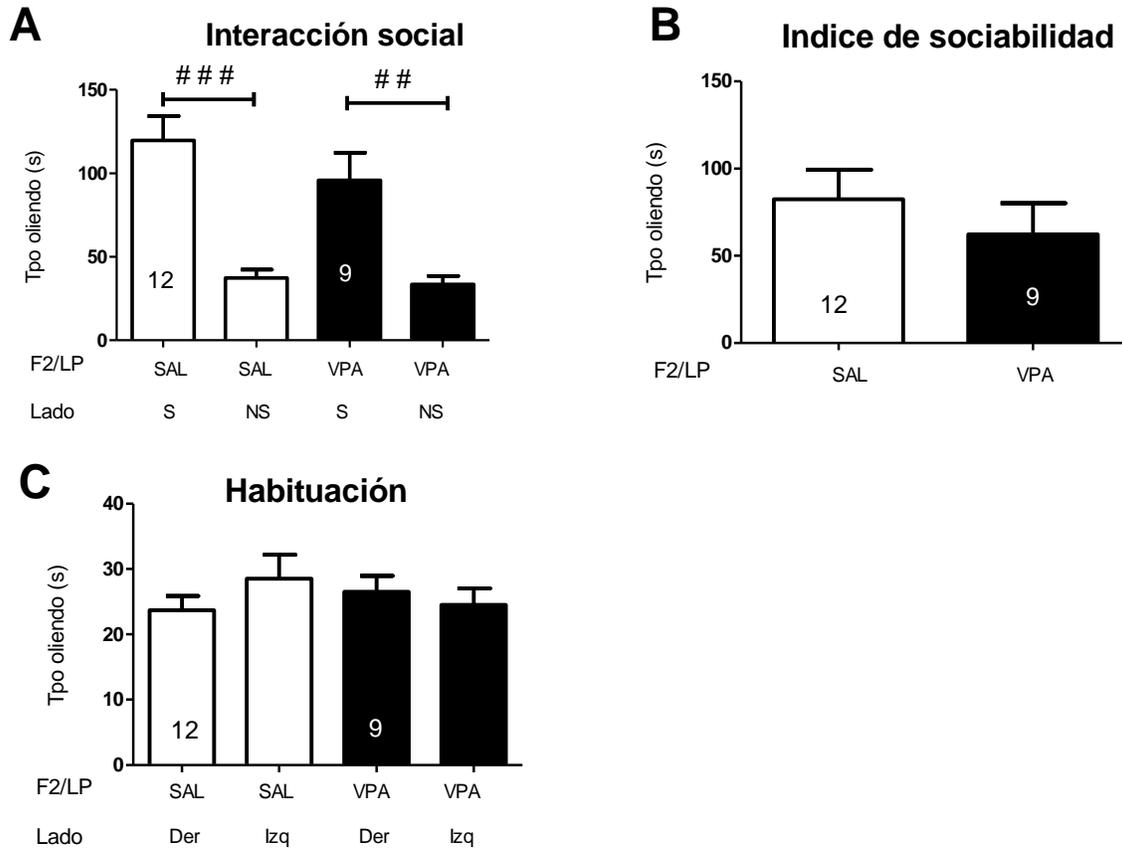


Figura V.11. Niveles de sociabilidad de las hembras F2/LP. Tanto las hembras derivadas de machos VPA como de machos SAL presentan una preferencia marcada por el estímulo social en el ensayo de interacción social (A). No se registraron diferencias en el índice de sociabilidad (B). Se observó que los animales no presentan preferencia por alguna de las cámaras durante la fase de habituación (C). N, en las barras. Prueba de t-pareada: ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Se grafica la media + E.E.

Análisis de la neofobia en las hembras F2/LP: Ensayo de Reconocimiento de un objeto novedoso

El ANOVA reveló que no hay diferencias significativas en el índice de discriminación entre los dos grupos analizados [ANOVA de un factor: $F(1,19) = 0.25$ $p = 0.6208$; Figura V.12A], así como la distancia recorrida en el ensayo [ANOVA de un factor: $F(1,19) = 0.01$ $p = 0.937$; Figura V.12B]. Estos resultados indican que los animales no muestran un comportamiento de evitación a un objeto novedoso y que tienen niveles similares de memoria de corto plazo.

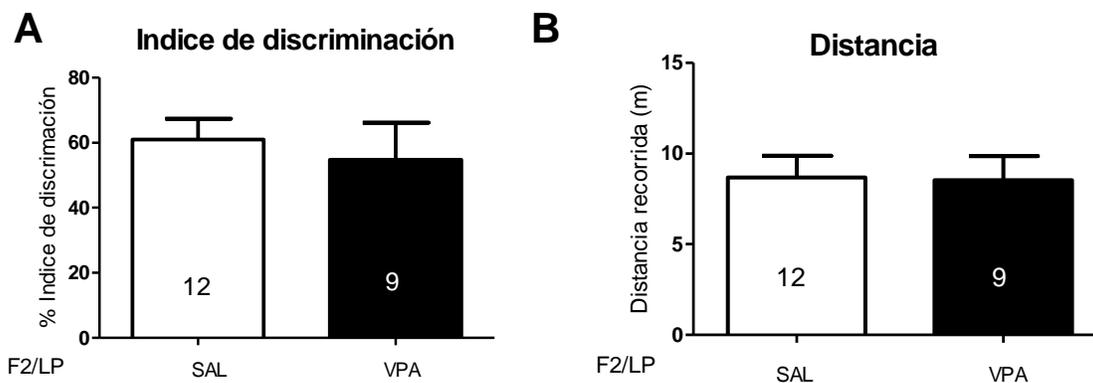


Figura V.12. Ensayo de reconocimiento de un objeto novedoso de las hembras F2/LP. Las hembras F2/LP no mostraron diferencias asociadas al linaje en el índice de discriminación (A) ni en la distancia que recorrieron en la sesión donde se presentó el objeto desconocido (B). N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre la función olfatoria en las hembras F2/LP: Ensayo de habituación/deshabituación olfatoria.

Sabiendo que los machos de la F1-VPA presentan un déficit en la exploración de olores sociales (Campiongo et al., 2018, Tabla V.1), decidimos realizar el ensayo de habituación/deshabituación olfativa en las hembras F2/LP. A partir de este ensayo evaluamos la respuesta y la discriminación de los animales ante diferentes tipos de olores. Se realizaron 3 presentaciones consecutivas de hisopos con distintos olores, en el siguiente orden: Agua (olor neutro), Vainilla, Banana (olores no sociales), Machos, Hembras (olores sociales). Es de esperar que el animal durante la primera presentación del olor muestre interés, y que éste vaya disminuyendo en la segunda presentación, y mucho más en la tercera presentación. Esto es lo que llamaremos habituación al estímulo olfativo. Por otro lado, la presentación de un nuevo olor estimula la exploración, evidenciándose como una deshabituación.

En la Figura V.13 se muestra el tiempo que las hembras F2/LP huelen los diferentes olores. Para analizar este ensayo se realizó un modelo lineal y mixto para cada uno de los olores, los resultados se reportan en la Tabla V.3.

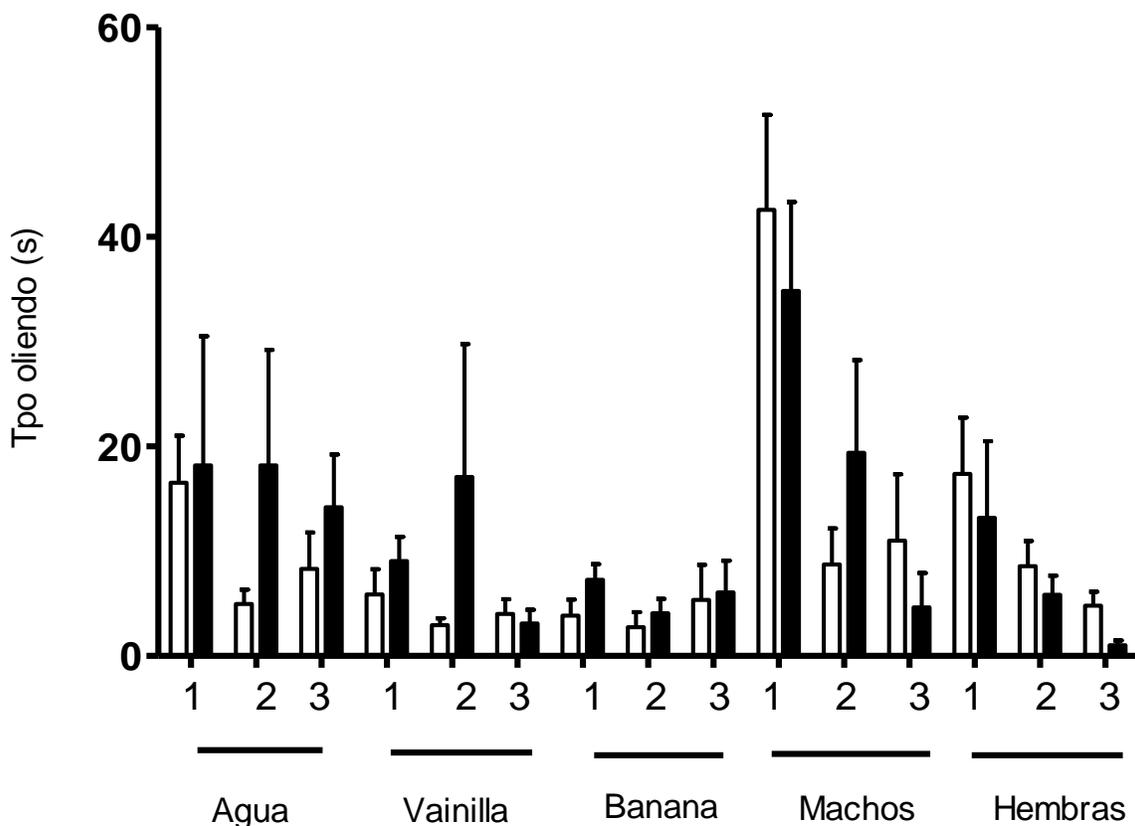


Figura V.13. Habitación/deshabitación olfativa en las hembras F2/LP. No se observaron diferencias en el tiempo que las hembras olieron sucesivas presentaciones de un olor neutro, u olores no sociales. Sin embargo se observó una interacción entre el pedigrí y las presentaciones ante el olor a Machos y un efecto de habituación independiente del pedigrí ante el olor a Hembras. $N_{F2-VPA} = 12$, $N_{F2-SAL} = 7$. Se analizó el tiempo que los animales huelen cada olor por separado, con un Modelo lineal general y mixto. Se grafica la media + E.E.

Variable: tiempo oliendo					
Olores	Agua	Vainilla	Banana	Machos	Hembras
Pedigrí (ped)	F(1)= 0.64 p=0.4359	F(1)= 2.31 p= 0.1468	F(1)= 0.86 p= 0.3675	F(1)= 0.02 P=0.8906	F(1)= 1.16 p= 0.2956
Presentación (pres)	F(2)= 2.30 p= 0.1157	F(2)= 2.90 p= 0.0689	F(2)= 1.04 p= 0.3651	F(2)= 13.20 p= 0.0001	F(2)= 5.93 p= 0.0062
Interacción ped- pres	F(2)= 2.75 p= 0.0784	F(2)= 1.73 p= 0.1929	F(2)= 0.26 p= 0.7731	F(2)= 3.60 p= 0.0381	F(2)= 0.04 p= 0.9591

Tabla V.3. Análisis estadístico del ensayo de Habitación/deshabitación olfativa para cada olor. Modelo lineal general y mixto completo. En negrita se indican las diferencias significativas.

Ante la presentación de los olores Agua, Vainilla, y Banana se observó que el tiempo oliendo no se encontraba afectado por el pedigrí, la presentación de cada olor (habitación) o la interacción entre el pedigrí y la presentación de cada olor (Tabla V.3; Figura V.13). La ausencia de un efecto en el tiempo que los animales huelen los olores en

función de la presentación de ese olor (1, 2, 3) indica que los animales no estarían habituando a los mismos. Dado que esto ocurre tanto en hembras F2-VPA como F2-SAL, creemos que puede estar asociado a la falta de interés de los animales por el estímulo neutro (Agua) como por los olores no sociales (Vainilla y Banana), ya que como vemos en la Figura V.13 los tiempos que los animales huelen estos hisopos en la presentación 1 es menor que la que huelen los olores sociales para la primera presentación (Machos o Hembras).

En cambio, ante la presencia de hisopos con olor a ratones Machos observamos que las hembras mostraron una interacción entre el pedigrí y las presentaciones [$F(2)= 3.60$ $p= 0.0381$; Figura V.13]. Sin embargo la prueba *post-hoc* de LSD Fisher no mostró diferencias significativas entre las hembras F2-VPA y las F2-SAL en ningunas de las presentaciones, sugiriendo que la interacción significativa se debe a diferencias en la habituación de uno y otro grupo a este olor. Por otro lado, las hembras de la F2/LP mostraron ante la presentación del olor a ratones Hembras una habituación al mismo [$F(2)= 5.93$ $p= 0.0062$], la cual resultó ser independiente del pedigrí. En resumen, al analizar los resultados obtenidos no observamos diferencias relevantes en el tiempo que las hembras F2/LP huelen cada uno de los olores en cuanto al pedigrí.

Para profundizar el análisis calculamos los índices de discriminación frente a olores sociales y no sociales. Estos índices nos permitieron entender de qué manera los animales que venían siendo expuestos a un olor determinado responden ante la presentación de un olor diferente. El índice de discriminación social se calcula como la diferencia de tiempo entre la primera presentación (presentación 1) del olor a Hembras y la última presentación (presentación 3) del olor a Machos. Mientras que el índice de discriminación no social se obtiene de la diferencia entre el tiempo que huelen la presentación 1 del olor Banana y la presentación 3 del olor Vainilla. En la Figura V.14 podemos observar que no hay diferencias significativas en el índice de discriminación social [ANOVA de un factor: $F(1,17)= 0.04$ $p= 0.8383$; Figura V.14A] o en el no social para los animales analizados [ANOVA de un factor: $F(1,17)= 1.93$ $p= 0.1826$; Figura V.14B]. Tal vez es llamativo que el grupo F2-SAL muestre un nivel de discriminación cercano a cero de los olores no sociales, sin embargo, como mencionamos antes, este grupo de animales no mostró

demasiado interés por los olores no sociales, como sí vemos que lo hizo para los olores sociales.

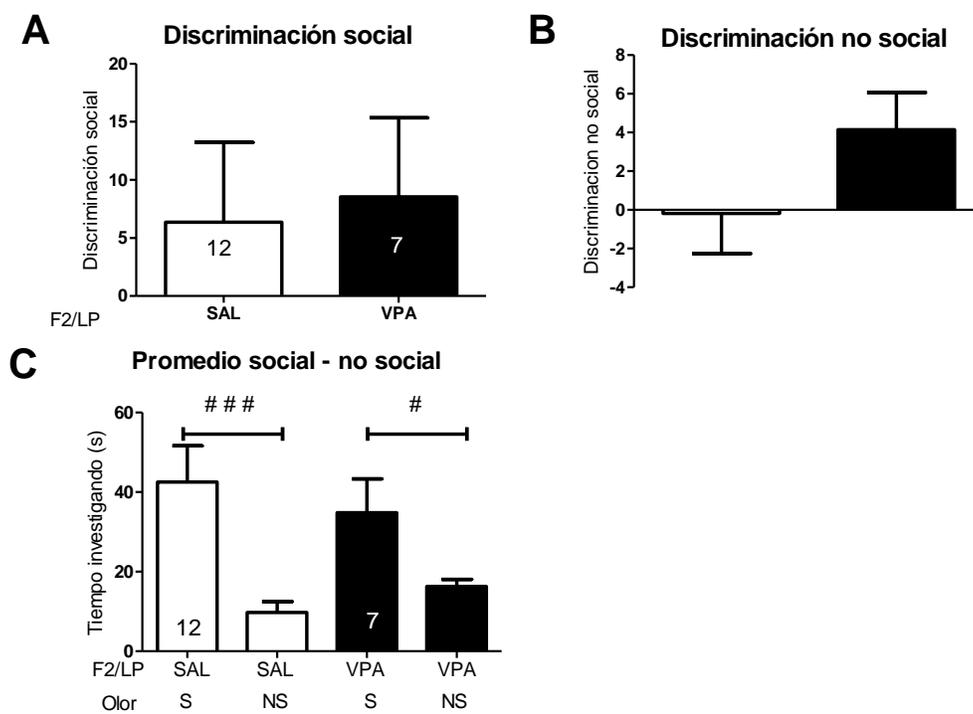


Figura V.14. Parámetros de discriminación e investigación olfativa del test de habituación/deshabituación olfativa de las hembras F2/LP. Las hembras de la F2-VPA y sus controles mostraron índices de discriminación social similares (A). En cuanto a la discriminación de los olores no sociales, el grupo F2-SAL mostró sorpresivamente una discriminación muy baja aunque este efecto no fue estadísticamente diferente respecto del grupo F2-VPA (B). No observamos diferencias asociadas al pedigrí en el tiempo que los animales huelen la primera presentación del hisopo impregnado con olores sociales o no sociales (C). N, en las barras. Prueba de t-pareada: # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$. Se grafica la media + E.E.

Por otro lado, la cantidad de tiempo que los animales pasan investigando un olor novedoso puede dar una idea de la motivación o interés por los mismos. Es por este motivo que agrupamos la primera presentación (presentación 1) de los olores no sociales (Vainilla y Banana) y los sociales (Machos y Hembras), y analizamos el tiempo que los animales exploraban el hisopo. No se observó un efecto del pedigrí asociado a los olores sociales [ANOVA de un factor: $F(1,18) = 0.54$ $p = 0.4705$] o los olores no sociales [ANOVA de un factor: $F(1,18) = 2.82$ $p = 0.1113$] (Figura V.14C). Sin embargo ambos grupos presentan un mayor interés por los olores sociales, aunque en el grupo F2-VPA este efecto se encuentra

al límite de la significancia [Prueba de t pareada: SAL: $t(11)= 4.830$ $p= 0.0005$, VPA: $t(6)=2.450$ $p= 0.0498$]. En la F1 se había registrado que los animales F1-VPA presentaban un menor tiempo oliendo los olores sociales que los F1-SAL, por lo que la reducción en el tiempo de investigación parece que no ha sido heredada a las hembras F2/LP.

Considerando los resultados observados, podemos concluir que no hay herencia de las alteraciones en la función olfativa observadas en la F1-VPA en las hembras F2/LP.

Análisis sobre comportamientos repetitivos en las hembras F2/LP: Ensayos de laberinto en Y y autoacicalamiento

Como mencionamos anteriormente, sabemos que los machos expuestos prenatalmente a VPA muestran un aumento de los comportamientos repetitivos. En términos del desempeño de los animales en el laberinto en Y se expresa como una reducción en el porcentaje de alternancias (Campolongo, et al., 2018). En las hembras de la F2/LP, observamos que las F2-VPA, al igual que sus progenitores VPA, muestran una disminución en el porcentaje de alternancias comparadas con las F2-SAL [ANOVA de un factor: $F(1,19)= 5.39$ $p= 0.0315$; Figura V.15A]. El control de exploración del ensayo indicó que no hay diferencias en la distancia recorrida entre los dos grupos [ANOVA de un factor: $F(1,19)= 0.13$ $p= 0.7251$; Figura V.15B].

En cambio, cuando cuantificamos el tiempo que las hembras pasaban acicalándose no encontramos un efecto asociado al pedigrí [ANOVA de un factor: $F(1,19)= 0.01$ $p= 0.9161$; Figura V.15C], que sí se observaba en los machos de la F1-VPA que muestran un aumento en el tiempo de autoacicalamiento.

El resultado obtenido en el laberinto en Y indica que podría existir un componente de herencia a través del linaje paterno de los comportamientos repetitivos a sus crías hembras.

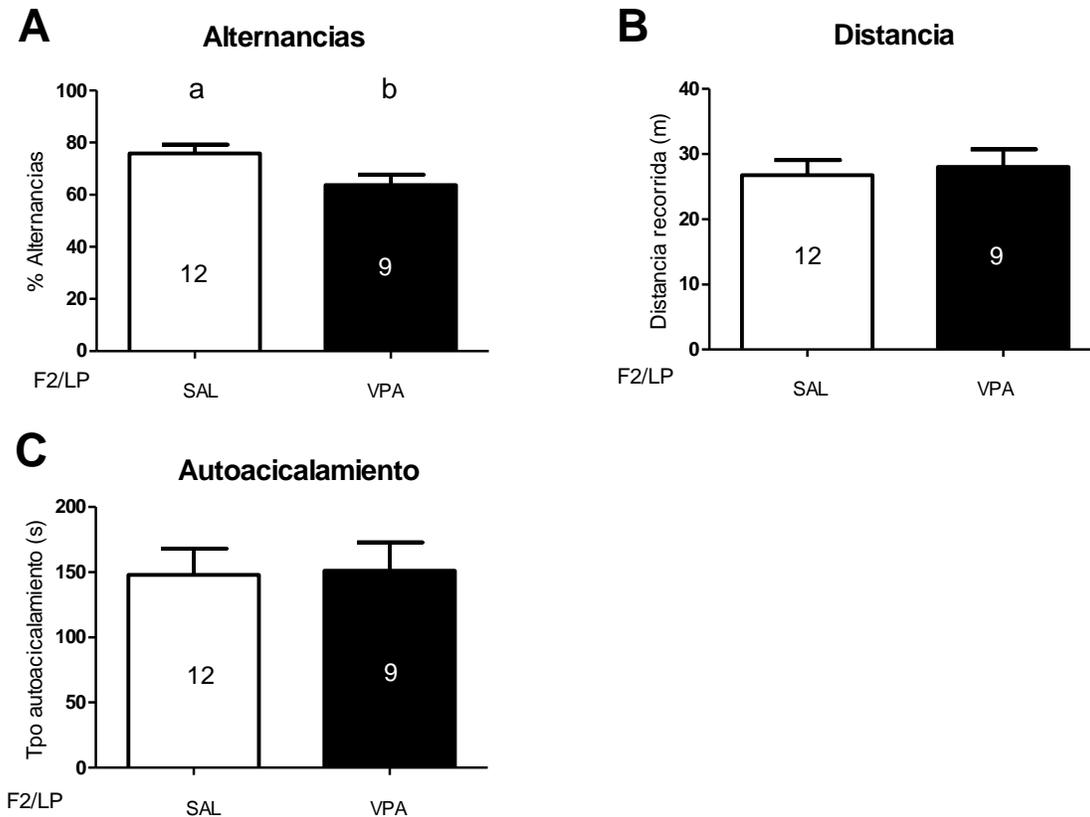


Figura V.15. Comportamientos repetitivos en las hembras F2/LP. Se registró una disminución en el porcentaje de alternancia en las hembras cuyos padres fueron tratados prenatalmente con VPA, respecto a las F2-SAL (A). No hay diferencias en la distancia en que los distintos grupos recorren el laberinto en Y (B). No se registra un efecto asociado al linaje en el tiempo de autoacicalamiento (C). N, en las barras. ANOVA de un factor: letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E.

Análisis de comportamientos asociados a depresión en las hembras F2/LP: Ensayos de suspensión de la cola y de nado forzado

Al analizar la conducta de las hembras F2/LP en el ensayo de suspensión de la cola vemos que éstas tienden a estar más tiempo inmóvil que sus controles, sin embargo este efecto no llega a ser estadísticamente significativo [ANOVA de un factor: $F(1,19) = 3.73$ $p = 0.0686$; Figura V.16A]. Por otro lado, en el ensayo de nado forzado observamos que los dos grupos se mantiene inmóviles un tiempo similar [ANOVA de un factor: $F(1,19) = 0.04$ $p =$

0.8372; Figura V.16B]. Esto nos sugiere que no hay herencia del fenotipo asociado a depresión descrito en los machos F1-VPA (Campolongo et. al, 2018).

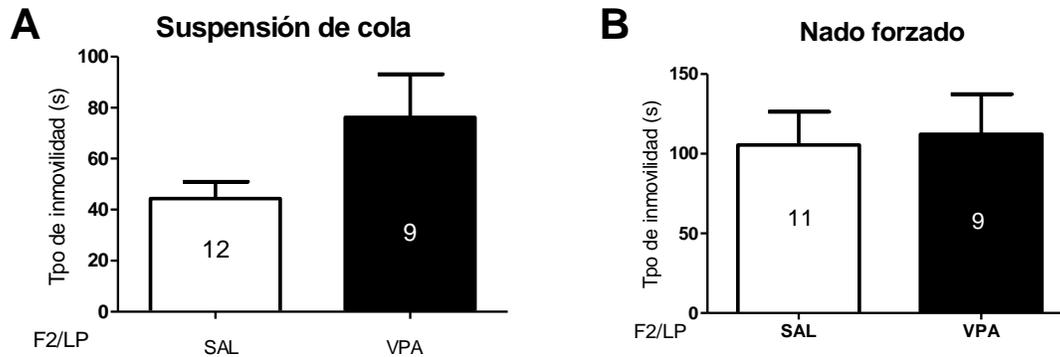


Figura V.16. Comportamientos asociados a depresión en las hembras F2/LP. Se observa que las hembras F2-VPA mostraron una tendencia a un mayor tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión de la cola (A). No se observó un efecto asociado al linaje en el tiempo de inmovilidad registrado en el ensayo de nado forzado (B). N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre comportamientos asociados a ansiedad en las hembras F2/LP: Ensayo de exploración a campo abierto

Sabemos que los trastornos de ansiedad y depresión presentan una alta comorbilidad con el autismo (APA, 2013). Por lo tanto decidimos incluir el ensayo de campo abierto en la batería de ensayos que realizamos a los animales. El ensayo de campo abierto (*open field*, OF) consiste en enfrentar al animal a una arena amplia, novedosa y con una iluminación más intensa en el centro. Este ambiente presenta para al animal un conflicto entre su tendencia innata a explorar ambientes novedosos y el potencial peligro en el centro iluminado, que desencadena comportamientos de tigmotaxia. En este ambiente altamente ansiogénico, una exploración reducida del centro es considerada un comportamiento relacionado a la ansiedad. De hecho, diversos ansiolíticos aumentan la exploración del área central en este ensayo. En el modelo caracterizado en nuestro laboratorio sabemos que los machos F1-VPA recorren una distancia total menor y pasan más tiempo autoacicalándose en el ensayo de campo abierto (Campolongo et al., 2018).

Registramos una tendencia a que las hembras F2-VPA estén menos tiempo en el centro del OF [ANOVA de un factor: $F(1,19)= 2.22$ $p=0.1527$; Figura V.17A] y que recorran una distancia menor en el mismo [ANOVA de un factor: $F(1,19)= 1.34$ $p= 0.2611$, Figura V.17B]. Sin embargo estos efectos no fueron estadísticamente significativos, principalmente porque en ambos grupos existe un porcentaje importante de animales que no visitan el centro de la arena. No observamos diferencias en la distancia total recorrida en el ensayo, una variable que es considerada como un indicador de que los animales están explorando de manera similar la arena [ANOVA de un factor: $F(1,19)= 0.35$ $p= 0.5633$; Figura V.17C]. Observando los resultados, consideramos que si bien evidenciamos una tendencia en el mismo sentido que la F1-VPA, el efecto no es tan grande como para concluir que hay herencia del efecto del VPA sobre este comportamiento relacionado con la ansiedad por parte de los padres VPA a las crías hembras.

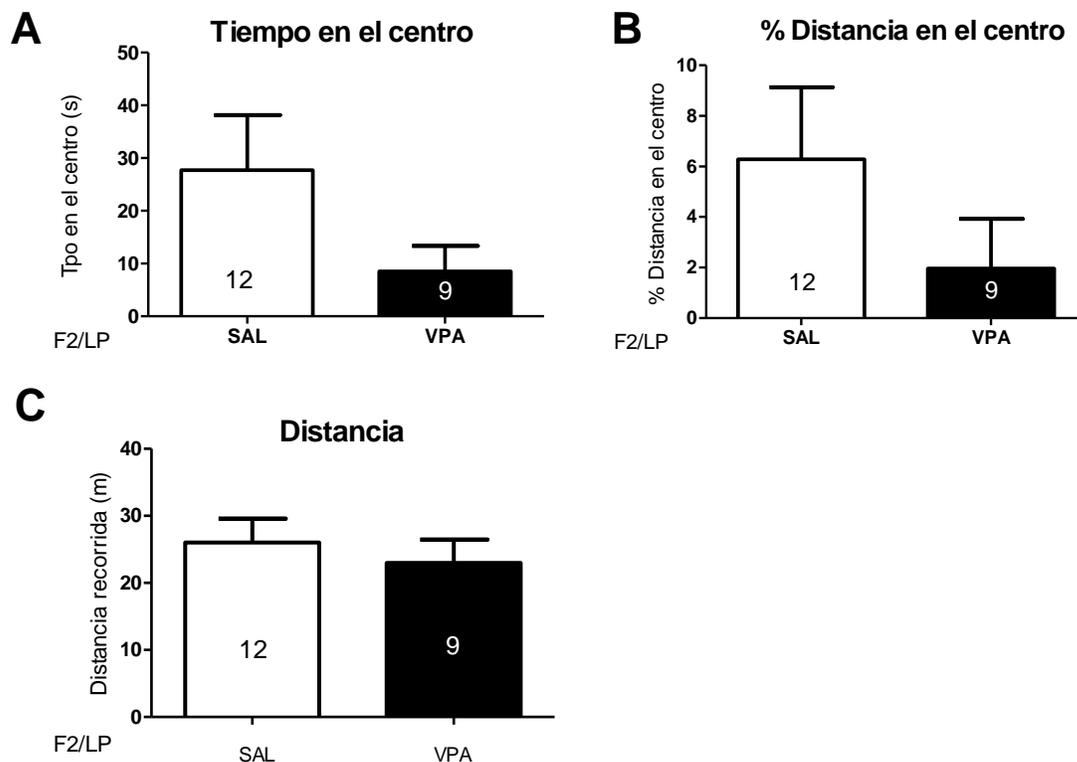


Figura V.17. Niveles de exploración en el campo abierto en las hembras F2/LP. Las hembras F2-VPA tendieron a permanecer menos tiempo y a recorrer una distancia en el centro menor que sus controles, pero sin alcanzar significancia estadística (A y B). No se observaron diferencias entre

los grupos en la distancia total recorrida durante el ensayo de campo abierto. N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

V.5.4. Comportamiento en la adultez de los machos de la F2 - linaje paterno y estudio del efecto de la estimulación social temprana sobre los mismos

Un trabajo previo de nuestro grupo demostró que los niveles de sociabilidad de los machos F1-VPA pueden ser modulados a través de un protocolo de enriquecimiento social (Campolongo et al., 2018). En este modelo de **estimulación social temprana**, los ratones machos F1-VPA que convivieron desde el destete hasta la adultez con ratones F1-SAL mostraron niveles de sociabilidad similares a los animales control, por lo que consideramos que este protocolo conduce a un rescate social de dicho fenotipo. Basándonos en este resultado nos preguntamos si las alteraciones esperadas en la F2/LP podían ser moduladas por el contexto social. Para responder esta pregunta, al momento del destete de los animales se armaron las jaulas de modo de establecer el modelo de rescate social descrito en la sección II.2 de Materiales y Métodos. Quedaron constituidos 4 grupos experimentales, determinados por el tratamiento del macho del que descienden (herencia paterna: descendientes de machos VPA o SAL- pedigrí VPA o SAL) y por el tratamiento de los machos con los que convivió (tratamiento postnatal) (Figura V.18). Así que nos referimos a un animal F2 VPA-VPA como aquel que deriva a través de su pedigrí de un macho F1-VPA, y que además convivió con otros ratones cuyos progenitores también fueron F1-VPA. El grupo F2 VPA-SAL es el que llamamos “rescatado”, ya que a diferencia del grupo anterior estos ratones crecieron con animales que derivan de machos F1-SAL. Cabe aclarar que cuando nos referimos al tratamiento de los animales la nomenclatura F2 VPA es equivalente a F2 VPA-VPA, y F2 SAL a F2 SAL-SAL, solamente que al introducir el tratamiento postnatal en el diseño fue necesario indicar tanto el tratamiento del progenitor (pedigrí) como el postnatal.

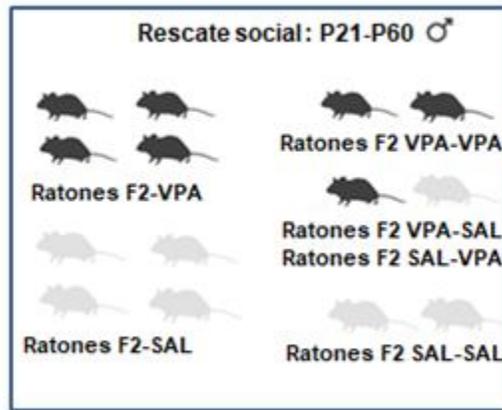


Figura V.18. Modelo de estimulación social temprana empleado en los machos de la F2/LP. A partir del P21 los ratones derivados de camadas VPA (F2-VPA) convivieron con otros ratones también provenientes de animales VPA (F2-VPA) o SAL (F2-SAL), dependiendo del tratamiento asignado. Así se obtubieron los 4 grupos experimentales.

Análisis sobre los niveles de sociabilidad en los machos F2/LP: Ensayo de Interacción social

Durante el ensayo de interacción social de los machos F2/LP, el tiempo que los animales F2 VPA-VPA estuvieron oliendo el estímulo social tendió a ser menor que el de los otros grupos. Sin embargo, el ANOVA de dos factores no arrojó un efecto asociado al pedigrí o al tratamiento postnatal [interacción pedigrí-tto post: $F(1,44)= 0.23$ $p= 0.6376$, pedigrí: $F(1,44)= 3.27$ $p= 0.0776$, tto post: $F(1,44)= 0.33$ $p= 0.5706$; Figura V.19A]. Por otro lado, al analizar el tiempo que los animales exploran el cilindro donde se encuentra el objeto o el ratón desconocido observamos que solamente el grupo F2 VPA-VPA no muestra una preferencia por el estímulo social [prueba de t-pareada: F2 SAL-SAL: $t(11)= 4.97$ $p=0.0004$, F2 SAL-VPA: $t(11)= 5.07$ $p= 0.0004$, F2 VPA-SAL: $t(8)=3.49$ $p=0.0082$, F2 VPA-VPA: $t(14)= 1.94$ $p=0.0732$; Figura V.19A]. Si bien se observó un marcada tendencia a la reducción en el índice de sociabilidad en los animales F2 VPA-VPA, este efecto no llegó a ser estadísticamente significativo [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,44)= 0.15$ $p=0.7007$, pedigrí: $F(1,44)=2.43$ $p= 0.126$, tto post: $F(1,44)= 1.51$ $p= 0.226$; Figura V.19B]. A modo de control del ensayo, durante la habituación de los animales pudimos confirmar que no presentaban preferencia por alguno de los lados

[prueba de t pareada: F2 SAL-SAL: $t(11)= 2.20$ $p= 0.0503$, F2- SAL-VPA: $t(11)= 1.36$ $p= 0.2006$, F2 VPA-SAL: $t(8)= 0.63$ $p= 0.5437$, F2 VPA-VPA: $t(14)= 1.17$ $p= 0.2637$; Figura V.19C].

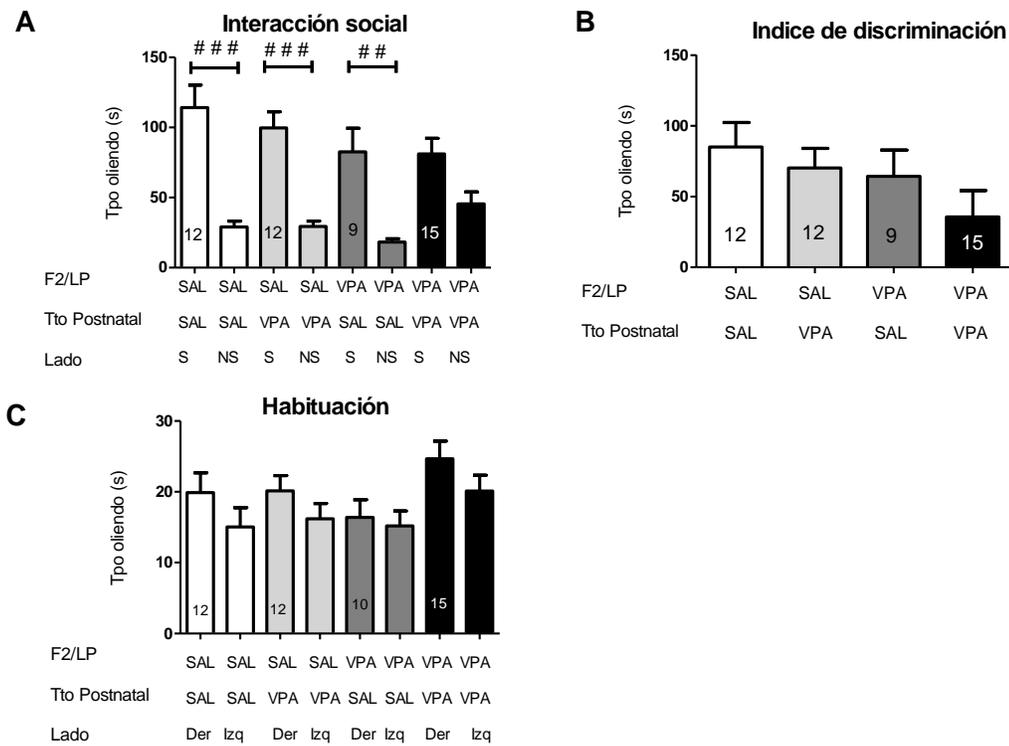


Figura V.19. Niveles de sociabilidad de los machos F2/LP y el efecto de la estimulación social temprana. Se observa en los animales F2 VPA-VPA una tendencia a explorar menos tiempo el estímulo social que su control. Además, los animales F2 VPA-VPA no muestran diferencia significativa entre el tiempo oliendo el lado social y no social, por lo que los animales no prefieren este lado. En cuanto al efecto de la estimulación social vemos que los animales F2 VPA-SAL muestran preferencia por el lado social. No se observa un efecto del tratamiento postnatal en el tiempo oliendo el lado social (A). El análisis del índice de sociabilidad indica que no hay efecto del linaje o del tratamiento postnatal. Sin embargo, el índice de sociabilidad de los animales F2 VPA-VPA tiende a ser menor que los otros grupos, mientras que el del grupo rescatado F2 VPA-SAL es mayor (B). No se observa en ninguno de los grupos preferencia por alguno de los lados durante la etapa de habituación del ensayo (C). N, en las barras. Prueba de t pareada, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Se grafica la media + E.E.

En base a estos resultados proponemos que el déficit de la sociabilidad observada en la F1-VPA (F1 VPA-VPA) se heredó, al menos parcialmente, a los machos F2 VPA-VPA, quienes no muestran preferencia por el estímulo social. Además observamos una disminución en el tiempo en el que estos animales huelen el estímulo social y en el índice

de discriminación, aunque este parámetro no llegó a ser estadísticamente significativo. Esta característica no se observa en los animales F2 VPA-SAL, por lo que convivir con ratones control revierte la pérdida de la preferencia social observada en el grupo F2 VPA-VPA.

Análisis sobre la neofobia en los machos F2/LP: Ensayo de Reconocimiento de un objeto novedoso

Con el fin de analizar si los animales presentaban neofobia o alteraciones en la memoria de corto término realizamos el ensayo de reconocimiento de un objeto novedoso. En el mismo observamos una disminución en el índice de discriminación en los animales del pedigrí VPA, independientemente del tratamiento postnatal [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,48) = 0.49$ $p = 0.4874$, pedigrí: $F(1,48) = 6.82$ $p = 0.012$, tto post: $F(1,48) = 0.45$ $p = 0.5059$; Figura V.20A]. Por otro lado esta disminución no estuvo relacionado con la distancia recorrida por los animales, variable en la cual no se observaron diferencias entre los grupos [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,51) = 0.13$ $p = 0.7247$, pedigrí: $F(1,51) = 0.18$ $p = 0.6726$, tto post: $F(1,51) = 0.03$ $p = 0.8621$; Figura V.20B]. Esta disminución en el índice de discriminación del objeto novedoso no ha sido observado en la generación anterior, sino que parece ser una característica de esta F2/LP. También observamos que el hecho de convivir con ratones F2 SAL no ha sido capaz de rescatar este fenotipo en los animales F2 VPA-SAL.

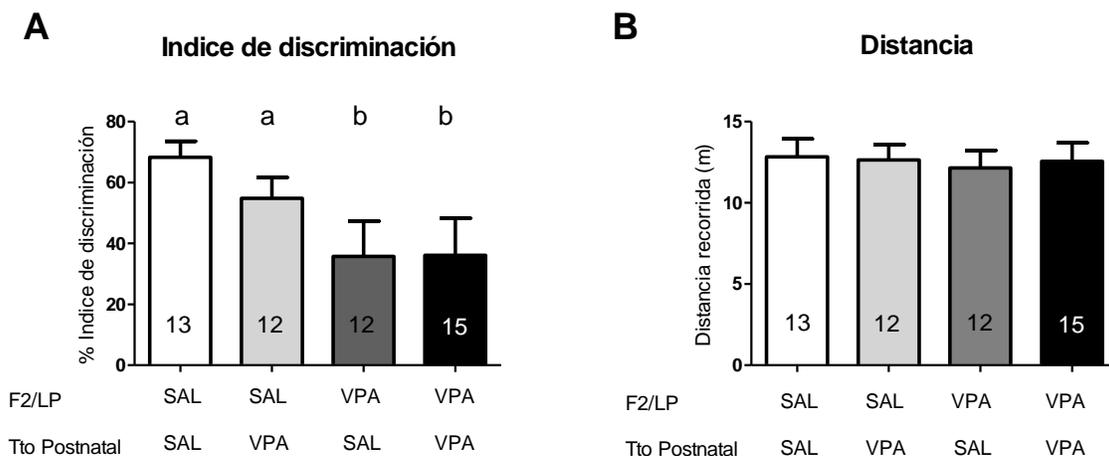


Figura V.20. Ensayo de reconocimiento de un objeto novedoso en machos F2/LP y el efecto de la estimulación social temprana. Los animales descendientes de machos VPA mostraron un menor índice de discriminación (A). No se observan diferencias en la distancia recorrida por los animales en la sesión de reconocimiento de un objeto novedoso (B). N, en las barras. ANOVA de dos factores seguida de la prueba de LSD Fisher: letras diferentes indican diferencias significativas. $p < 0.05$. Se grafica la media \pm E.E.

Análisis sobre la función olfatoria en los machos F2/LP: Ensayo de habituación/deshabituación olfatoria.

La evaluación de la función olfatoria de los machos de la F2/LP no mostró un efecto asociado al pedigrí para ninguno de los olores analizados (Tabla V.4, Figura V.21). El efecto que fue significativo en el análisis estadístico fue una interacción entre el tratamiento postnatal y la presentación para el estímulo neutro del agua (Tabla V.4), en el cual el test *post-hoc* posterior reveló la ausencia de diferencias entre los grupos. Otro efecto significativo fue el asociado a la presentación sucesiva del olor a machos (Tabla V.4, Figura V.21). En la Figura V.21, podemos ver que los animales habitúan al olor a Machos independientemente de su linaje, aunque no lo hacen para los otros olores presentados (Tabla V.4).

Habitación/ deshabitación olfativa

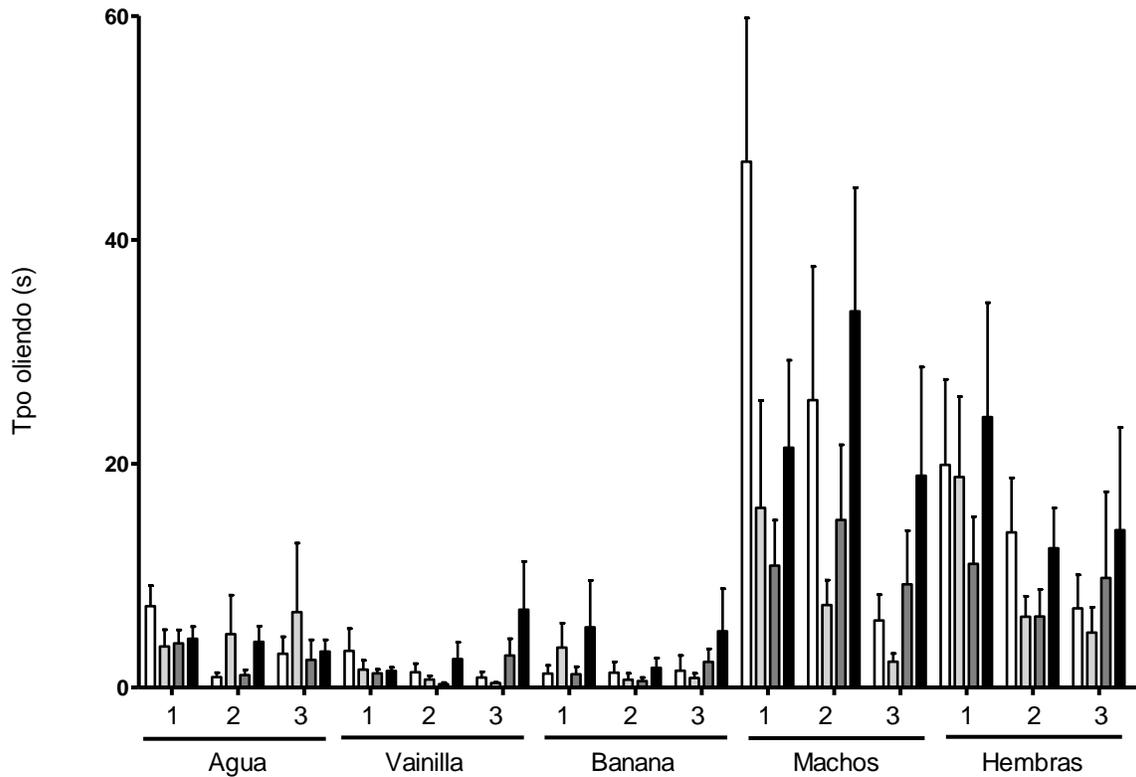


Figura V.21. Habitación y deshabitación olfativa en los machos F2/LP y el efecto de la estimulación social temprana. No se observaron diferencias en el tiempo que los animales huelen las sucesivas presentaciones de un estímulo neutro, olores no sociales u olor Hembras. Por otro lado, se observó que independientemente del pedigrí los animales habituaron al olor a Machos. $N_{F2\text{ SAL-SAL}}= 6$, $N_{F2\text{ SAL-VPA}}= 5$, $N_{F2\text{ VPA-SAL}}= 6$, $N_{F2\text{ VPA-VPA}}= 10$. Se analizó con un Modelo lineal y mixto. Se grafica la media + E.E.

Variable: tiempo oliendo					
Olores	Agua	Vainilla	Banana	Machos	Hembras
Pedigrí (ped)	F(1)= 0.29 p= 0.5974	F(1)= 2.36 p= 0.1373	F(1)= 0.80 p= 0.3788	F(1)=0.36 p= 0.5515	F(1)= 0.16 p= 0.6935
Trat. Postnatal (tto post)	F(1)= 0.07 p=0.7876	F(1)= 0.16 p= 0.6916	F(1)= 0.12 p= 0.7351	F(1)= 0.11 p= 0.7480	F(1)= 0.27 p= 0.6083
Presentación (pres)	F(2)= 2.72 p=0.0754	F(2)= 1.36 p= 0.2669	F(2)= 0.31 p= 0.7336	F(2)= 3.56 p= 0.0360	F(2)= 2.43 p= 0.0979
Interacción ped- tto post	F(1)= 1.22 p= 0.2797	F(1)=0.00 p= 0.9895	F(1)= 0.20 p= 0.6584	F(1)= 2.59 p= 0.1202	F(1)= 1.34 p= 0.2584
Interacción ped-pres	F(2)= 0.18 p= 0.8363	F(2)=1.66 p= 0.1997	F(2)= 0.95 p= 0.3947	F(2)= 2.60 p= 0.0842	F(2)= 0.29 p= 0.7515
Interacción tto post- pres	F(2)= 3.70 p= 0.0316	F(2)= 0.82 p= 0.4461	F(2)= 1.46 p= 0.2427	F(2)= 0.90 p= 0.4145	F(2)= 0.28 p= 0.7601
Interacción ped-tto post-pres	F(2)= 1.52 p= 0.2295	F(2)= 0.40 p= 0.6717	F(2)=0.61 p= 0.5473	F(2)= 1.11 p= 0.3389	F(2)= 0.07 p= 0.9364

Tabla V.4. Analisis estadístico del ensayo de Habitación/deshabitación olfativa para cada olor. Modelo lineal general y mixto completo. En negrita se indican las diferencias significativas.

El índice de discriminación social de los animales F2 VPA-VPA y F2 VPA-SAL tendió a ser más bajo que el de los animales descendientes de machos SAL (F2 SAL-SAL y F2 SAL-VPA), sin embargo este efecto no fue estadísticamente significativo [ANOVA de dos factores: pedigrí: $F(1,25) = 0.80$ $p = 0.5034$, tto postnatal: $F(1,25) = 2.20$ $p = 0.1509$, interacción pedigrí-tto post: $F(1,25) = 0.5714$ $p = 0.8143$; Figura V.22A]. Por otro lado, en el análisis del índice de discriminación de los olores no sociales vimos que 3 grupos mostraron niveles muy bajos, incluyendo al grupo F2 SAL-SAL. Sin embargo, no se observó un efecto asociado al pedigrí ni al tratamiento postnatal [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,25) = 0.17$ $p = 0.6802$, pedigrí: $F(1,25) = 1.60$ $p = 0.2174$, tto post: $F(1,25) = 0.87$ $p = 0.3600$; Figura V.22B]. Consideramos que la tendencia observada responde al poco tiempo que los animales de los 4 grupos olieron los estímulos no sociales (Figura V.21). En la Figura V.22C, al analizar el tiempo que los animales huelen los olores sociales tampoco observamos diferencias entre los grupos [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,25) = 2.10$ $p = 0.1596$, pedigrí: $F(1,25) = 0.42$ $p = 0.5220$, tto post: $F(1,25) = 0.12$ $p = 0.7366$]. El grupo F2 SAL-SAL es el que se encuentra más tiempo oliendo los olores sociales, mientras que los grupos F2 SAL-VPA y F2 VPA-VPA mostraron niveles intermedios. Inesperadamente los animales F2 VPA-SAL fueron los que menos tiempo olieron los olores de Machos y Hembras en su primera presentación. No podemos afirmar que existe una tendencia a que los animales descendientes de ratones VPA presenten niveles más bajos de exploración de los olores sociales porque el grupo F2 SAL-VPA también reportó un nivel similar de exploración. Sin embargo podemos afirmar que el tratamiento postnatal dado por la convivencia con animales descendientes de F1-SAL no promovió la mejoría esperada respecto del grupo F2 VPA-VPA. No se observaron diferencias en el tiempo que los animales huelen los olores no sociales para los diferentes grupos analizados [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,23) = 0.28$ $p = 0.604$, pedigrí: $F(1,23) = 0.0024$ $p = 0.9613$, tto post: $F(1,23) = 0.51$ $p = 0.4837$; Figura V.22C]. Todos los grupos, exceptuando el F2 SAL-VPA, mostraron preferencia por los olores sociales [prueba de t pareada: F2 SAL-SAL: $t(5) = 3.952$ $p = 0.0108$, F2 SAL-VPA: $t(4) = 1.891$ $p = 0.1317$, F2 VPA-SAL: $t(5) = 3.053$ $p = 0.0283$, F2 VPA-VPA: $t(9) = 3.393$ $p = 0.0079$; Figura V.22C].

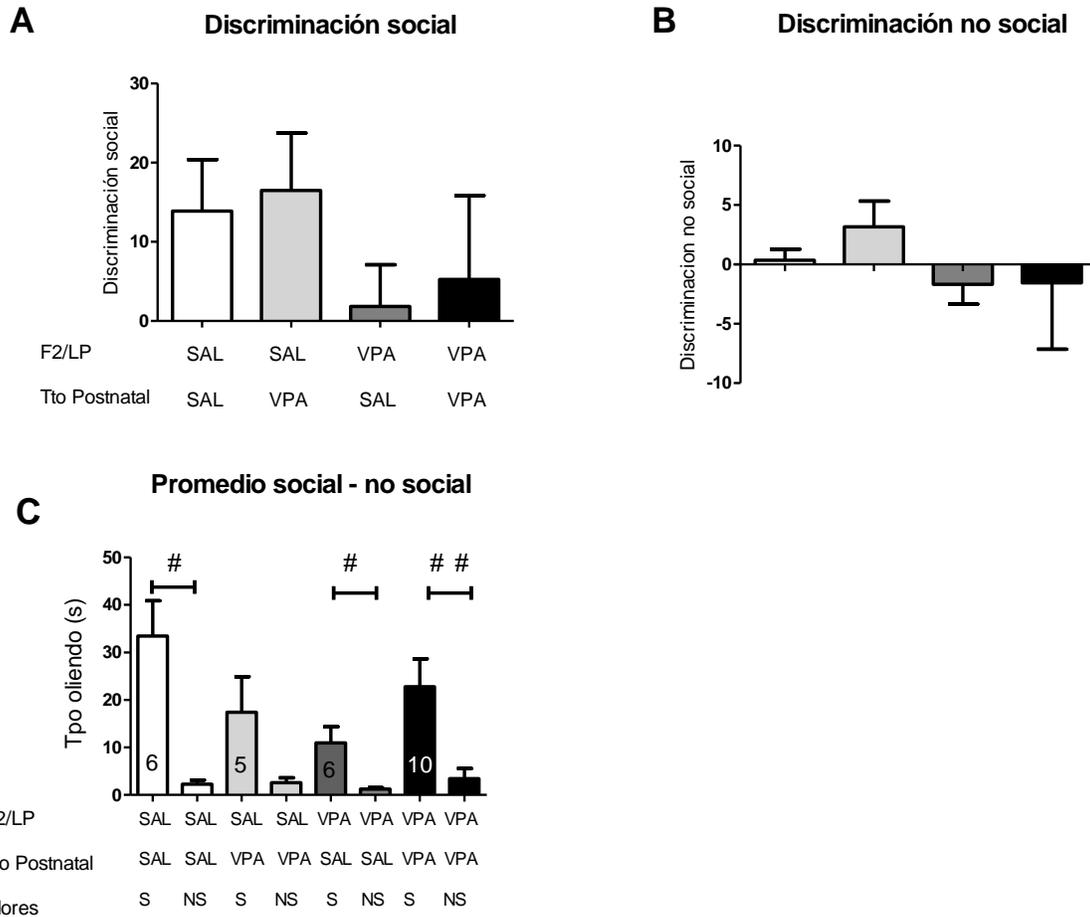


Figura V.22. Parámetros de discriminación y exploración olfativa en los machos F2/LP y el efecto de la estimulación social temprana. Los animales descendientes de machos F1-VPA presentaron un índice de discriminación social que tendió a ser más bajo que el de los animales descendientes de machos F1-SAL (A). Por otro lado, no hay diferencias en el índice de discriminación no social en función del pedigrí o del tratamiento postnatal en los grupos analizados (B). Si bien los animales presentan diferente tiempo oliendo el hisopo con olores sociales, no se registraron diferencias entre los grupos. Como es de esperar, todos los animales olieron más tiempo los olores sociales que los no sociales, excepto los F2 SAL-VPA en los que dicha diferencia no es significativa (C). N, en las barras. Prueba de t pareada # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre comportamientos repetitivos en los machos F2/LP: Ensayos de laberinto en Y y autoacicalamiento

En cuanto al porcentaje de alternancias registrado en el laberinto en Y, observamos una interacción entre el pedigrí y el tratamiento postnatal [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,48) = 4.65$ $p = 0.0360$, pedigrí: $F(1,48) = 0.26$ $p = 0.6093$, tto post: $F(1,48) = 0.0014$ $p = 0.9703$; Figura V.23A], con los animales de jaulas mixtas alternando más. Sin embargo el test *post-hoc* de Fisher no reveló diferencias entre los grupos. También registramos una interacción en la distancia recorrida por los animales [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,48) = 14.06$ $p = 0.0005$, pedigrí: $F(1,48) = 0.2$ $p = 0.6572$, tto-post: $F(1,48) = 0.11$ $p = 0.743$; Figura V.23B], con los animales de las jaulas mixtas recorriendo una menor distancia en el ensayo. Es interesante resaltar que, si bien las alternancias están relativizadas al número de entradas, los resultados muestran un efecto complementario al de la distancia recorrida, sugiriendo que los niveles de exploración pueden estar afectando los resultados de alternancia en este ensayo.

Por otro lado, no observamos diferencias entre los grupo en el ensayo de autoacicalamiento [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,48) = 0.63$ $p = 0.43$, pedigrí: $F(1,48) = 0.82$ $p = 0.3691$, tto post: $F(1,48) = 0.91$ $p = 0.3461$; Figura V.23C]. Por lo que este fenotipo parece no ser heredado a la siguiente generación a través del linaje paterno.

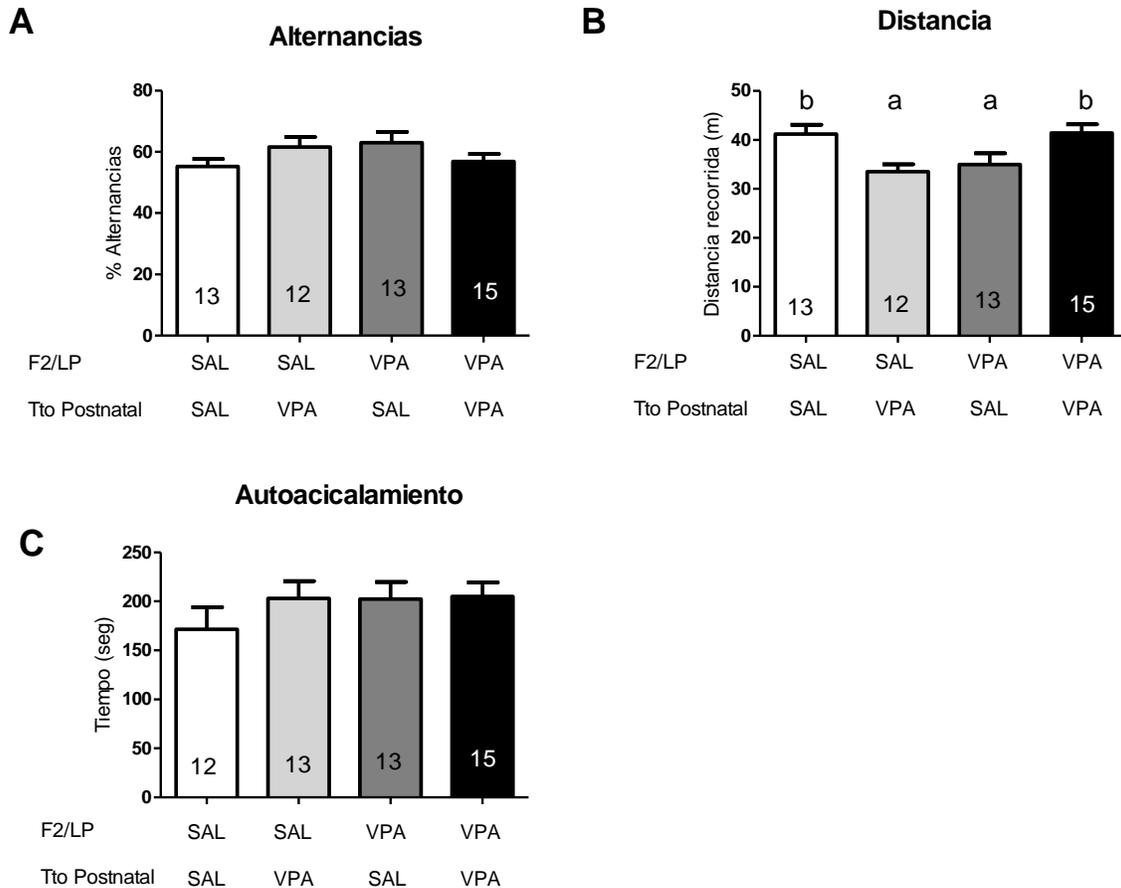


Figura V.23. Comportamientos repetitivos en los machos F2/LP y el efecto de la estimulación social temprana. No encontramos efecto del pedigrí o el tratamiento postnatal en el porcentaje de alternancias en el laberinto en Y, pero sí una interacción entre ambos tratamientos (A). En la exploración del laberinto en Y, también observamos una interacción entre el pedigrí y el tratamiento postnatal, con los animales de jaulas mixtas recorriendo una distancia menor (B). No se registró un efecto significativo en el tiempo que los animales se autoacicalan (C). N, en las barras. ANOVA de dos factores seguido de LSD Fisher: letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre comportamientos asociados a depresión en los machos F2/LP: Ensayos de suspensión de la cola y de nado forzado

Durante el ensayo de suspensión de la cola no encontramos diferencias significativas en el tiempo que los diferentes grupos permanecían inmóviles [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,48) = 1.64$ $p = 0.2059$, pedigrí: $F(1,48) = 0.29$ $p = 0.592$, tto post: $F(1,48) = 0.36$ $p = 0.5524$; Figura V.24A]. Tampoco registramos un

efecto asociado al pedigrí o al tratamiento postnatal durante el ensayo de nado forzado [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,48)= 0.52$ $p= 0.4741$, pedigrí: $F(1,48)= 0.34$ $p= 0.5654$, tto post: $F(1,48)= 1.01$ $p= 0.3188$; Figura V.24B], por lo que ambos ensayos indican que no hay herencia del comportamiento asociado a depresión a los machos de la F2 a partir del linaje paterno.

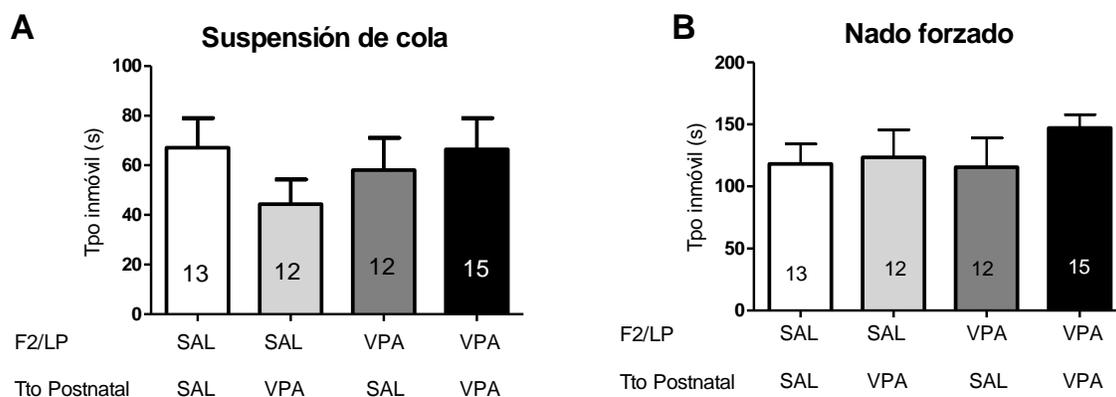


Figura V.24. Comportamientos asociados a depresión en los machos F2/LP y el efecto de la estimulación social temprana. No se observó un efecto asociado al pedigrí en el ensayo de suspensión de la cola (A) o nado forzado (B). Tampoco registramos un efecto del tratamiento postnatal. N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre comportamientos asociados a ansiedad en los machos F2/LP:

Ensayo de exploración a campo abierto

En el ensayo utilizado para evaluar ansiedad observamos que los grupos F2 SAL-VPA y F2 VPA-SAL tendieron a estar menos tiempo en el centro de la arena, sin embargo este efecto no fue estadísticamente significativo [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí- tto post: $F(1,48)= 2.17$ $p= 0.147$, pedigrí: $F(1,48)= 0.06$ $p= 0.8141$, tto post: $F(1,48)= 0.3$ $p= 0.5846$; Figura V.25A]. Al analizar el porcentaje de distancia recorrida en el centro, vemos que el grupo F2 SAL-VPA fue el que recorrió una distancia menor, aunque en este caso tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupo [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,48)= 1.85$ $p= 0.1801$, pedigrí: $F(1,48)= 0.0005$ $p= 0.9823$, tto post: $F(1,48)= 1.06$ $p= 0.3093$; Figura V.25B]. Es de remarcar que todos los grupos evitaron el centro, pasando muy poco tiempo en el mismo y

recorriéndolo muy poco (<10%). Por otro lado, encontramos diferencias en los niveles de locomoción [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,48)= 5.03$ $p= 0.0296$, pedigrí: $F(1,48)= 0.21$ $p= 0.6476$, tto post: $F(1,48)= 1.02$ $p= 0.3176$; Figura V.25C]: el grupo F2 SAL-VPA recorrió una distancia menor respecto del grupo F2 SAL-SAL. Esta menor locomoción del grupo F2 SAL-VPA condice que su menor locomoción en el laberinto en Y, sin embargo el otro grupo que mostraba baja locomoción en el laberinto en Y (el F2 VPA-SAL) muestra niveles de exploración en el campo abierto similar a los otros grupos.

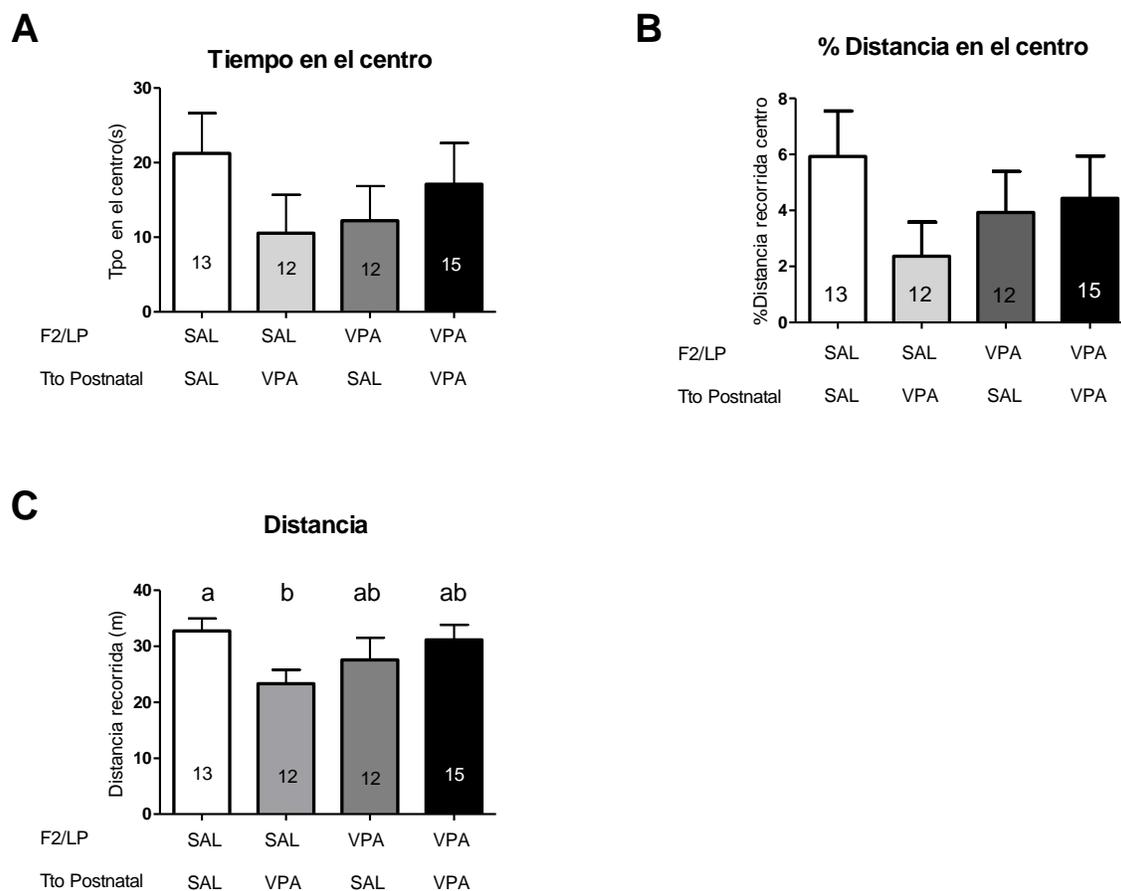


Figura V.25. Niveles de exploración en el campo abierto en los machos F2/LP y el efecto de la estimulación social temprana. No observamos un efecto significativo asociado al pedigrí o a la estimulación social en el tiempo que los animales permanecen (A) o el porcentaje de distancia que recorren (B) en el centro de la arena. Llamativamente el grupo F2 SAL-VPA recorrió una distancia total menor que el control F2 SAL-SAL durante el ensayo (C). N, en las barras. ANOVA de dos factores seguido de LSD Fisher: letras diferentes indican diferencias significativas $p<0.05$. Se grafica la media + E.E.

V.5.5. Densidad de células c-Fos⁺ en la corteza piriforme de ratones machos F2-linaje paterno

La expresión de la proteína de respuesta temprana c-Fos suele ser utilizada como un marcador de activación neuronal. La marcación de esta proteína es una de las técnicas más útiles para el mapeo funcional anatómico y de circuitos de regiones neuroendocrinas (Hoffman et al., 1993, Duman et al., 2005). Un estudio previo llevado a cabo en machos de la F1-VPA (F1 VPA-VPA), reveló que este grupo presentaba una mayor densidad de células c-Fos⁺ en la corteza piriforme anterior respecto de su control F1-SAL (F1 SAL-SAL) (Campolongo et al., 2018). Se propone que la corteza piriforme está asociada con la percepción y recuerdo de los olores, y que la información codificada en esta región se dirige a áreas del cerebro involucradas en la integración sensorial multimodal, la cognición y el control motor (Diodato et al., 2016). Por este motivo decidimos estudiar si este rasgo también se encontraba presente en la siguiente generación, si era heredado a los machos F2-VPA (F2 VPA-VPA) a través del linaje paterno. Llamativamente en el trabajo de Campolongo et al. (2018) observaron que la densidad de células c-Fos⁺ parecería también estar modulada por la estimulación social temprana, ya que en el grupo rescatado F1 VPA-SAL observaron una densidad de células c-Fos⁺ intermedia a la registrada en los dos grupos previamente mencionados.

En la corteza piriforme de la F2/LP encontramos un aumento significativo en la densidad de células c-Fos⁺ en los animales del pedigrí VPA con respecto a los del pedigrí SAL [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,15)= 0.29$ $p= 0.5967$, pedigrí: $F(1,15)= 5.07$ $p= 0.0397$, tto post: $F(1,15)= 0.25$ $p= 0.5967$; Figura V.26A]. Es decir, los animales F2 VPA-VPA y F2 VPA-SAL mostraron una mayor densidad de células c-Fos⁺. Por otro lado, al analizar la corteza piriforme anterior de los machos de la F2/LP no observamos diferencias en la densidad de células c-Fos⁺ en los grupos analizados, aunque en los animales F2 VPA-VPA la densidad tendió a ser mayor que en los otros grupos [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,15)= 0.09$ $p= 0.7637$, pedigrí: $F(1,15)= 1.86$ $p= 0.1928$, tto post: $F(1,15)= 1.79$ $p= 0.2007$; Figura V.26B]. Por último y llamativamente, encontramos un aumento significativo en la densidad c-Fos⁺ en la corteza posterior, que no parecería estar siendo modulado por la interacción social temprana en el grupo F2 VPA-SAL [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,16)= 1.18$

$p= 0.2937$, pedigrí: $F(1,16)= 9.3$ $p= 0.0076$, tto post: $F(1,16)= 0.3$ $p= 0.5911$; Figura V.26C]. Teniendo en cuenta estos resultados, consideramos que existen alteraciones a nivel de la corteza piriforme que se encuentran presentes tanto en los machos de la F1-VPA como en los machos de la siguiente generación (F2-VPA), y que no parecen ser alteradas por la estimulación social temprana.

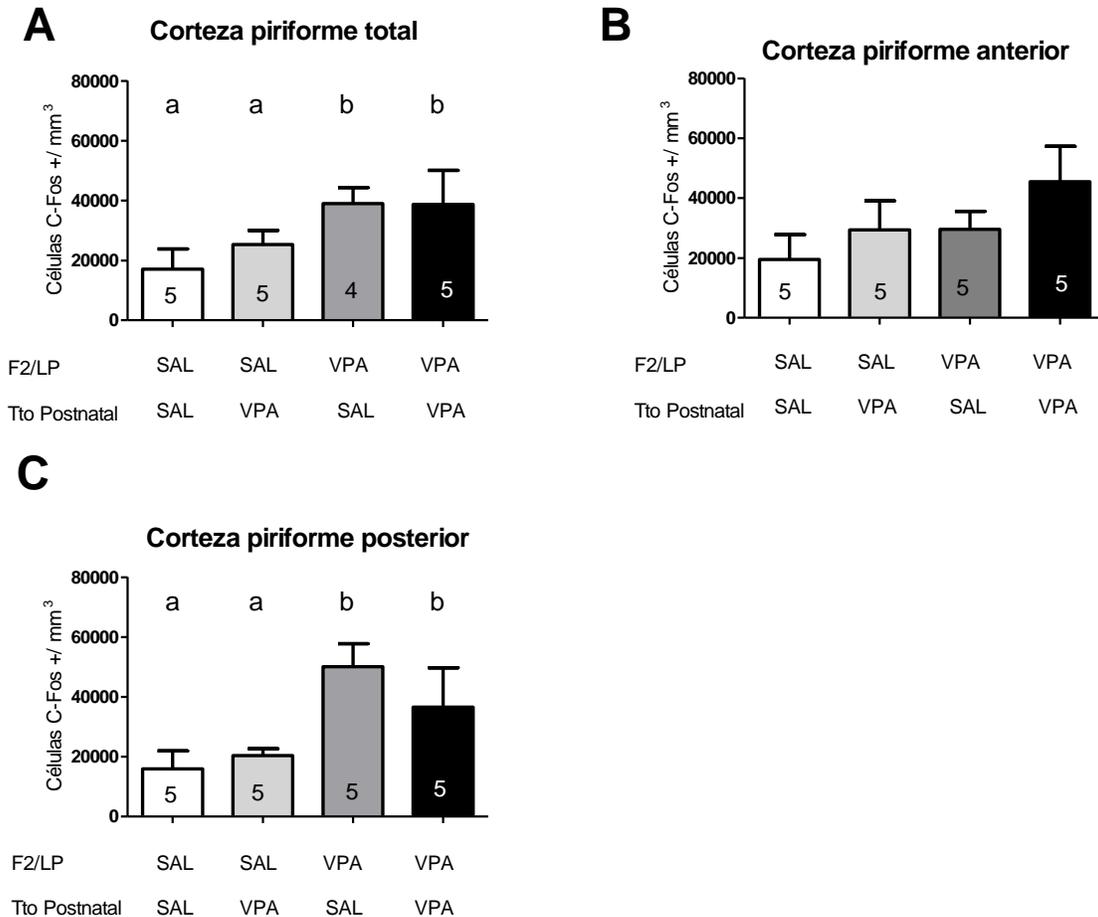


Figura V.26. Densidad de células c-Fos⁺ en la corteza piriforme de ratones machos F2/LP y el efecto de la estimulación social temprana. Se observó un efecto asociado al pedigrí en la corteza piriforme total: los animales descendientes de machos F1-VPA mostraron un aumento en la densidad de células c-Fos⁺ (A). Por otro lado, sólo los animales F2 VPA-VPA fueron los que mostraron una tendencia a una mayor densidad de células c-Fos⁺ en la corteza piriforme anterior (B), mientras que los grupos F2 VPA-VPA y F2 VPA-SAL mostraron una mayor densidad de células c-Fos⁺ en su corteza piriforme posterior (C). En ninguno de los casos se observó un efecto asociado al tratamiento postnatal. N, en las barras. ANOVA de dos factores seguido de LSD Fisher: letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$. Se grafica la media + E.E.

V.5.6. Niveles de catecolaminas en la corteza piriforme de ratones machos F2-linaje paterno

La corteza piriforme recibe la inervación de neuronas que presentan diferentes catecolaminas como neurotransmisor (Datiche & Caterelli, 1996). Se han reportado en esta región niveles elevados de dopamina (Reader & Grondin, 1987), así como de mensajeros asociados a las funciones de este neurotransmisor, como el mRNA de DARP-32 (una fosfoproteína neuronal regulada por dopamina y adenosina) (Perez & Lewis, 1992). En el trabajo de Campolongo et al. (2018) se cuantificaron los niveles de catecolaminas con el objetivo de evaluar la función dopaminérgica y serotoninérgica en la corteza piriforme. En dicho trabajo se reportó que los animales F1-VPA (F1 VPA-VPA) muestran un metabolismo de la dopamina aumentado en la corteza piriforme. Con el fin analizar si un desbalance de estos neurotransmisores también estaba presente en la F2, se midieron los niveles de dopamina, serotonina y sus respectivos metabolitos en la corteza piriforme de animales F2 VPA-VPA y F2 SAL-SAL mediante HPLC (Figura V.27).

Si bien los animales F2 VPA-VPA presentan una tendencia a un aumento en el metabolismo de la dopamina, este efecto no fue significativo [ANOVA de un factor: $F(1,6) = 1.12$ $p = 0.3305$; Figura V.27C]. Tampoco se observaron diferencias en el metabolismo de la serotonina [ANOVA de un factor: $F(1,6) = 0.04$ $p = 0.8439$; Figura V.27F]. Los niveles de dopamina, serotonina y sus respectivos metabolitos fueron similares en el grupo F2 VPA-VPA y su control [ANOVA de un factor: DA: $F(1,7) = 0.04$ $p = 0.8520$, DOPAC: $F(1,6) = 0.03$ $p = 0.8601$, 5HIA: $F(1,6) = 0.64$ $p = 0.4537$, 5HT: $F(1,6) = 1.56$ $p = 0.2577$; Figura V.27].

Considerando los resultados obtenidos podemos concluir que las alteraciones observadas en el metabolismo de la dopamina en la corteza piriforme de ratones F1 VPA-VPA no se encuentran presente en la siguiente generación.

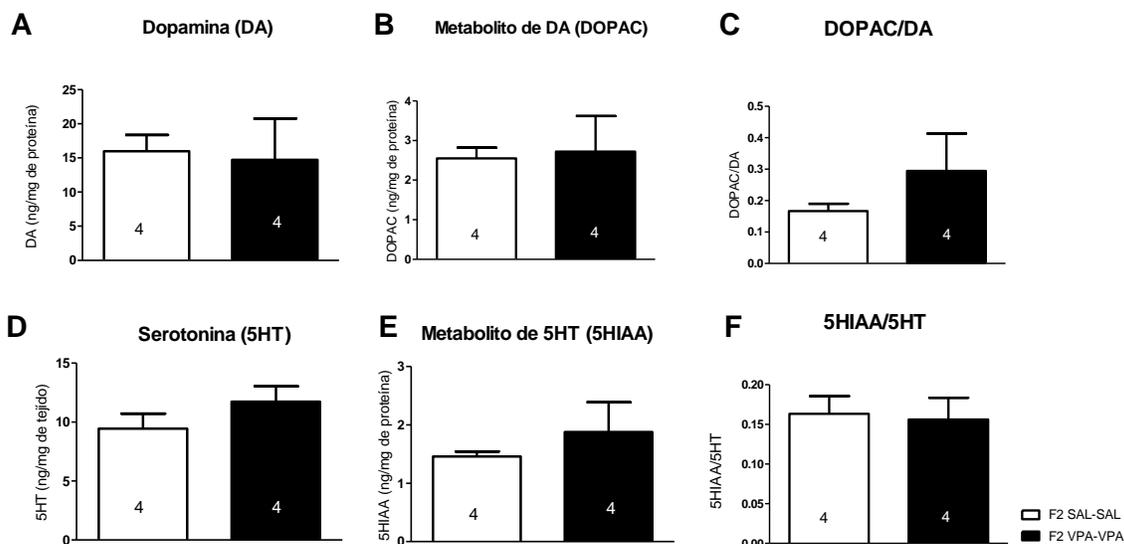


Figura V.27. Niveles de catecolaminas en la corteza piriforme de ratones machos F2/LP. No se observaron diferencias en los niveles de dopamina, serotonina ni sus metabolitos en la corteza piriforme de los animales F2 SAL-SAL y F2 VPA-VPA (A, B, D, E). Los animales VPA-VPA mostraron una tendencia a una mayor tasa de conversión de dopamina a su metabolito, aunque este efecto no fue significativo (C). No se vieron diferencias entre los grupos en la tasa de conversión de la serotonina (F). N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

V.5.7. Conclusiones y discusión sobre la herencia intergeneracional a través del linaje paterno

Comportamiento postnatal de machos y hembras de la F2/LP

Como mencionamos previamente, es escasa la bibliografía que estudia la herencia de los fenotipos postnatales en el modelo VPA. En el trabajo de Tartaglione et al. (2019) se ha analizado la herencia de fenotipos postnatales a través del linaje paterno, aunque en dicho trabajo no discrimina en función del sexo de la descendencia, perdiendo de esta manera información valiosa sobre la herencia de los fenotipos asociados al sexo, como los que se observan en la F1. Durante ese estudio encontraron que tanto la F1 como la F2/LP (y no la F2/LM) presentaron una mayor latencia a enderezarse y una reducción de las vocalizaciones ultrasónicas en las crías. En particular, en ese trabajo analizaron el reflejo de enderezamiento solamente en P4, por lo que no contamos con información sobre cómo continúa o se modifica esta conducta en el resto del periodo postnatal. En la F1-VPA,

nuestro grupo había obtenido una tendencia similar, sin embargo no observamos herencia intergeneracional de dicho efecto.

Nuestro trabajo sugiere que, de todos los marcadores postnatales alterados en la F1-VPA (ganancia en peso, reflejo de enderezamiento, fuerza de agarre, y sobresalto acústico), la menor ganancia en peso es el único fenotipo heredado en machos y hembras de la F2/LP. Será interesante estudiar en un futuro qué efectos metabólicos puede estar teniendo el VPA que expliquen esta menor ganancia de peso.

Al igual que lo observado en el linaje materno, algunos de los fenotipos no son heredados a la siguiente generación. Algunos autores suponen, al igual que nosotros, que esto está íntimamente relacionado a si el efecto del VPA es sobre la células somáticas (generando el fenotipo en la F1) o si este efecto puede llegar a afectar también las células germinales, generando así el fenotipo en las sucesivas generaciones (Weber-Stadlbauer et al., 2017, Bohacek et al., 2015).

Por otro lado, algunos fenotipos como la reducción en la fuerza de agarre se expresan sólo en uno de los sexos de la descendencia de la F2/LP, indicando que machos y hembras presentan una susceptibilidad diferente a la herencia de ciertos fenotipos. Lo que es llamativo, es que el aumento en la fuerza de agarre se ha expresado en los machos F2-VPA durante un periodo postnatal más extenso que en la generación anterior. Los animales de la F1-VPA mostraron un aumento en la latencia a caer de una red colgante durante P13, mientras que los machos de la F2-VPA mostraron una mayor latencia general, particularmente evidente a P15 y P17. Esto podría tener una relación directa con el hecho que los machos F2-VPA presenten un peso menor que los SAL desde P17 a P21 inclusive, ya que el menor peso requerirá menor fuerza para sostenerse. Para poder distinguir entre el efecto del peso y el efectivo mayor desarrollo muscular, deberíamos utilizar otro ensayo que no utilice el propio peso del animal, por ejemplo usando un sensor horizontal de agarre.

Estos resultados nos indica que si bien algunos fenotipos pueden no heredarse, otros pueden intensificarse. La aparición de un fenotipo nuevo en la descendencia es algo llamativo, aunque ya ha sido reportado en otros trabajos. En el trabajo realizado por Franklin et al. (2011), en un modelo de separación materna impredecible combinada con estrés materno (cuyas siglas en inglés son MSUS), observaron que las crías machos de la

F2 y la F3 presentaban altos niveles de ansiedad (medido como la reducción en el tiempo que exploran un ratón coespecífico), aunque los machos de la F1 no presentaban el fenotipo. Ellos propusieron que como en la F1 el modelo de MSUS se genera postnatalmente (desde el nacimiento hasta P14), eventualmente esos cambios epigenéticos se han fijado luego del tratamiento postnatal en sus células germinales generando las alteraciones en la F2 y en la F3. Por otro lado, en el caso del trabajo de Weber-Stadlbauer et al. (2017), ellos estudiaron la herencia transgeneracional de los fenotipos asociados a autismo en el modelo de activación inmune materna. Al igual que en el modelo VPA, la exposición al RNA doble cadena se realiza prenatalmente (en este caso el PoliI:C se administra en el DG 9). Ellos también observaron la aparición de fenotipos en la F2 y en la F3, los cuales no estaban presentes en la F1, sugiriendo que en este modelo hay síntomas comportamentales latentes que se expresa en las siguientes generaciones. La explicación ante este evento es que la exposición no genera un cambio en el tejido somático en la F1, pero sí es capaz de reprogramar las células germinales.

Comportamiento en la adultez de las hembras de la F2/LP

Nuestro laboratorio, así como otros grupos, ha validado que los machos F1-VPA presentan un sociabilidad reducida, comportamientos repetitivos, y un fenotipo asociado a depresión y ansiedad (Roullet et al., 2013, Kim et al., 2013, Mabunga et al., 2015, Olexová et al., 2016, Campolongo et al., 2018). Sin embargo no hemos encontrado bibliografía que describa cómo es el comportamiento de las crías hembras descendientes de estos machos.

En base a los resultados presentados en este capítulo podemos concluir que hay ciertos comportamientos que se expresan en los machos F1-VPA pero no son heredados por sus crías hembras en la adultez. De la batería de ensayos realizados, concluimos que las hembras F2-VPA no muestran reducción de la sociabilidad, ni alteraciones en el reconocimiento de un objeto novedoso. Tampoco observamos alteraciones en la función olfatoria de las mismas. Pero sí parecen haber heredado los niveles de comportamientos estereotipados a través del linaje paterno, particularmente la menor alternancia en el laberinto en Y. Sin embargo, este resultado debería ser estudiado en más detalle, ya que los mismos animales no muestran un mayor tiempo de auto-acicalamiento, mostrando que el efecto no es general sobre los comportamientos repetitivos.

Otro resultado que sería interesante estudiar con mayor profundidad es la tendencia marcada a un comportamiento ansioso, evidenciada en el OF. En las condiciones en que realizamos el ensayo, muchos animales de ambos grupos no visitaron el centro, lo cual condiciona el análisis estadístico (muchos ceros en ambos grupos). Sería necesario repetir el ensayo reduciendo el componente aversivo del centro (por ejemplo utilizando una iluminación más baja), de forma de poder evidenciar si realmente hay una evitación del centro por parte de las hembras F2-VPA. Un trabajo realizado por Choi et al. (2016) utilizando el modelo VPA analizó las características principales del modelo en la F2 y en F3 obtenida por linaje paterno. En este trabajo se encontró que tanto los machos de la F1-VPA, como la F3-VPA presentaban un comportamiento ansioso en el ensayo de enterrar canicas. Este trabajo, así como el de Sampino et al. (2014) quienes trabajaron con un modelo de autismo generado con ratones machos de edad avanzada, demuestran la heredabilidad de los comportamientos asociados con ansiedad en modelos animales a lo largo de por lo menos dos generaciones. En este trabajo también han reportado que los ratones descendientes de machos envejecidos mostraban disminución en la sociabilidad, alteración en las vocalizaciones ultrasónicas y comportamiento relacionado con ansiedad.

Comportamiento en la adultez de machos F2/LP y el efecto de la estimulación social temprana

El análisis del comportamiento en la adultez de los machos ha mostrado que los animales F2-VPA no presentan una preferencia por el lado social como el que se observa en su control F2-SAL. Esto ha sido acompañado por una tendencia a un menor tiempo de exploración del lado social respecto a los otros grupos experimentales. Por lo que creemos que estos animales han heredado parcialmente las alteraciones en la sociabilidad presentes en la F1-VPA. La reducción de la sociabilidad en los machos F2-VPA ha sido descrita previamente por otros grupos como Choi et al. (2016), quienes reportaron en la F2 una reducción en la exploración de otro ratón en el ensayo de interacción social, así como en su versión que estudia la respuesta de los animales ante la novedad social. Este grupo también describió en la F2 un comportamiento hiperactivo en el ensayo de campo abierto, un aumento del comportamiento asociado a ansiedad en el ensayo elevado en cruz y un

aumento en los comportamientos repetitivos al evaluar la tarea de esconder las canicas. Sin embargo, en nuestro modelo no observamos un comportamiento asociado a ansiedad en los machos F2-VPA, ni tampoco un aumento en los comportamientos repetitivos. Estas diferencias pueden estar influenciadas por diferencias en la obtención del modelo experimental: utilizaron una dosis de 300 mg/kg de VPA el DG 10, y trabajaron con la cepa endocriada ICR.

Algo llamativo de nuestros resultados es que al igual que en la F1-VPA, las alteraciones en la sociabilidad observadas en la F2 VPA-VPA pueden ser moduladas por la estimulación social mediante ratones F2-SAL (Camplongo et al., 2018). Esto lo observamos en el grupo F2 VPA-SAL, donde vemos que los animales presentan una marcada preferencia por el lado social y tienden a pasar más tiempo oliendo el lado social que el grupo F2 VPA-VPA.

En cuanto al ensayo de reconocimiento de objeto novedoso, los animales descendientes de padres VPA (F2 VPA-VPA y F2 VPA-SAL) mostraron un menor índice de discriminación del objeto novedoso. Esto podría indicar que estos grupos tienen niveles mayores de neofobia que los animales del linaje SAL, o que presentan alteraciones en la memoria de corto término. Es de destacar que, si bien previamente el grupo ha reportado que los animales F1-VPA no presentan alteraciones en el ensayo de reconocimiento de objeto novedoso, estudios no publicados del grupo muestran que luego de un entrenamiento corto (de 3 minutos), los animales F1-VPA no muestran preferencia por el objeto novedoso, mientras que los F1-SAL sí. Esto sugiere que la F1-VPA tendría leves problemas de memoria de corto plazo, que sólo pueden ser observados en ciertas condiciones experimentales. Por otro lado, dado que el grupo F2 VPA-SAL se comporta como un ratón F2 SAL-SAL en el ensayo de interacción social, no creemos que estos grupos presenten un comportamiento neofóbico.

No hemos encontrado herencia de alteraciones en la función olfativa, en comportamientos repetitivos o en comportamientos asociados a ansiedad o depresión en los animales descendientes de machos F1-VPA. Así, el fenotipo más saliente que ha sido observado es la pérdida de la preferencia por el lado social en los animales F2 VPA-VPA. Es importante aclarar que consideramos que en los ensayos donde no encontramos un

efecto asociado al pedigrí no podemos concluir respecto al efecto del modelo de rescate social, dado que si los ratones no se encuentran afectados en su fenotipo porque no lo han heredado, no podemos determinar el efecto que tiene convivir con un ratón que proviene de otro pedigrí o del mismo pedigrí.

El sexo como factor modulador de la herencia intergeneracional

Durante el análisis de la herencia a través del linaje paterno nos resultó llamativo que existe un dimorfismo sexual marcado en los fenotipos que son heredados en las hembras y en los machos. Por ejemplo, los machos F2/LP no heredaron el fenotipo de comportamiento repetitivo mientras que las hembras F2/LP sí. Por otro lado, las hembras F2-VPA del linaje paterno muestran una preferencia por el lado social mientras que los machos F2-VPA no. Distintos autores han demostrado que la herencia de un fenotipo puede afectar a ambos sexos de la descendencia o ésta presentarse con mayor intensidad en uno solo de ellos (Pembrey et al., 2007, Jirtle & Skinner, 2007, Dunn et al., 2011, Saavedra-Rodriguez & Feig, 2013, Tartaglione et al., 2019). Se han observado sesgos en la aparición de un fenotipo según el sexo en enfermedades autoinmunes, neurológicas, asma y diabetes, entre otras (Rubtsova et al., 2015, Zagni et al., 2016).

Tanto durante el periodo previo a la fecundación, como en el desarrollo pre o postnatal, la exposición a compuestos ambientales, la nutrición o el comportamiento materno pueden generar alteraciones en la programación epigenética en el tejido somático o germinal. Taylor et al. (2005) propone que estas alteraciones a nivel somático o germinal pueden ser sexualmente dimórficas, y que a través de la línea materna se puede afectar tanto al ADN nuclear como a las mitocondrias. Por otro lado, en una visión más general Morgan et al. (2005) proponen que la herencia dimórfica de los fenotipos puede estar asociada a fenómenos citoplasmáticos, influencias citoplasmáticas o metabólicas, y alteraciones en la gametogénesis, así como también la reprogramación epigenética sexo-específica de los genes que tienen una impronta genética y su expresión. Estudiar cuál o cuáles de estos mecanismos están involucrados en la herencia sexo-específica de comportamientos relacionados con el autismo resulta sumamente relevante, especialmente si se considera el sesgo que existe en el diagnóstico del DEA y en el reciente

reconocimiento de que las niñas y mujeres pueden presentar diferencias en los síntomas con que expresan el DEA en comparación con los varones (Kreiser et al., 2014).

V.6. Resultados Herencia transgeneracional a través del linaje paterno

V.6.1. Diseño experimental

Para obtener la F3/LP se realizaron los apareos indicados en la Figura V.28A a partir de un grupo de machos de la F2/LP que no fueron utilizados en los ensayos conductuales, sino que fueron reservados con este fin. Se registró la ganancia en peso de las crías machos y hembras F3/LP y los animales fueron destetados en P21 (Figura V.28B). Los machos de las F3/LP se distribuyeron en jaulas de acuerdo al modelo de estimulación social temprana explicado previamente, determinando 4 grupos experimentales (Figura V.28C). Posteriormente a los machos F3/LP se les realizó una batería de ensayos conductuales indicados en la Figura V.28B.

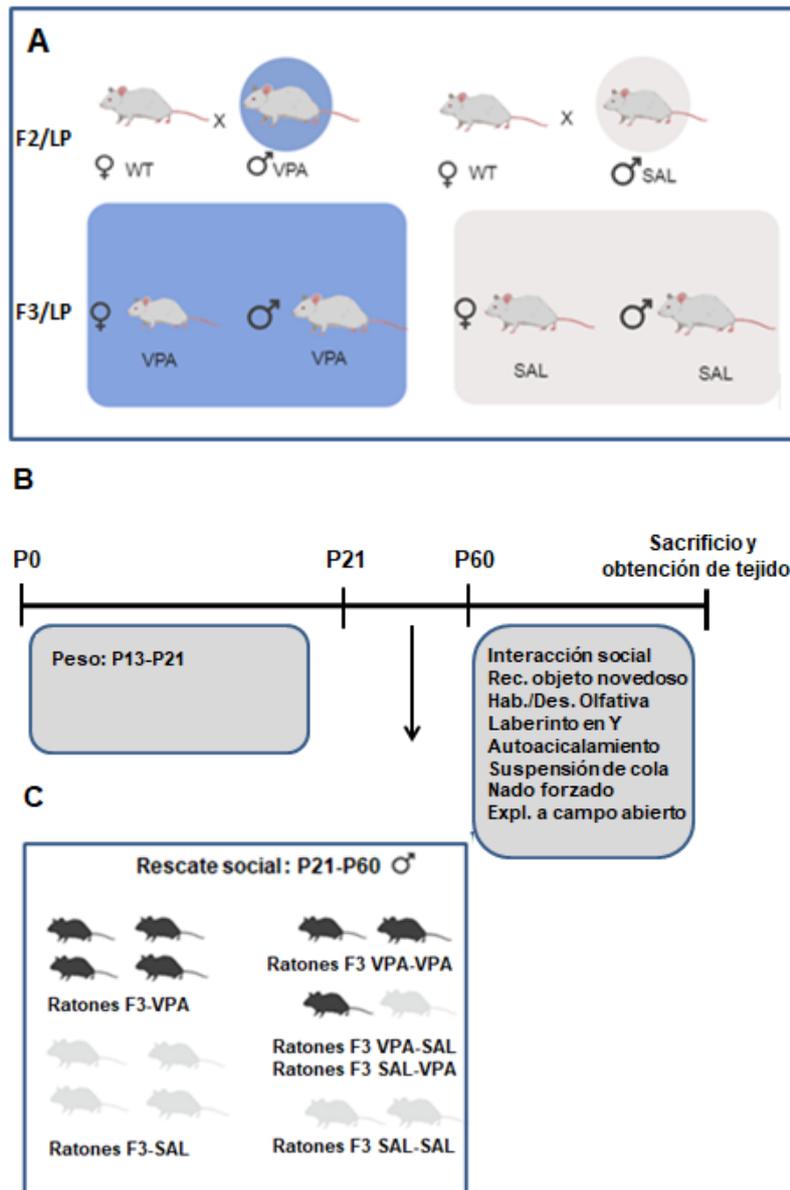


Figura V.28. Diseño experimental utilizado para obtener una F3 de linaje paterno (F3/LP). Durante el destete de la F2/LP, un grupo de animales fue destinado al estudio de la conducta y el otro fue mantenido hasta la adultez para realizar apareos. Se cruzaron ratones F2-VPA o F2-SAL con hembras *naïve* (A). A partir del P21 se realizaron los destetes, reservándose sólo los machos y distribuyéndolos de modo tal de establecer el modelo de estimulación social temprana mencionado previamente (C).

V.6.2. Crías F3: linaje paterno

V.6.2.1. Ganancia en peso durante el periodo postnatal en la F3-linaje paterno

Basados en bibliografía que reporta la existencia de herencia transgeracional en el modelo VPA (Tartaglione et al., 2019, Choi et al., 2016) y en el modelo de autismo por activación inmune materna (Weber-Stadlbauer et al., 2017), decidimos realizar la batería de ensayos en la F3 de nuestro modelo, incluyendo el modelo de rescate social.

Debido a que no registramos diferencias significativas en los ensayos de enderezamiento en una superficie, sobresalto acústico ni en la fuerza de agarre de los machos de la F2/LP, decidimos no realizar estos ensayos en la F3/LP. Por otro lado, como la ganancia en peso en los machos F2/LP fue menor desde P17 hasta el destete (Figura V.10A), decidimos estudiar si este efecto se observaba también en la F3.

Se analizaron los resultados con un Modelo lineal y mixto completo y no encontramos un efecto asociado al pedigrí en los machos ni en las hembras de la F3 [Machos: interacción pedigrí-tiempo: $F(2)= 1.20$ $p= 0.3120$, pedigrí: $F(1)= 0.04$ $p=0.8507$, tiempo: $F(2)= 507,61$ $p< 0.0001$; Figura V.29A; Hembras: interacción pedigrí-tiempo: $F(2)= 1.25$ $p= 0.2990$, pedigrí: $F(1)= 0.62$ $p= 0.4527$, tiempo: $F(2)= 663.31$ $p< 0.0001$, Figura V.29B]. En ambos sexos se observó un efecto asociado al tiempo que se corresponde con el crecimiento de los animales a lo largo del desarrollo postnatal.

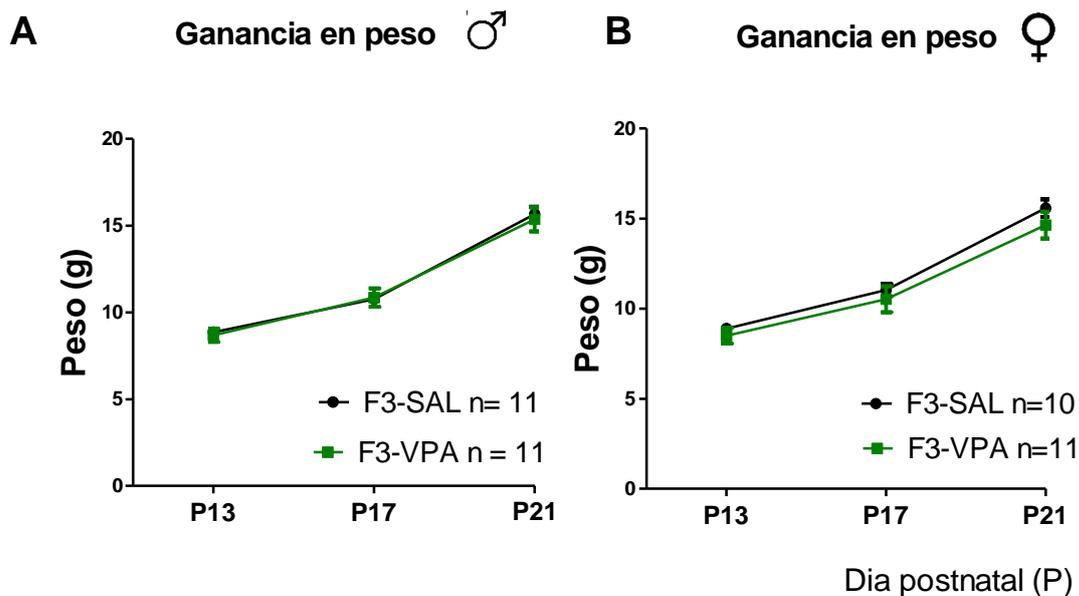


Figura V.29. Peso de las crías machos y hembras de la F3/LP. En ninguno de los sexos observamos un efecto asociado al pedigrí, aunque sí un efecto asociado al tiempo. N, en el gráfico. Se grafica la media \pm E.E.

V.6.2.2. Comportamiento en la adultez de la F3-linaje paterno

Se procedió a estudiar el comportamiento en la adultez en los machos de la F3/LP, incluyendo en el diseño experimental el modelo de estimulación social temprana.

Análisis sobre los niveles de sociabilidad en los machos F3/LP: Ensayo de interacción social

Los niveles de exploración del lado social fueron similares en todos los grupos, independientemente del pedigrí y del tratamiento postnatal [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,55) = 1.09$ $p = 0.3005$, pedigrí: $F(1,55) = 2.08$ $p = 0.1546$, tto post: $F(1,55) = 0.1$ $p = 0.7541$; Figura V.30A]. Además, en la Figura V.30C podemos observar que los animales no presentaban ninguna preferencia por uno de los lados durante el periodo de habituación [Prueba de t pareada: F3 SAL-SAL $t(14) = 1.96$ $p = 0.0702$, F3 SAL-VPA: $t(14) = 0.20$ $p = 0.8474$, F3 VPA-SAL: $t(14) = 1.34$ $p = 0.2023$, F3 VPA-VPA: $t(14) = 1.79$ $p = 0.0947$]. En cuando al índice de sociabilidad, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos [ANOVA de dos factores: interacción

pedigrí-tto post: $F(1,55): 1.92 p= 0.1716$, pedigrí: $F(1,55)= 1.87 p= 0.1768$, tto post: $F(1,55)= 0.0038 p= 0.9512$; Figura V.30B].

En base a estos resultados, vemos que los machos de la F3/LP no presentan las alteraciones en los niveles de sociabilidad observadas en sus antecesores de la F2 y la F1.

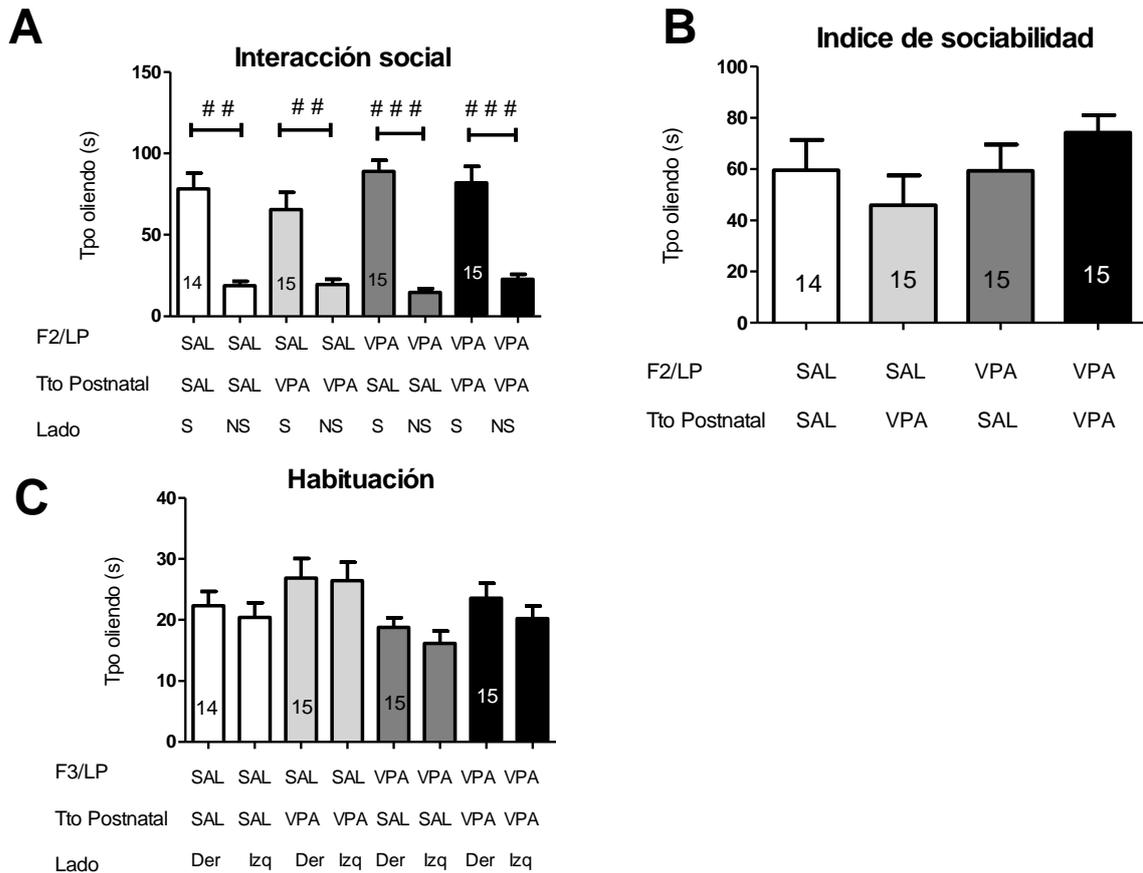


Figura V.30. Niveles de sociabilidad de los machos F3/LP y el efecto de la estimulación social temprana. Todos los grupos exploraron un tiempo similar el estímulo social y mostraron preferencia por el mismo (A). Esto se vio reflejado en el índice de sociabilidad (B). Los animales no mostraron una preferencia por uno de los lados durante la etapa de habituación (C). N, en las barras. Prueba t pareada: ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre la neofobia en los machos F3/LP: Ensayo de reconocimiento de un objeto novedoso

En el ensayo de reconocimiento de un objeto novedoso los grupos cuyos antecesores fueron tratados con VPA mostraron una tendencia a índices de discriminación mayores, aunque este efecto no fue estadísticamente significativo [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,56)= 0.08 p= 0.7788$,

pedigrí: $F(1,56) = 2.69$ $p = 0.1069$, tto post: $F(1,56) = 0.01$ $p = 0.9277$; Figura V.31A]. Tampoco se observaron diferencias en la distancia recorrida [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,56) = 1.81$ $p = 0.1837$, pedigrí: $F(1,56) = 1.35$ $p = 0.2498$, tto post: $F(1,56) = 3.98$ $p = 0.0510$; Figura V.31B]. En los machos de la F2/LP este ensayo había revelado que los animales del linaje VPA mostraban niveles más bajos de exploración del objeto novedoso, por lo que concluimos que este rasgo no se heredó a la siguiente generación de machos.

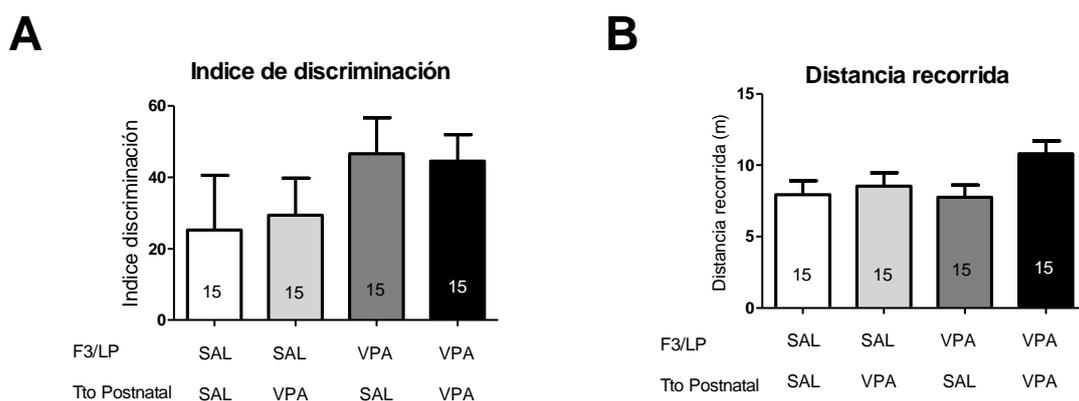


Figura V.31. Reconocimiento de un objeto novedoso de los machos F3/LP y el efecto de la estimulación social temprana. El índice de discriminación tendió a ser más alto en los animales cuyos antecesores fueron tratados con VPA, aunque este efecto no fue significativo (A). Tampoco se registraron diferencias en la distancia recorrida (B). N, en las barras. ANOVA de dos factores, seguida de la prueba de LSD Fisher. Se grafica la media \pm E.E.

Análisis sobre la función olfatoria en los machos F3/LP: Ensayo de habituación/deshabituación olfatoria.

Este ensayo demostró que todos los grupos fueron capaces de habituarse ante las presentaciones sucesivas de hisopos impregnados de Agua, u olor a Vainilla, a Machos y a Hembras respectivamente (Tabla V.5). Adicionalmente, se detectó un efecto asociado al pedigrí ante las presentaciones de Agua, olor a Banana y olor a Machos (Tabla V.5). En los tres casos los ratones de linaje VPA pasaron más tiempo oliendo estos olores que los descendientes de animales control (Figura V.32). En comparación a la generación de machos de la F2/LP que sólo habituaron al olor a Machos, los machos de la F3/LP mostraron una respuesta de habituación a una mayor cantidad de olores

presentados en este test. En ninguna de las generaciones se observaron interacciones entre el tiempo que olían cada presentación y el pedigrí.

Variable: tiempo oliendo					
Olores	Agua	Vainilla	Banana	Machos	Hembras
Pedigrí (ped)	F(1)= 5.27 p= 0.0242	F(1)= 0.14 p= 0.7075	F(1)= 4.85 p= 0.0299	F(1)= 7.70 p= 0.0068	F(1)= 0.16 p= 0.6922
Trat. Postnatal (tto post)	F(1)= 2.75 p= 0.1008	F(1)= 0.04 p= 0.8500	F(1)= 1.03 p= 0.3116	F(1)= 1.44 p= 0.2334	F(1)= 0.61 p= 0.4362
Presentación (pres)	F(2)= 6.69 p= 0.0020	F(2)= 5.81 p= 0.0043	F(2)= 2.95 p= 0.0565	F(2)= 12.35 p= 0.0001	F(2)= 8.37 p= 0.0005
Interacción ped- tto post	F(1)= 0.01 p= 0.9246	F(1)= 1.50 p= 0.2248	F(1)= 1.03 p= 0.3120	F(1)= 0.10 p= 0.7568	F(1)= 1.41 p= 0.2375
Interacción ped-pres	F(2)= 0.52 p= 0.5951	F(2)= 0.81 p= 0.4488	F(2)= 1.29 p= 0.2799	F(2)= 0.68 p= 0.5083	F(2)= 1.08 p= 0.3435
Interacción tto post-pres	F(2)= 1.69 p= 0.1915	F(2)= 0.21 p= 0.8124	F(2)= 1.12 p= 0.3306	F(2)= 1.66 p= 0.1970	F(2)= 1.45 p= 0.2393
Interacción ped-tto post-pres	F(2)= 0.80 p= 0.4543	F(2)= 1.31 p= 0.2744	F(2)= 1.02 p= 0.3652	F(2)= 0.46 p= 0.6349	F(2)= 0.12 p= 0.8876

Tabla V.5. Análisis estadístico del ensayo de Habitación/ deshabitación olfativa para cada olor. Modelo lineal general y mixto completo. En negrita se muestran los efectos en donde se observaron diferencias significativas.

Habitación/deshabitación olfativa

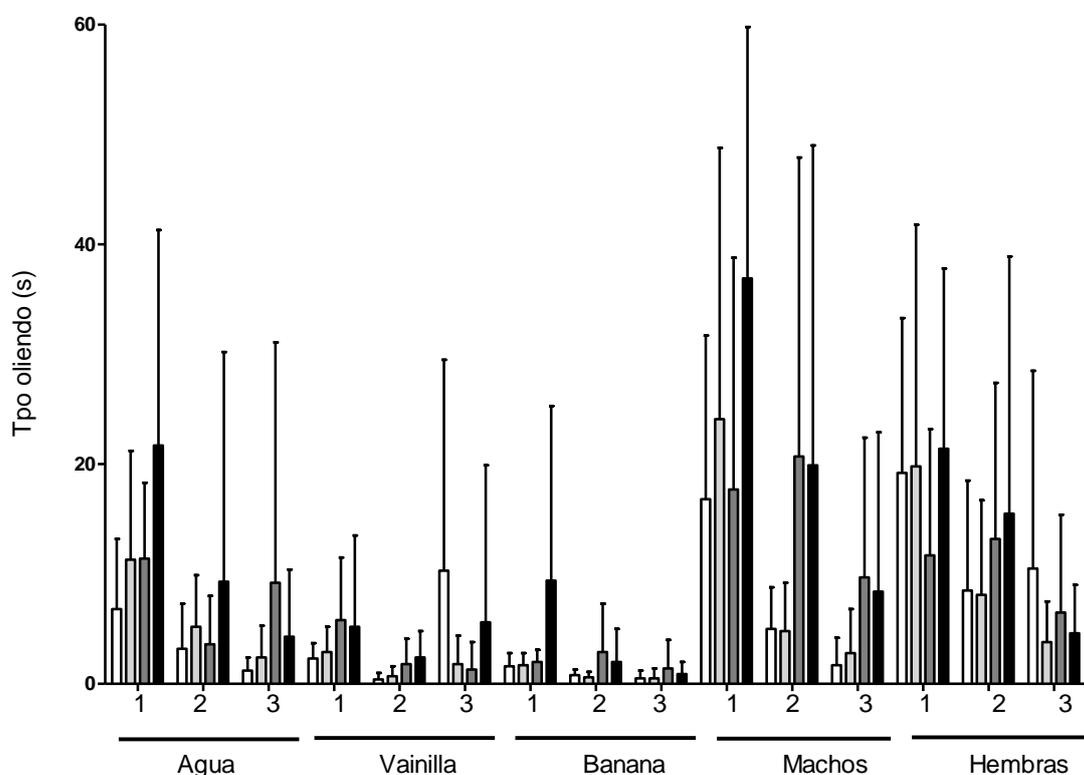


Figura V.32. Habitación y deshabitación olfativa en los machos F3/LP y el efecto de la estimulación social temprana. Se observó que los 4 grupos experimentales habituaron ante la presentación de un estímulo neutro, olor a Vainilla, Machos y Hembras. Ante los estímulos Agua, Banana y Machos se observó que los animales del pedigrí VPA olieron por más tiempo estos olores que los controles. $N_{F3\text{ SAL-SAL}} = 10$, $N_{F3\text{ SAL-VPA}} = 8$, $N_{F3\text{ VPA-SAL}} = 10$, $N_{F3\text{ VPA-VPA}} = 11$. Se analizó el experimento con un modelo lineal y mixto.. Se grafica la media + E.E.

El índice de discriminación social no mostró diferencias entre los diferentes grupos [interacción pedigrí-tto post: $F(1,35) = 0.99$ $p = 0.3258$, pedigrí: $F(1,35) = 2.86$

$p=0.0996$, tto post: $F(1,35)=0.81$ $p=0.3729$], sin embargo el del grupo F3 VPA-SAL tendió a ser llamativamente más bajo (Figura V.33A). Tampoco se encontraron diferencias en el índice de discriminación no social [interacción pedigrí-tto post: $F(1,35)=0.31$ $p=0.5783$, pedigrí: $F(1,35)=1.78$ $p=0.1907$, tto post: $F(1,35)=1.39$ $p=0.2459$; Figura V.33B]. En la Figura V.33C vemos que el tiempo que los animales huelen los olores sociales de Machos y Hembras tampoco presenta diferencias entre los grupos [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí- tto post: $F(1,38)=1.02$ $p=0.3205$, pedigrí: $F(1,38)=0.14$ $p=0.7125$, tto post: $F(1,38)=3.12$ $p=0.0862$], y en todos los casos los animales prefieren los olores sociales ante los no sociales [Prueba de t pareada: F3 SAL-SAL: $t(9)=3.59$ $p=0.0059$, F3 SAL-VPA: $t(9)=3.14$ $p=0.0163$, F3 VPA-SAL: $t(9)=3.02$ $p=0.0145$, F3 VPA-VPA: $t(10)=3.48$ $p=0.0059$]. Los resultados obtenidos parecen seguir un perfil similar al observado en los machos de la F2/LP, donde el índice de discriminación de los olores sociales tendió a ser menor en los ratones de pedigrí VPA.

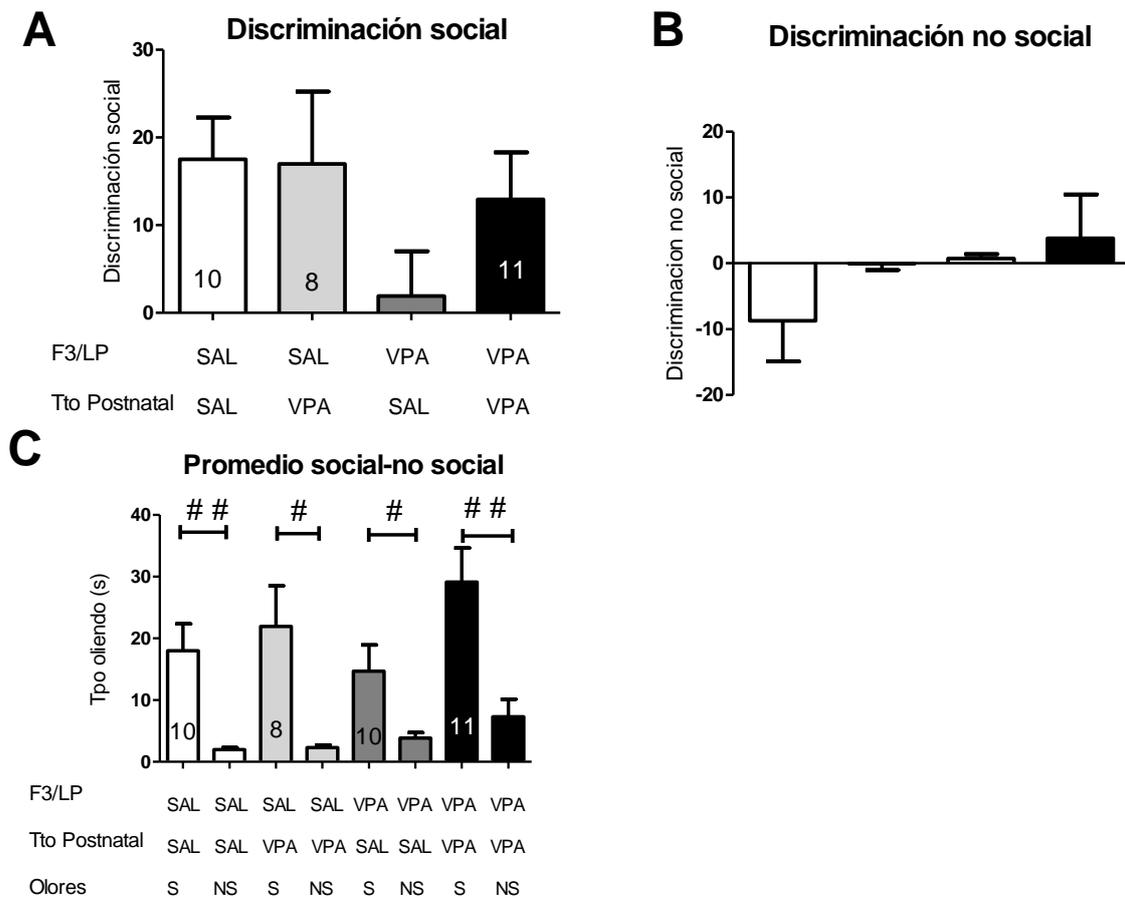


Figura V.33. Parámetros de discriminación olfativa en los machos F3/LP y el efecto de la estimulación social temprana. Si bien el grupo F3 SAL-VPA mostró un índice de discriminación de olores sociales menor que los otros grupos, no se observaron diferencias significativas (A). Tampoco se observaron diferencias entre los grupos experimentales en el índice de discriminación no social (B) o en el tiempo que huelen los olores sociales (C). Asimismo, todos los animales mostraron una preferencia por los olores sociales ante los no sociales (C). N, en las barras. Prueba de t pareada, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre comportamientos repetitivos en los machos F3/LP: Ensayos de laberinto en Y y autoacicalamiento

El ensayo del laberinto en Y llevado a cabo para evaluar comportamientos repetitivos indicó que no hay un efecto asociado al pedigrí o al tratamiento postnatal [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,54) = 2.67$ $p = 0.1084$, pedigrí: $F(1,54) = 2.18$ $p = 0.1456$, tto post: $F(1,54) = 0.54$ $p = 0.4641$; Figura V.34A]. Asimismo, el control de locomoción de este ensayo reveló que todos los grupos recorrieron una distancia parecida [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,54) = 0.0031$ $p = 0.9956$, pedigrí: $F(1,54) = 1.56$ $p = 0.2172$, tto post: $F(1,54) = 1.84$ $p = 0.1806$; Figura V.34B].

El ensayo de autoacicalamiento mostró un resultado similar al del laberinto en Y: todos los grupos pasaron una cantidad de tiempo similar acicalándose [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,54) = 0.16$ $p = 0.6931$, pedigrí: $F(1,54) = 1.57$ $p = 0.6931$, tto post: $F(1,54) = 0.03$ $p = 0.8654$; Figura V.34C].

Estos resultados van en el mismo sentido que los observados en los machos de la F2/LP, por lo que concluimos que los machos F3 no presenta alteraciones asociadas al pedigrí en cuanto a comportamientos repetitivos.

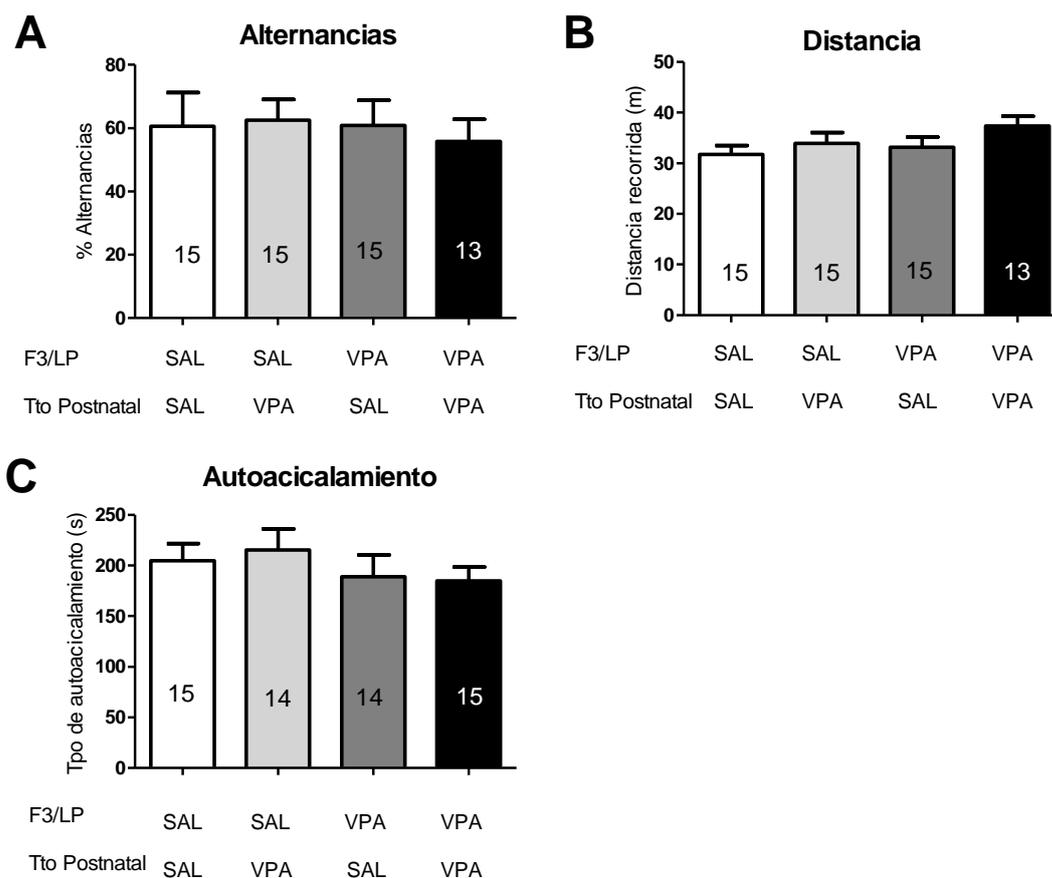


Figura V.34. Comportamientos repetitivos en los machos F3/LP y el efecto de la estimulación social temprana. El pedigrí así como la estimulación social no tienen un efecto sobre el porcentaje de alternancias (A) o la distancia recorrida en el laberinto en Y (B). Tampoco se observan diferencias entre los diferentes grupos en cuanto a los niveles de autoacicalamiento (C). N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

Análisis sobre comportamientos asociados a depresión en los machos F3/LP:

Ensayos de suspensión de la cola y de nado forzado

En este caso, los resultados de los ensayos realizados para evaluar comportamientos relacionados a depresión son diferentes. El ensayo de suspensión de la cola mostró un inesperado efecto asociado al tratamiento postnatal, siendo los animales criados con ratones del pedigrí VPA los que mostraron niveles más bajos de inmovilidad [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1, 55) = 0.29$ $p = 0.5936$, pedigrí: $F(1,55) = 0.25$ $p = 0.6191$, tto post: $F(1,55) = 8.06$ $p = 0.0063$; Figura V.35A]. Por otro lado, en el ensayo de nado forzado no se detectaron diferencias en el tiempo de inmovilidad en los grupos analizados [ANOVA de dos factores: interacción

pedigrí-tto post: $F(1,56)= 0.27$ $p= 0.606$, pedigrí: $F(1,56)= 0.04$ $p= 0.8475$, tto post: $F(1,56)= 0.52$ $p= 0.4753$; Figura V.35B].

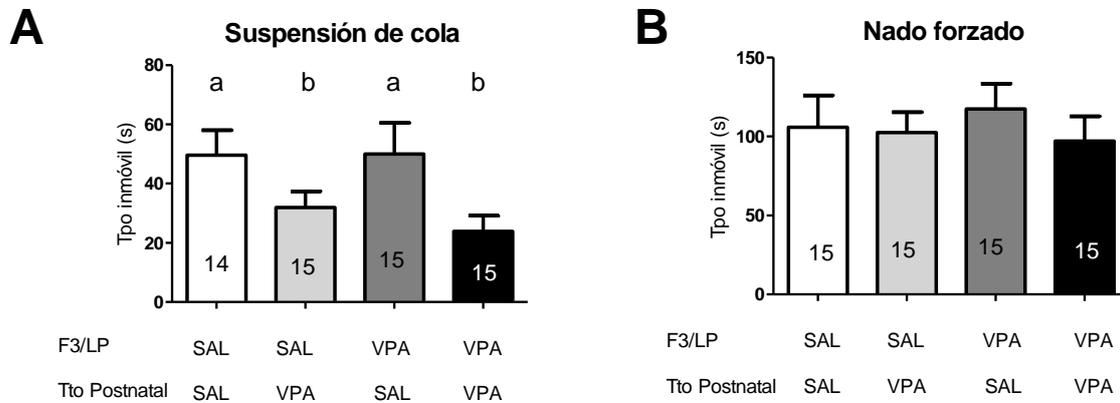


Figura V.35. Comportamientos asociados a depresión en los machos F3/LP y el efecto de la estimulación social temprana. Los animales que convivieron con ratones del pedigrí VPA mostraron un menor tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión de la cola (A). Este efecto no se observó en el ensayo de nado forzado, donde todos los grupos mostraron niveles similares de inmovilidad (B). ANOVA de dos factores, seguida de la prueba de LSD Fisher: letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$. N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

El resultado obtenido en el ensayo de suspensión de la cola resulta llamativo dado que en los machos de la generación anterior no se observó un efecto asociado al pedigrí o al tratamiento postnatal. Este efecto del tratamiento postnatal necesita ser estudiado en más detalle, y verificado en una nueva cohorte. Independientemente de este resultado, podemos afirmar que no hay un efecto asociado al pedigrí en los machos de la F2 y de la F3 en los comportamientos asociados a la depresión.

Análisis sobre comportamientos asociados a ansiedad en los machos F3/LP: Ensayo de exploración a campo abierto

En el ensayo de exploración a campo abierto observamos que el tiempo que los animales F3 SAL-VPA pasan en el centro tendió a ser más bajo, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1,56)= 0.68$ $p= 0.4119$, pedigrí: $F(1,56)= 0.34$ $p= 0.5625$, tto post: $F(1,56)= 1.31$ $p= 0.2579$; Figura V.36A]. Esta misma tendencia se

observó en la variable porcentaje de distancia recorrida en el centro [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí- tto post: $F(1,56)= 1.29$ $p= 0.2604$, pedigrí: $F(1,56)= 1.77$ $p= 0.1892$, tto post: $F(1,56)= 3.15$ $p= 0.0813$; Figura V.36B]. Es de notar que todos los animales exploraron poco el centro del campo abierto, lo que hace que pequeñas diferencias parezcan significativas. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de locomoción [ANOVA de dos factores: interacción pedigrí-tto post: $F(1, 56)= 2.68$ $p= 0.1073$, pedigrí: $F(1,56)= 1.14$ $p= 0.2912$, tto post: $F(1,56)= 2.00$ $p= 0.1624$; Figura V.36C].

Podemos concluir que la generación de machos F3/LP mostró niveles similares de exploración en el ensayo a campo abierto, lo cual indica que los animales no presentan rasgos conductuales asociados a ansiedad.

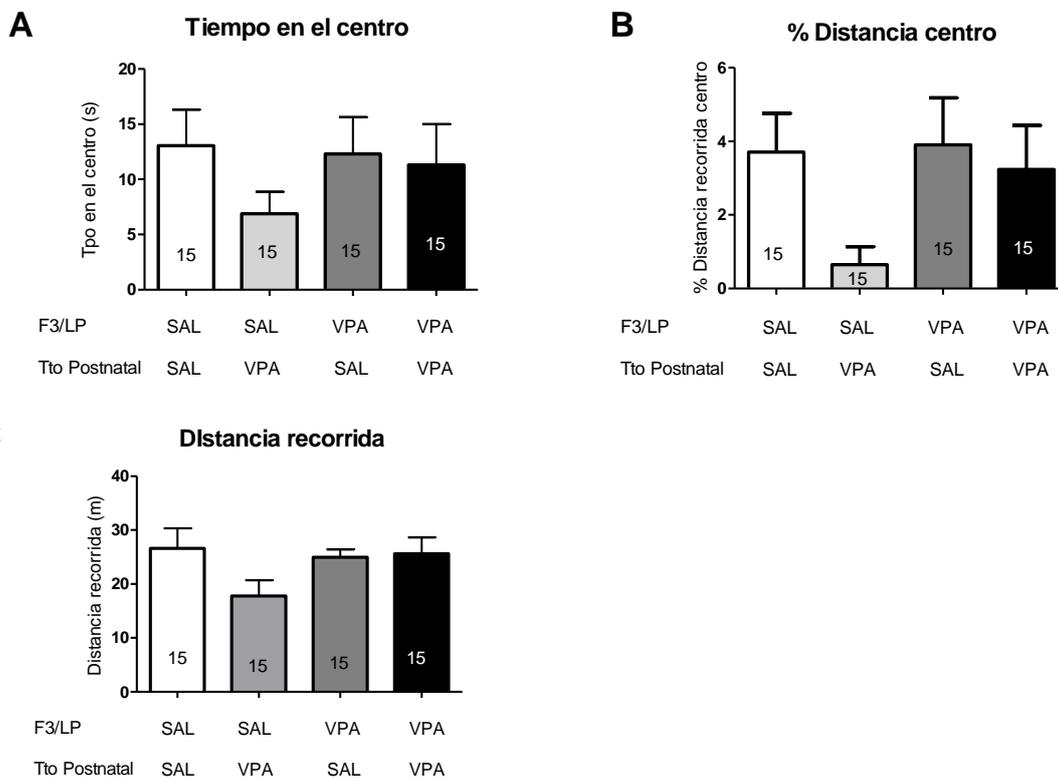


Figura V.36. Niveles de exploración en el campo abierto en los machos F3/LP y el efecto de la estimulación social temprana. No observamos diferencias significativas en el tiempo que los animales permanecieron en el centro de la arena (A) o en el porcentaje de distancia recorrida en el centro (B). Sin embargo el grupo F3 SAL-VPA mostró una tendencia a un menor tiempo en el centro, así como a un menor porcentaje de distancia recorrida en el centro. Además, ese grupo tendió a recorrer una distancia menor en el ensayo (C). N, en las barras. Se grafica la media + E.E.

V.6.3. Conclusiones y discusión sobre la ganancia de peso y el comportamiento en la adultez de machos F3/LP

En cuanto a la ganancia del peso de los animales de la F3, vemos que la reducción del peso reportada en la generación anterior no ha sido heredada en esta generación. Esto sugiere que aquellas posibles alteraciones metabólicas evidenciadas en la F2 se heredan por mecanismos epigenéticos que no afectan a sus gametas y por tanto no pueden ser heredados transgeneracionalmente.

El resultado más saliente de la batería de ensayos analizados en la adultez es que los animales de la F3 VPA-VPA presentan una preferencia por el lado social y niveles similares al control F3 SAL-SAL en el tiempo que exploran al estímulo social. Esto indica que este rasgo presente en la F2 VPA-VPA tampoco fue heredado a la F3. Ninguna de las otras alteraciones observadas en los machos F1-VPA (comportamientos repetitivos, asociados a depresión, ansiedad o alteración en la función olfatoria) se han expresado en la F3. Esto indica que en nuestro modelo no hay herencia transgeneracional de los fenotipos, sino que las alteraciones observadas a través del linaje paterno (en particular la sociabilidad) se expresan solamente en la F2, consistente con una herencia intergeneracional. Por lo tanto proponemos que el efecto del VPA sobre las crías F1-VPA podría haber afectado directamente la línea germinal de los animales en desarrollo en el útero de sus madres al momento del tratamiento, y estas alteraciones no fueron fijadas en la línea germinal de la F2 y por lo tanto no fueron heredadas a la F3.

Este resultado es diferente al observado en el trabajo de Choi et al. (2016) en el modelo VPA, donde ellos observan alteraciones en la sociabilidad, en comportamientos repetitivos y en ansiedad tanto en la F2, como en la F3. Estos cambios también fueron acompañados por un incremento en la expresión de proteínas relacionadas con mecanismos excitatorios postsinápticos (receptores de NMDA y AMPA) de la corteza prefrontal de la F1 y la F3. Como mencionamos anteriormente, si bien también utilizan el VPA como agente disruptor, existen ciertas diferencias en la realización del modelo. Por un lado, como mencionamos previamente, el modelo VPA no es exactamente igual ya que Choi et al. (2016) utiliza una dosis menor (300 mg/kg vs 600 mg/kg) y lo administra a una edad más temprana (DG10 vs DG12.5). Otra diferencia es que nuestro grupo trabaja con una cepa que es exocriada, que presenta una mayor variabilidad

genética que las cepas endocriadas como las utilizadas en el trabajo de Choi et al. (2016). En este sentido, la mayoría de los fenotipos conductuales son el resultado de la interacción compleja de múltiples genes y el uso de modelos animales ha sido una herramienta poderosa para la identificación de genes asociados a trastornos psiquiátricos. Por ejemplo, un trabajo realizado por Moy et al. (2007) demostró la presencia de variabilidad entre 10 cepas endocriadas en cuanto a sus niveles de sociabilidad (6 cepas mostraron altos niveles de sociabilidad mientras que 4 no, en particular las cepas A/J, BALB/cByJ, BTBR T+tf/J y 129S1/SvImJ). En base a estos antecedentes no podemos desestimar que la cepa del modelo es un factor importante en cuanto a la expresión de las conductas y, en base a nuestros resultados, posiblemente a su heredabilidad.

Finalmente, los efectos no esperados sobre los comportamientos relacionados con la depresión en animales que convivieron con animales del pedigrí VPA debe ser estudiado en más detalle, para determinar si se trata de una particularidad experimental o representa un efecto real de la estimulación social temprana. Dicho fenómeno podría estudiarse, por ejemplo, creciendo animales *naïve* con animales F3 VPA-VPA vs crecerlos con animales F3 SAL-SAL.

Capitulo VI. Conclusiones Generales

El objetivo general de esta tesis doctoral fue analizar en qué medida dos factores contribuyen a la neurobiología del autismo y la sociabilidad. Estos dos factores fueron: 1) el rol del cerebelo en los niveles de sociabilidad, y 2) la heredabilidad de los fenotipos asociados a autismo en el modelo murino que utilizamos en el laboratorio.

Rol del cerebelo en la modulación de la sociabilidad

Para lograr el objetivo 1), estudiamos si las características morfológicas más salientes presentes en el cerebelo de pacientes con DEA (en especial en el lóbulo VI/VII) también se encontraban presentes en el modelo VPA.

- En principio hallamos alteraciones en la densidad de células de Purkinje (CPs) en los machos del modelo durante el periodo postnatal (P14, P21). Curiosamente esto no fue observado en las hembras ni en los animales adultos (hembras y machos). Como mencionamos, los machos adultos son los que muestran déficit en la sociabilidad, lo que refuerza la hipótesis que alteraciones en la densidad de CPs durante el periodo postnatal podrían contribuir a la conducta observada en la adultez en los machos.

- Además pudimos determinar que el cerebelo de los ratones adultos (machos y hembras) no presenta las alteraciones morfológicas observadas en pacientes con DEA (cambios en el tamaño del lóbulo VII y menor tamaño de las CPs). Esto nos ha llevado a concluir que el déficit en la sociabilidad observado en los animales machos de este modelo no se encuentra asociado a estas alteraciones reportadas en los pacientes con autismo.

- Debido al interés creciente del rol del circuito de la recompensa y la sociabilidad, analizamos el nivel de activación del área tegmental ventral (VTA) en el modelo VPA (un área que Carta et al. 2019 demostró que estaba vinculada funcionalmente con el cerebelo). Encontramos que la activación de la VTA de

los animales machos del modelo VPA y los animales control no muestran diferencias significativas, por lo que en principio el circuito de la recompensa parecería no estar alterado en el modelo, aunque sería necesario realizar experimentos adicionales para confirmarlo.

Como se ha mencionado, son numerosos los estudios que vinculan un estado inflamatorio exacerbado con el autismo. En particular se ha reportado que el cerebelo de pacientes con DEA muestra signos de neuroinflamación crónica (Vargas et al., 2005). En nuestro laboratorio Lucchina & Depino (2014) demostraron una relación funcional entre la neuroinflamación del lóbulo VI/VII del cerebelo de ratones *naïve* y la sociabilidad. En esta tesis buscamos identificar los mecanismos mediante los cuales la neuroinflamación en el lóbulo VI/VII del cerebelo genera una reducción en la sociabilidad. Pudimos reproducir los resultados obtenidos por Lucchina & Depino (2014) y observamos una disminución en la sociabilidad luego de realizar la inyección de LPS en el lóbulo VI/VII. Adicionalmente, analizamos la conducta de ratones inyectados con LPS en el lóbulo VI/VII, a los cuales se le administró 1 hora antes del LPS un anti-inflamatorio sistémico no esteroideo (Ibuprofeno) o un anti-inflamatorio esteroideo (dexametasona). Estos dos anti-inflamatorios presentan diferentes blancos moleculares de acción.

- Observamos que la dexametasona evitó el efecto del LPS sobre la sociabilidad, mientras que el ibuprofeno lo hizo parcialmente.
- A nivel celular vimos que el LPS generó en el tejido cerebelar una reducción de la densidad de la microglia en reposo y un aumento de la microglia activada. En este sentido, solamente la dexametasona fue eficiente en reducir esta respuesta aunque no llegó a bloquearla totalmente. La dexametasona inhibe la vía NFκB regulando negativamente la expresión de genes de vías inflamatorias, y en particular la de las células del linaje de macrófagos y microglia.
- En base a estos resultados propusimos que el mecanismo de acción a partir del cual el LPS genera la reducción en la sociabilidad está relacionado con el aumento en la densidad de microglia activada, el reclutamiento de

macrófagos y, posiblemente, el contexto inflamatorio producido por las citoquinas liberadas por estas células.

La hipótesis de que la alteración inmune es capaz de modular la sociabilidad cuando actúa en el cerebro fetal es la base sobre la cual se desarrolla el modelo de MIA. Con este resultado demostramos que los niveles aumentados de microglia activada en el lóbulo VI/VII fue capaz de derivar en alteraciones de la sociabilidad en ratones que previamente habían demostrado ser sociables.

Los presentes objetivos han contribuido a entender el rol del cerebelo en la sociabilidad.

Heredabilidad de los fenotipos asociados a autismo en el modelo VPA

Para cumplir el objetivo 2) desarrollamos diferentes cruces de modo de poder determinar la heredabilidad de los fenotipos por el linaje materno o paterno.

- En cuanto a la herencia intergeneracional a través del linaje materno, concluimos que las hembras F1-VPA no presentan alteraciones en la conducta de cuidado materno, por lo que en este modelo, las alteraciones en la conducta de la F2-VPA de linaje materno no podrían ser explicadas a causa de este factor.

- Por otro lado, nuestros resultados sugieren que el bajo peso al nacer es una característica postnatal presente tanto en la F1-VPA como en la F2-VPA (tanto en machos como en hembras), y que puede heredarse tanto por vía paterna como materna. En el caso de los animales F2-VPA este menor peso al nacer aparece desde edades tempranas en el desarrollo en el linaje materno, pero más tardíamente en el paterno. En cambio, no observamos que se transmita transgeneracionalmente por vía paterna.

- Nuestro trabajo sugiere que los marcadores postnatales alterados en la F1-VPA (reflejo de enderezamiento, fuerza de agarre, y sobresalto acústico) no son heredados a la siguiente generación por linaje materno. Por otro lado, en los machos F2-VPA del linaje paterno se observó un fenotipo que no estaba presente en los machos de la F1-VPA, que es una mayor latencia al caer. La relevancia de este fenómeno y su posible relación con el menor peso que presentan los animales, necesitan ser evaluados en más detalle.

- En cuanto al comportamiento en la adultez, no observamos alteraciones heredadas a través del linaje materno a la F2-VPA. En cambio, en el linaje paterno observamos que las hembras F2-VPA comparten con los padres F1-VPA la presencia de comportamientos repetitivos en el laberinto en Y. Por otro lado, los machos de la F2-VPA, presentan al igual que sus padres F1-VPA, alteraciones en los niveles de sociabilidad, los cuales se expresaron como una ausencia de preferencia por el lado social. Estos resultados indican que la herencia por el linaje paterno presenta un dimorfismo sexual.

- Adicionalmente, a partir del modelo de rescate social, pudimos concluir que la alteración en la preferencia social reportada en los machos F2-VPA del linaje paterno puede ser rescatada con estimulación social temprana (al igual que en la F1-VPA).

- La alteración de la sociabilidad de la F2-VPA no parecería ser explicada por una alteración en el metabolismo de dopamina, aunque sí correlaciona (como en la F1-VPA) con cambios en la expresión de c-Fos+ en la corteza piriforme.

- Por último, no encontramos evidencia que indique en nuestro modelo que las características conductuales de los machos F1-VPA puedan ser heredados por un mecanismo de herencia transgeneracional.

De esta manera, creemos que este trabajo de investigación ha permitido describir aspectos importantes en cuanto a la neurobiología del autismo (en particular del cerebelo) y la heredabilidad de las características del modelo VPA. Futuros trabajos nos permitirán ahondar en los mecanismos inflamatorios que median la modulación de la sociabilidad por parte del cerebelo. Por otro lado, el estudio de los efectos metabólicos del VPA y sus mecanismos de herencia intergeneracional, podrían contribuir a comprender otras alteraciones no-neuronales presentes en los individuos con ASD, como por ejemplos alteraciones en la microbiota (Xu et al., 2019).

Capitulo VII. Bibliografía

- Al Sagheer, T., Haida, O., Balbous, A., Francheteau, M., Matas, E., Fernagut, P. O., Jaber, M. (2018). Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 21(9), 871–882.
- Albert, P.R. (2010). Epigenetics in mental illness: hope or hype? *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 35(6), 366–368.
- Allen, G. (2005). The cerebellum in autism. *Clinical Neuropsychiatry*, 2(6), 321–337.
- Amaral, D.G., Schumann, C.M., Nordahl, C.W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci.*, 31, pp. 137–145.
- American Psychiatric Association (APA, 1980): Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Third Edition. DSM-III Washington, DC: American Psychiatric Association.
- American Psychiatric Association (APA, 1994): Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th Edition). DSM-IV, Washington, DC: American Psychiatric Association.
- American Psychiatric Association (APA, 2013): Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th Edition). DSM-V, Washington, DC. American Psychiatric Association.
- Apps, R., Garwicz, M (2005). Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6, 297–311.
- Ardalan, M., Chumak, T., Vexler, Z., Mallard, C. (2019). Sex-Dependent Effects of Perinatal Inflammation on the Brain: Implication for Neuro-Psychiatric Disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(9), 2270.
- Ardinger, H. H., Atkin, J. F., Blackston, R. D., Elsas, L. J., Clarren, S. K., Livingstone, S., Flannery, D. B., Pellock, J. M., Harrod, M. J., & Lammer, E. J. (1988). Verification of the fetal valproate syndrome phenotype. *American Journal of Medical Genetics*, 29(1), 171–185.
- Arguello, P.A., Gogos, J.A. (2006). Modeling madness in mice: one piece at a time. *Neuron*, 52, 179–196.
- Ashwood, P., Wills, S., Van de Water, J. (2006). The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J. Leukoc. Biol.*, 80(1):1–15.
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior and Immunity*, 25: 40–45.
- Atladóttir, H.O., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D.E., Lemcke, S., Abdallah, M., Parner, E.T. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 40(12), 1423–1430.

- Aylward, E., Minshew, N., Field, K., Sparks, B., Singh, N. (2002) Effects of age on brain volume and head circumference in autism. *Neurology* 59:175–183.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., & Rutter, M. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological Medicine*, 25(1), 63–77.
- Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M., Lantos, P. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain*, 121 (Pt 5), 889–905.
- Bailey, D.B., Raspa, M., Olmsted, M., Holiday, D.B. (2008). Co-occurring conditions associated with FMR1 gene variations: Findings from a national parent survey. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 146(16), 2060–2069.
- Bale, T.L. (2015). Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 332–344.
- Bambini-junior, V., Baronio, D., Mackenzie, J., Zanatta, G., Riesgo, S. (2014). *Comprehensive Guide to Autism*. New York, NY: Springer.
- Baron-Cohen, S. (2010). Empathizing, systemizing, and the extreme male brain theory of autism. *Progress in Brain Research*, 186, 167–175
- Bauer, M.K., Lieb, K., Schulze-Osthoff, K., Berger, M., Gebicke-Haerter, P.J., Bauer, J., Fiebich, B.L. (1997). Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *European Journal of Biochemistry*, 243(3):726-31.
- Bauman, M.D., Iosif, A.M., Smith, S.E., Bregere, C., Amaral, D.G., Patterson, P.H. (2014). Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biological Psychiatry*, 75(4):332-41.
- Bauman, M., Kemper, T.L. (1985). Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology*, 35, 866–874.
- Becker, E.B., Stoodley, C.J. (2013). Autism spectrum disorder and the cerebellum. *International Review of Neurobiology*, 113, pp. 1 –34.
- Belzung, C., Leman, S., Vourc'h, P., Andres, C. (2005). Rodent models for autism: A critical review. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2(2), 93–101.
- Bernier, R., Golzio, C., Xiong, B., Stessman, H.A., Coe, B.P., Penn, O., Witherspoon, K., Gerds, J., Baker, C., Vulto-van Silfhout, A. T., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., Fichera, M., Bosco, P., Buono, S., Alberti, A., Failla, P., Peeters, H., Steyaert, J., Vissers, L., Francescato, L., Eichler, E.E. (2014). Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell*, 158(2), 263–276.
- Bohacek, J., Mansuy, I.M. (2013). Epigenetic inheritance of disease and disease risk. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 220–236.
- Bölte, S., Girdler, S., Marschik, P.B. (2019). The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(7), 1275–1297.

- Boudadi, E., Stower, H., Halsall, J.A., Rutledge, C.E., Leeb, M., Wutz, A., O'Neill, L.P., Nightingale, K.P., Turner, B.M. (2013). The histone deacetylase inhibitor sodium valproate causes limited transcriptional change in mouse embryonic stem cells but selectively overrides Polycomb-mediated Hoxb silencing. *Epigenetics & Chromatin*, 6(1), 11.
- Bronzuoli, M.R., Facchinetti, R., Ingrassia, D., Sarvadio, M., Schiavi, S., Steardo, L., Verkhatsky, A., Trezza, V., Scuderi, C. (2018). Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Molecular Autism*, 9:66.
- Broussard, D.M. (2014). *The Cerebellum: Learning Movement, Language, and Social Skills*. Chichester; UK. John Wiley & Sons, Inc.
- Buccafusco, J. (2001). *Methods of behavior analysis in neuroscience*. Boca Ratón, FL: CRC press LLC.
- Buitelaar, J. (2003) Why have drug treatments been so disappointing? *Novartis Found. Symp.*, 251:235-244.
- Caglayan A. (2010). Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. *Dev Med Child Neurol.*, 52(2):130-138.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5335–5340.
- Campolongo, M., Kazlauskas, N., Falasco, G., Urrutia, L., Salgueiro, N., Höcht, C., Depino, A.M. (2018). Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Molecular Autism*, 9, 36.
- Careaga, M., Murai, T., Bauman, M.D. (2017). Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biological Psychiatry*, 81(5), 391–401.
- Carletti, B., Rossi, F. (2008). Neurogenesis in the cerebellum. *Neuroscientist*.14(1): 91-100.
- Carta, I., Chen, C.H., Schott, A. L., Dorizan, S., Khodakhah, K. (2019). Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science*, 363(6424)
- Casanova, M.F., Buxhoeveden, D.P., Switala, A.E., Roy, E. (2002). Neuronal density and architecture (Gray Level Index) in the brains of autistic patients. *Journal of Child Neurology*, 17(7), 515–521.
- Casanova, M.F., Casanova, E.L., Frye, R.E., Baeza-Velasco, C., LaSalle, J.M., Hagerman, R.J., Scherer, S.W., Natowicz, M.R. (2020). Editorial: Secondary vs. Idiopathic Autism. *Frontiers in Psychiatry*, 11(April), 10–12.
- Cervantes, P., Matson, J. (2015). Comorbid Symptomology in Adults with Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability. *J. Autism Dev. Disord.*, 45(12):3961-3970.

- Chalfant, A.M., Rapee, R., Carroll, L. (2007). Treating anxiety disorders in children with high functioning autism spectrum disorders: A controlled trial. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 37pp.1842-1857
- Champagne, F.A. (2008). Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 386–397.
- Champagne, F.A., Curley, J.P. (2005). How social experiences influence the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(6), 704–709.
- Champagne, F.A., Meaney, M.J. (2007). Transgenerational Effects of Social Environment on Variations in Maternal Care and Behavioral Response to Novelty. *Behavioral Neuroscience*, 121(6), 1353–1363.
- Champagne, F.A., Francis, D.D., Mar, A., Meaney, M.J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology and Behavior*, 79, 359–371.
- Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S., Meaney, M.J. (2001). Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12736–12741.
- Chandrasekhar, T., Sikich, L. (2015). Challenges in the diagnosis and treatment of depression in autism spectrum disorders across the lifespan. *Dialogues Clin. Neurosci.*, 17(2):219-227.
- Chang, Y.-C., Cole, T. B., Costa, L. G. (2017). Behavioral phenotyping for autism spectrum disorders in mice. *Current Protocols in Toxicology*, 72, 11.22.1–11.22.21.
- Chess, S. (1971). Autism in children with congenital rubella. *J. Autism Child Schizophr.*, 1(1):33–47
- Choi, C.S., Gonzales, E.L., Kim, K.C., Yang, S.M., Kim, J.W., Mabunga, D.F., Cheong, J.H., Han, S.H., Bahn, G.H., Shin, C.Y. (2016). The transgenerational inheritance of autism-like phenotypes in mice exposed to valproic acid during pregnancy. *Scientific Reports*, 6(October), 1–11.
- Chown, N., Hughes, L. (2016). History and First Descriptions of Autism: Asperger Versus Kanner Revisited. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(6), 2270–2272.
- Colonna, M., Butovsky, O. (2017). Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35, 441–468.
- Courchesne, E., Yeung-Courchesne, R., Press, G., Hesselink, J., Jernigan, T. (1988) Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *New England Journal of Medicine*, 318:1349–1354.
- Courchesne, E., Carper, R., Akshoomoff, N. (2003). Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. *JAMA*, 290, pp. 337–344.

- Courchesne, E., Karns, C.M., Davis, H.R., Ziccardi, R., Carper, R.A., Tigue, Z.D., Chisum, H.J., Moses, P., Pierce, K., Lord, C., Lincoln, A.J., Pizzo, S., Schreibman, L., Haas, R.H., Akshoomoff, N.A., Courchesne, R.Y. (2001). Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology*, 57(2), 245–254.
- Crawley, J.N. (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 17, 448–459.
- Crews, D., Gore, A.C. (2014). *Transgenerational Epigenetics: Current Controversies and Debates*. Birmingham; USA. Elsevier Science.
- Curley, J.P., Mashoodh, R., Champagne, F.A. (2017). *Transgenerational Epigenetics*. In *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics (2nd Edition)*. Academic Press.
- Dantzer, R. (2001) Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 933:222-34.
- Datiche, F., Cattarelli, M. (1996). Catecholamine innervation of the piriform cortex: A tracing and immunohistochemical study in the rat. *Brain Research*, 710(1–2), 69–78.
- Dawson, G. (2008). Early behavioral intervention, brain plasticity, and the prevention of autism spectrum disorder. *Development and Psychopathology*, 20(3), 775–803.
- Daxinger, L., Whitelaw, E. (2012). Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nature Reviews Genetics*, 13(3), 153–162.
- De Bock, M., Vandenbroucke, R.E., Decrock, E., Culot, M., Cecchelli, R., Leybaert, L. (2014). A new angle on blood-CNS interfaces: a role for connexins? *FEBS Letters*, 588(8): 1259-70.
- De Lara, J. G. (2012). El autismo. Historia y clasificaciones. *Salud Mental*, 35(3), 257–261.
- De Majo, F., Calore, M. (2018). Chromatin remodelling and epigenetic state regulation by non-coding RNAs in the diseased heart. *Non-coding RNA*, 3:1; 20-28.
- Deacon, R.M.J., Rawlins, J.N.P. (2006) T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*, 1(1), 7-12.
- DeFilippis, M. (2018). Depression in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder. *Children*, 5, 112.
- DeLorey, T., Sahbaie, P., Hashemi, E., Homanics, G., Clark J. (2008). *Gabrb3* gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: a potential model of autism spectrum disorder. *Behav. Brain Res.*, 187, 207–220.
- Demeestere, D., Libert, C., Vandenbroucke, R.E. (2015). Clinical implications of leukocyte infiltration at the choroid plexus in (neuro)inflammatory disorders. *Drug Discovery Today*, 20(8): 928-41.

- Dheen, S.T., Kaur, C., Ling, E.A., (2007). Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 1189–1197.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2008). *InfoStat*, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Diedrichsen, J., Balsters, J.H., Flavell, J., Cussans, E., Ramnani, N. (2009). A probabilistic MR atlas of the human cerebellum. *NeuroImage*, 46(1), 39–46.
- Diodato, A., Ruinart de Brimont, M., Yim, Y. S., Derian, N., Perrin, S., Pouch, J., Klatzmann, D., Garel, S., Choi, G. B., Fleischmann, A. (2016). Molecular signatures of neural connectivity in the olfactory cortex. *Nature communications*, 7, 12238.
- D'Mello A. M., Stoodley C.J. (2015a). Cerebro-cerebellar circuits in autism spectrum disorder. *Front. Neurosci.*, 9:408.
- D'Mello, A.M., Crocetti, D., Mostofsky, S.H., & Stoodley, C.J. (2015b). Cerebellar gray matter and lobular volumes correlate with core autism symptoms. *NeuroImage. Clinical*, 7, 631–639.
- Dudova, I., Kasparova, M., Markova, D., Zemankova, J., Beranova, S., Urbanek, T., Hrdlicka, M. (2014). Screening for autism in preterm children with extremely low and very low birth weight. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 277–282.
- Duman, R.S., Adams, D.H., Simen, B.B. (2005). Chapter 5.3 Transcription factors as modulators of stress responsivity. In *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences* (Vol. 15, Issue PART 1). Elsevier Masson SAS.
- Dunn, G.A., Morgan, C.P., Bale, T. L. (2011). Sex-specificity in transgenerational epigenetic programming. *Hormones and Behavior*, 59(3), 290–295.
- Dusart, I., & Flamant, F. (2012). Profound morphological and functional changes of rodent Purkinje cells between the first and the second postnatal weeks: a metamorphosis?. *Frontiers in neuroanatomy*, 6, 11.
- Elagoz Yuksel, M., Yuceturk, B., Faruk Karatas, O., Ozen, M., Dogangun, B. (2016). The altered promoter methylation of oxytocin receptor gene in autism. *J Neurogenet*, 30:280–4.
- Ennaceur, A. Delacour, J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioral Brain Research*, 31, 47-59.
- Enstrom, A., Lit, L., Onore, C., Gregg, J., Hansen, R., Pessah, I., Hertz-Picciotto, I., Van de Water, J., Sharp, F., Ashwood, P. (2009). Altered gene expression and function of peripheral blood natural killer cells in children with autism. *Brain, Behavior and Immunity*, 23(1):124–133.
- Enstrom, A., Onore, C., Van de Water, J, Ashwood, P. (2010). Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain, Behavior and Immunity*, 24(1):64–71.

- Farina, C., Aloisi, F. Meinl, E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.*, 28, 138–145.
- Fatemi, S.H., Aldinger, K.A., Ashwood, P., Bauman, M.L., Blaha, C.D., Blatt, G.J., Chauhan, A., Chauhan, V., Dager, S.R., Dickson, P.E., Estes, A.M., Goldowitz, D., Heck, D.H., Kemper, T.L., King, B.H., Martin, L.A., Millen, K.J., Mittleman, G., Mosconi, M.W., Persico, A.M., ... Welsh, J.P. (2012). Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum* (London, England), 11(3), 777–807.
- Fatemi, S.H., Halt, A.R., Realmuto, G., Earle, J., Kist, D.A., Thuras, P., Merz, A. (2002). Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22(2), 171–175.
- Favre, M.R., Barkat, T.R., LaMendola, D., Khazen, G., Markram, H., Markram, K. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(JUL), 1–11.
- Ferreira, T.A., Blackman, A.V., Oyrer, J., Jayabal, S., Chung, A.J., Watt, A.J., Sjostrom, P.J., van Meyel, D.J. (2014). Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nature Methods*, 11, 982-984.
- Fidler, D., Bailey, J., Smalley, S. (2000). Macrocephaly in autism and other pervasive developmental disorders. *Dev. Med. Child Neurol.*, 42:737–740.
- Folstein, S.E., Rosen-Sheidley, B. (2001). Genetics of autism: Complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), 943–955.
- Fonnum, F., Lock, E.A. (2000). Cerebellum as a target for toxic substances. *Toxicol. Lett.*, 112-113:9-16.
- Forshammar, J., Jörneberg, P., Björklund, U., Westerlund, A., Lundborg, C., Biber, B., Hansson, E. (2013). Anti-inflammatory substances can influence some glial cell types but not others. *Brain Research*, 1539, 34–40.
- Francis, D., Diorio, J., Liu, D., Meaney, M.J. (1999). Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, 286: 1155–1158
- Franklin, T.B., Linder, N., Russig, H., Thöny, B., Mansuy, I.M. (2011) Influence of Early Stress on Social Abilities and Serotonergic Functions across Generations in Mice. *PLOS ONE* 6(7): e21842.
- Fuchikami, M., Morinobu, S., Kurata, A., Yamamoto, S., Yamawaki, S. (2009). Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neuro- trophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 12:73–82.
- Fukuchi, M., Nii, T., Ishimaru, N., Minamino, A., Hara, D., Takasaki, I., Tabuchi, A., Tsuda, M. (2009). Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neuroscience Research*, 65(1), 35–43.

- Galea, I., Bechmann, I., Perry, V.H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends in Immunology*, 28(1): 12-8.
- Ganter, S., Northoff, H., Mannel, D., Gebicke-Harter, P.J. (1992). Growth control of cultured microglia. *J. Neurosci. Res.*, 81, 218–230.
- Ghaziuddin, M., Ghaziuddin, N., Greden, J. (2002). Depression in persons with autism: Implications for research and clinical care. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 32, 299–306.
- Gillberg, C., Allely, C., Bourgeron, T., Coleman, M., Fernell, E., Hadjikhani, N., Sarovic, D. (2019). The Neurobiology of Autism. En F. R. Volkmar (Ed.), *Autism and Pervasive Developmental Disorders* (3rd ed., pp. 129-157).
- Glass, C., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M., Gage, F. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6): 918-34.
- Godschalk, M., Van der Burg, J., Van Duin, B., De Zeeuw, C. (1994). Topography of saccadic eye movements evoked by microstimulation in rabbit cerebellar vermis. *J. Physiol.*, 480(Pt 1):147–53.
- Goines, P.E., Croen, L.A., Braunschweig, D., Yoshida, C.K., Grether, J., Hansen, R., Kharrazi, M., Ashwood, P., Van de Water, J. (2011). Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. *Molecular Autism*, 2, 13.
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Baronio, D., Zanatta, G., Bristot, R., Vaccaro, T., Riesgo, R. (2013). Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model. *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I*.
- Grafodatskaya, D., Chung, B., Szatmari, P., Weksberg, R. (2010) Autism spectrum disorders and epigenetics. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*, 49(8):794-809.
- Grondhuis, S.N., Aman, M.G. (2012). Assessment of anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 6, 1345–1365.
- Groom, M.J., Kochhar, P., Hamilton, A., Liddle, E.B., Simeou, M., Hollis, C. (2017). Atypical Processing of Gaze Cues and Faces Explains Comorbidity between Autism Spectrum Disorder (ASD) and Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 47(5), 1496–1509.
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L.A., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J.K., Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch. Gen. Psychiatry*, 68:1095–1102.
- Hampson, D., Blatt, G. (2015). Autism spectrum disorders and neuropathology of the cerebellum. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 420.

- Harvey, L., Boksa, P. (2012). Prenatal and postnatal animal models of immune activation: relevance to a range of neurodevelopmental disorders. *Dev. Neurobio.*, 72(10):1335-1348.
- Hatton, D.D., Hooper, S.R., Bailey, D.B., Skinner, M.L., Sullivan, K.M., Wheeler, A. (2002). Problem behavior in boys with fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 108(2), 105–116.
- Hauss-Wegrzynia, B., Dobranski, P., Stoehr, J.D., Wenk, G.L. (1998). Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 780: 294-303.
- Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Göttlicher, M., Herrlich, P., Cato, A.C. (1997). I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO Journal*, 16(15):4698-707.
- Herbert, M.R., Ziegler, D.A., Deutsch, C.K., O'Brien, L.M., Lange, N., Bakardjiev, A., Hodgson, J., Adrien, K.T., Steele, S., Makris, N., Kennedy, D., Harris, G.J., Caviness, V.S., Jr (2003). Dissociations of cerebral cortex, subcortical and cerebral white matter volumes in autistic boys. *Brain*, 126(Pt 5), 1182–1192.
- Hinkerohe, D., Smikalla, D., Schoebel, A., Haghikia, A., Zoidl, G., Haase, C.G., Schlegel, U., Faustmann, P.M. (2010). Dexamethasone prevents LPS-induced microglial activation and astroglial impairment in an experimental bacterial meningitis co-culture model. *Brain Research*, 1329:45-54.
- Hoffman, G.E., Smith, M.S., Verbalis, J. G. (1993). c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 173–213).
- Hong, H., Kim, B., Im, H. (2016). Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. *International Neurology Journal*, 20(Suppl 1): S2-7.
- Hou, Q., Wang, Y., Li, Y., Chen, D., Yang, F., Wang, S. (2018). A developmental study of abnormal behaviors and altered GABAergic signaling in the VPA-treated rat model of autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(August), 1–15.
- Hustler J., Zhang H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res.*, 1309:83–94.
- Ingram, J.L., Peckham, S.M., Tisdale, B., Rodier, P.M. (2000). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicology and Teratology*, 22(3), 319–324.
- Jahng, J.W., Kim, N.Y., Ryu, V., Yoo, S.B., Kim, B.T., Kang, D.W., Lee, J.H. (2008). Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. *European Journal of Pharmacology*, 26; 581(1-2):64-70
- Jaison, J. (2018). Autism Aetiology: The journey of discovery from the “refrigerator mother” to the neurodevelopmental hypothesis. 2. *J Child Adolesc Psych*;2(2):1-2.

- Jawaid A., Mansuy I. (2019). Inter- and transgenerational inheritance of behavioral phenotypes. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 25:96-101.
- Jiang, H.Y., Xu, L.L., Shao, L., Xia, R.M., Yu, Z.H., Ling, Z.X., Yang, F., Deng, M., Ruan, B. (2016). Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 58, 165–172.
- Jiang, Y.-h., Sahoo, T., Michaelis, R.C., Bercovich, D., Bressler, J., Kashork, C.D., Liu, Q., Shaffer, L.G., Schroer, R.J., Stockton, D.W., Spielman, R.S., Stevenson, R.E., Beaudet, A.L. (2004). A mixed epigenetic/genetic model for oligogenic inheritance of autism with a limited role for UBE3A. *Am. J. Med. Genet.*, 131A: 1-10.
- Jirtle, R.L., Skinner, M.K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.*, 8: 253–262.
- Kanner L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nerv. Child* 2:217–250.
- Karimi, P., Kamali, E., Mousavi, S.M., Karahmadi, M. (2017). Environmental factors influencing the risk of autism. *J Res Med Sci*; 22: 27.
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(1), 91–103.
- Kaufmann, W.E., Cooper, K.L., Mostofsky, S.H., Capone, G.T., Kates, W.R., Newschaffer, C.J., Bukelis, I., Stump, M.H., Jann, A.E., Lanham, D. (2003). Specificity of cerebellar vermian abnormalities in autism: A quantitative magnetic resonance imaging study. *Journal of Child Neurology*, 18(7), 463–470.
- Kaufmann, W., Cooper, K., Mostofsky, S., Capone, G., Kates, W., Newschaffer, C., Bukelis, I., Stump, M., Jann, A., Lanham, D. (2003). Specificity of cerebellar vermian abnormalities in autism: A quantitative magnetic resonance imaging study. *Journal of Child Neurology*, 18(7), 463–470.
- Kazlauskas, N., Campolongo, M., Lucchina, L., Zappala, C., Depino, A.M. (2016). Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, 72, 11–21.
- 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*, 110:104441.
- Kemper, T.L., Bauman, M.L. (1993). The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. *Neurologic Clinics*, 11(1), 175–187.
- Kern, J.K., Geier, D.A., Sykes, L.K., Geier, M.R. (2016). Relevance of Neuroinflammation and Encephalitis in Autism. *Front. Cell. Neurosci.*, 9:519.
- Kern, J. (2003). Purkinje cell vulnerability and autism: a possible etiological connection. *Brain Development*, 6: 377–382.

Kiefer, R., Kreutzberg, G.W. (1991) Effects of dexamethasone on microglial activation in vivo: selective down-regulation of major histocompatibility complex class II expression in regenerating facial nucleus. *J. Neuroimmunol.*, 81, 99–108.

Kigerl, K., de Rivero Vaccari, J., Dietrich, W., Popovich, P., Keane, R. (2014). Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp. Neurol.*, 258:5-16.

Kim, K.C., Kim, P., Go, H.S., Choi, C.S., Park, J.H., Kim, H.J., Jeon, S.J., Dela Pena, I.C., Han, S.H., Cheong, J.H., Ryu, J.H., Shin, C.Y. (2013). Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Journal of Neurochemistry*, 124(6), 832–843.

Klengel T.,Dias, B.G, Ressler, K. J. (2016).Models of intergenerational and transgenerational transmission of risk for psychopathology in mice. *Neuropsychopharmacology*; 41, 219-231.

Kreiser, N.L., White, S.W. (2014) ASD in Females: Are We Overstating the Gender Difference in Diagnosis? *Clinical Child and Family Psychology Review*, 17, 67-84.

Kreutzberg, G. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8):312-318.

Kroncke, A. P., Willard, M., & Huckabee, H. (2016). What is Autism? History and Foundations. *Assessment of Autism Spectrum Disorder*, 3–9.

Kumsta, R. (2019). The role of epigenetics for understanding mental health difficulties and its implications for psychotherapy research. *Psychology and Psychotherapy: Theory, Research and Practice*, 92(2), 190–207.

Lainhart, J. E., Piven, J., Wzorek, M., Landa, R., Santangelo, S. L., Coon, H., Folstein, S. E. (1997). Macrocephaly in children and adults with autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 36(2), 282–290.

Lasa, M., Brook, M., Saklatvala, J., Clark, A.R. (2001) Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol. Cell. Biol.*, 21(3):771-80.

Laurence, J.A., Fatemi, S.H. (2005). Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum*, 4, 206–210.

Layd, S., Parnet, P., Goujon, E., Dantzer, R. (1994). Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Molecular Brain Research*, 27:157-162.

Leiner, H., Leiner, A., Dow, R. (1993). Cognitive and language functions of the human cerebellum. *Trends in Neuroscience*, 16:444–7.

Lewin, A.B., Wood, J.J., Gunderson, S., Murphy, T.K., Storch, E.A (2011). Phenomenology of Comorbid Autism Spectrum and Obsessive-Compulsive Disorders Among Children. *J. Dev. Phys. Disabil.*, 23, 543–553.

- Li, X., Chauhn, A., Shiekh, A.M., Patil, S., Chauhn, V., Li, X.M., Ji, L., Brown, T., Malik, M. (2009). Elevated Immune Response in the Brain of Autistic Patients. *Journal of Neuroimmunology*, 207(1-2): 111–116.
- Liu, D., Diorio, J., Day, J.C., Francis, D.D., Meaney, M.J. (2000). Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience*, 3(8).
- Lombardo, M., Moon, H., Su, J., Palmer, T.D., Courchesne, E., Pramparo, T. (2018). Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 23, 1001–1013.
- Losh, M., Esserman, D., Anckarsäter, H., Sullivan, P.F., Lichtenstein, P. (2012). Lower birth weight indicates higher risk of autistic traits in discordant twin pairs. *Psychological Medicine*, 42(5), 1091–1102.
- Loughlin, A.J., Woodroffe, M.N., Cuzner, M.L. (1993). Modulation of interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II and Fc receptor expression on isolated microglia by transforming growth factor-beta 1, interleukin-4, noradrenaline and glucocorticoids. *Immunology*, 79(1): 125–130
- Lucchina, L., Depino, A.M., (2014). Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. *Autism Research*, 7, 273–289.
- Mabunga, D.F.N., Gonzales, E.L.T., Kim, J., Kim, K.C., Shin, C.Y. (2015). Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 285–300.
- Macfarlane, A., & Greenhalgh, T. (2018). Sodium valproate in pregnancy: What are the risks and should we use a shared decision-making approach? *BMC Pregnancy and Childbirth*, 18(1), 1–11.
- Maestriepieri, D. (2005). Early experience affects the intergenerational transmission of infant abuse in rhesus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9726–9729.
- Marín-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., Mallat, M. (2004). Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron*, Vol. 41, 535–547
- Martin, L. A., Goldowitz, D., Mittleman, G. (2010). Repetitive behavior and increased activity in mice with Purkinje cell loss: a model for understanding the role of cerebellar pathology in autism. *European Journal of Neuroscience*. 31, 544–555.
- Matson, J., Nebel-Schwalm, M. (2007). Comorbid psychopathology with autism spectrum disorder in children: an overview. *Res. Dev. Disabil.*, 28(4):341-352.
- Matson, J.L., Williams, L.W. (2014). Depression and mood disorders among persons with autism spectrum disorders. *Res. Dev. Disabil.*, 35(9):2003-2007.
- Matta, S.M., Hill-Yardin, E.L., Crack, P.J. (2019). The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 75–90.

- Mazaleuskaya, L.L., Theken, K.N., Gong, L., Thorn, C.F., FitzGerald, G.A., Altman, R.B., Klein, T.E. (2015). PharmGKB summary: ibuprofen pathways. *Pharmacogenet. Genomics*, 25(2):96-106
- McFarlane, H.G., Kusek, G.K., Yang, M., Phoenix, J.L., Bolivar, V.J., Crawley, J.N. (2008). Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes, Brain & Behavior*, 7:152–163.
- Melas, P.A., Rogdaki, M., Lennartsson, A., Björk, K., Qi, H., Witasz, A., Werme, M., Wegener, G., Mathé, A.A., Svenningsson, P., Lavebratt, C. (2012). Antidepressant treatment is associated with epigenetic alterations in the promoter of P11 in a genetic model of depression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(5), 669–679.
- Meltzer, A., Van de Water, J. (2017). The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 284–298.
- Meyer, U., Feldon, J., Fatemi, S.H. (2009). In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 33, pp. 1061-1079
- Minakova, E., Warner, B.B. (2018). Maternal immune activation, central nervous system development and behavioral phenotypes. *Birth Defects Research*, 110(20), 1539–1550.
- Mitchell, E., Klein, S.L., Argyropoulos, K.V., Sharma, A., Chan, R.B., Toth, J.G., Barboza, L., Bavley, C., Bortolozzi, A., Chen, Q., Liu, B., Ingenito, J., Mark, W., Dudakov, J., Gross, S., Di Paolo, G., Artigas, F., Van Den Brink, M., Toth, M. (2016). Behavioural traits propagate across generations via segregated iterative-somatic and gametic epigenetic mechanisms. *Nature Communications*, 1–16.
- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 14:R47–R58.
- Morgan, J.T., Chana, G., Pardo, C.A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., Everall, I.P. (2010). Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biological Psychiatry*, 68(4), 368–376.
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Young, N.B., Perez, A., Holloway, L.P., Barbaro, R.P., Barbaro, J.R., Wilson, L.M., Threadgill, D.W., Lauder, J.M., Magnuson, T.R., Crawley, J.N. (2007). Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behavioural Brain Research*, 176(1), 4–20.
- Muhle, R., Trentacoste, S. V., and Rapin, I. (2004). The genetics of autism. *Pediatrics*.113:e472–e486.
- Mulas Delgado, F., Etchepareborda Simonini, M.C., Hernández Muela, S., Abad Mas, L., Téllez de Meneses Lorenzo, M., Mattos de Blanco, L. (2005). Bases neurobiológicas de los trastornos específicos de la comunicación (espectro autista). *Revista de Neurología*, 41(S01), S149.

- Mulas, F., Ros-Cervera, G., Millá, M., Etchepareborda, M., Abad, L., Téllez de Meneses, M. (2010). Modelos de intervención en niños con autismo. *Revista de Neurología*; 50(3), 77-84.
- Muldoon, L.L., Alvarez, J.I., Begley, D.J., Boado, R.J., Del Zoppo, G.J., Doolittle, N.D., Engelhardt, B., Hallenbeck, J.M., Lonser, R.R., Ohlfest, J.R., Prat, A., Scarpa, M., Smeyne, R.J., Drewes, L.R., Neuwelt, E.A. (2013). Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(1), 13–21.
- Mutlu-Albayrak H., Bulut C., Çaksen H. (2016). Fetal Valproate Syndrome. *Pediatr Neonatol.*, S1875-9572(16):300072-9.
- Nagarajan, R., Hogart, A., Gweye, Y., Martin, M.R., LaSalle, J.M. (2006). Reduced MeCP2 expression is frequent in autism frontal cortex and correlates with aberrant MECP2 promoter methylation. *Epigenetics*, 1(4):e1–11. 172.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846–852.
- National Institute of Health About autism. National Human Genome Research Institute. Updated May, (2019). <https://www.genome.gov/Genetic-Disorders/Autism>.
- Nedergaard, M., Takano, T. Hansen, A (2002). Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 748–755.
- Norris, G., Derecki, N., Kipnis, J. (2014). Microglial Sholl Analysis. Protocol Exchange. 10.1038/protex.2014.029
- Odom, S., Boyd, B., Hall, L., Hume, K. (2010). Evaluation of comprehensive treatment models for individuals with autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 40,425-36.
- Ohanian, S.H., Schwab J.H. (1967). Persistence of group a streptococcal cell walls related to chronic inflammation of rabbit dermal connective tissue. *J. Exp. Med.*, 125: 1137-1148.
- Olexová, L., Štefánik, P., Kršková, L. (2016). Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amygdala and cerebellum of VPA rats — An animal model of autism. *Neuroscience Letters*, 629, 9–14.
- Onore, C., Careaga, M., Ashwood, P. (2012). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun*, 26:383–92.
- Ornoy A (2009). Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus. *Reprod Toxicol*, 28(1):1-10.
- Ornoy, A., Becker, M., Weinstein-Fudim, L., & Ergaz, Z. (2020). S-Adenosine Methionine (SAME) and Valproic Acid (VPA) as Epigenetic Modulators: Special Emphasis on their Interactions Affecting Nervous Tissue during Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3721
- Ornoy, A., Koren, G., & Yanai, J. (2018). Is post exposure prevention of teratogenic damage possible: Studies on diabetes, valproic acid, alcohol and anti folates in

- pregnancy: Animal studies with reflection to human. *Reproductive Toxicology*, 80(March), 92–104.
- Palmen, S.J.M.C., van Engeland, H., Hof, P.R., Schmitz, C. (2004). Neuropathological findings in autism. *Brain*, 127(12), 2572–2583.
- Paxinos, G., Franklin, K., editors. (2004). *The Mouse brain in stereotaxic coordinates*, Second ed: Academic Press.
- Pembrey, M.E., Bygren, L.O., Kaati, G., Edvinsson, S., Northstone, K., Sjöström, M., Golding, J., ALSPAC Study Team (2006). Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *European Journal of Human Genetics*, 14(2), 159–166.
- Perez, R.G., Lewis, R.M. (1992). Regional Distribution of DARPP-32 (Dopamine- and Adenosine 3',5'-Monophosphate-Regulated Phosphoprotein of Mr = 32,000) mRNA in Mouse Brain. *Journal of Comparative Neurology*, 318(3): 304–315.
- Persico A., Bourgeron T. (2006). Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends Neurosci* 2006; 29: 349–58.
- Peschansky, V.J., Wahlestedt, C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*, 9(1):3-12.
- Petronis, A., Labrie, V. (2019). The crossroads of psychiatric epigenomics. *World Psychiatry*, 18(3), 353–354.
- Phiel C., Zhang F., Huang E., Guenther M., Lazar M., Klein P. (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*, 276(39):36734-36741.
- Pierce, K., Courchesne, E. (2001). Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biol. Psychiatry*, 49, 655–664.
- Pina-Camacho, L., Parellada, M., Kyriakopoulos, M. (2016). Autism spectrum disorder and schizophrenia: boundaries and uncertainties. *B. J. Psych. Advances*, 22(5), 316–324.
- Ploeger, A., Raijmakers, M.E.J., van der Maas, H.L.J., Galis, F. (2010). The Association Between Autism and Errors in Early Embryogenesis: What Is the Causal Mechanism? *Biological Psychiatry*, 67(7), 602-607.
- Pollak, D. D., & Weber-Stadlbauer, U. (2020). Transgenerational consequences of maternal immune activation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 97, 181–188.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 229:327–336.
- Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K., Antel, J. (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia*, 36(2):145-155.
- Prieto-Moreno, G., Rosenstein, Y. (2006). The links between the neuroendocrine and the immune systems: Views of an immunologist. In: Joseph-Bravo P, editor. *Molecular Endocrinology*. Kerala, India: Research Signpost; pp. 171–192.

- Rangasamy, S., D'Mello, S.R., Narayanan, V. (2013). Epigenetics, Autism Spectrum, and Neurodevelopmental Disorders. *Neurotherapeutics*, 10(4), 742–756.
- Rapoport, J.L., Giedd, J.N., Gogtay, N. (2012). Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Molecular Psychiatry*, 17(12), 1228–1238.
- Rapoport, M., van Reekum, R., Mayberg, H. (2000). The role of the cerebellum in cognition and behavior: a selective review. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 12(2): 193-8.
- Rasmussen, S.A., Jamieson, D.J., Honein, M.A., Petersen, L.R. (2016). Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.*, 374, 1981–1987.
- Reader, T.A., Grondin, L. (1987). Distribution of catecholamines, serotonin, and their major metabolites in the rat cingulate, piriform-entorhinal, somatosensory, and visual cortex: A biochemical survey using high-performance liquid chromatography. *Neurochemical Research*, 12(12), 1087–1097.
- Reichow, B., Barton, E.E., Boyd, B.A., Hume, K. (2012). Early intensive behavioral intervention (EIBI) for young children with autism spectrum disorders (ASD). *The Cochrane database of systematic reviews*, 10, CD009260. New Haven, John Wiley & Sons, Ltd.
- Reynolds, S., Lane, S.J., Richards, L. (2010). Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 2(3):120–132.
- Robert, C., Pasquier, L., Cohen, D., Fradin, M., Canitano, R., Damaj, L., Odent, S., Tordjman, S. (2017). Role of genetics in the etiology of autistic spectrum disorder: Towards a hierarchical diagnostic strategy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 1–30.
- Rodier, P., Ingram, J., Tisdale, B., Nelson, S., Romano, J. (1996). Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J. Comp. Neurol.*, 370(2):247-261.
- Rodier, P. M. (2000). The early origins of autism. *Sci. Am.* 282:56–63.
- Rogers, T.D., McKimm, E., Dickson, P.E., Goldowitz, D., Blaha, C.D., Mittleman, G. (2013). Is autism a disease of the cerebellum? An integration of clinical and pre-clinical research. *Front. Syst. Neurosci.*, 7:15.
- Roostaei, T., Nazeri, A., Sahraian, M., Minagar, A. (2014). The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurologic Clinics*, 32(4):859-869.
- Rosenberg, G. (2002). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*, 39:279–291.
- Roulet, F.I., Lai, J.K.Y., Foster, J.A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism - A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 47–56.

- Rubtsova, K., Marrack, P., Rubtsov, A.V. (2015). Sexual dimorphism in autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation*, 125(6), 2187–2193.
- Saavedra-Rodríguez, L., Feig, L.A. (2013). Chronic social instability induces anxiety and defective social interactions across generations. *Biological Psychiatry*, 73(1), 44–53.
- Sales, A J., Biojone, C., Terceti, M.S., Guimarães, F.S., Gomes, M.V., Joca, S.R. (2011). Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. *British Journal of Pharmacology*, 164(6), 1711–1721.
- Sampedro-Piquero, P., Begega, A. (2017). Environmental Enrichment as a Positive Behavioral Intervention Across the Lifespan. *Current Neuropharmacology*, 15(4), 459–470.
- Sampino, S., Juszcak, G.R., Zacchini, F., Swiergiel, A.H., Modlinski, J., Loi, P., Ptak, G.E. (2014). Grand-paternal age and the development of autism-like symptoms in mice progeny. *Translational Psychiatry*, 4(4), e386.
- Sandin S., Lichtenstein P., Kuja-Halkola R., Larsson H., Hultman C., Reichenberg A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA*, 311:1770–1777.
- Schanen, N.C. (2006). Epigenetics of autism spectrum disorders. *Human Molecular Genetics*, 15(SUPPL. 2), 138–150.
- Schiavi, S., Iezzi, D., Manduca, A., Leone, S., Melancia, F., Carbone, C., Petrella, M., Mannaioni, G., Masi, A., Trezza, V. (2019). Reward-Related Behavioral, Neurochemical and Electrophysiological Changes in a Rat Model of Autism Based on Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 479.
- Schiele, M. A., & Domschke, K. (2018). Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders. *Genes, Brain, and Behavior*, 17(3).
- Schneider, T., Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 30(1):80-89.
- Schneider, T., Turczak, J., Przewłocki, R. (2006). Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology*, 31(1), 36–46.
- Schweingruber, N., Reichardt, S.D., Lühder, F., Reichardt, H.M. (2012). Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(1):174-82
- Shah, R.R., Bird, A.P. (2017). MeCP2 mutations: Progress towards understanding and treating Rett syndrome. *Genome Medicine*, 9(1), 7–10.
- Shi, L., Smith, S.E., Malkova, N., Tse, D., Su, Y., Patterson, P.H. (2009). Activation of the maternal immune system alters cerebellar development in the offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(1), 116–123.

- Shulha, H. P., Cheung, I., Whittle, C., Wang, J., Virgil, D., Lin, C. L., Guo, Y., Lessard, A., Akbarian, S., & Weng, Z. (2012). Epigenetic signatures of autism: trimethylated H3K4 landscapes in prefrontal neurons. *Archives of General Psychiatry*, 69(3), 314–324.
- Siklenka, K., Erkek, S., Godmann, M., Lambrot, R., McGraw, S., Lafleur, C., Cohen T., Xia J., Suderman M., Hallett M., Trasler J., Peters A. Kimmins S. (2015). Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science*, 350(6261).
- Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C., Crawley, J.N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism, 11(7):490-502.
- Simonoff, E., Pickles, A., Charman, T., Chandler, S., Loucas, T., Baird, G. (2008). Psychiatric disorders in children with Autism Spectrum Disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 47(8), 921-929.
- Siu, M., Weksberg, R. (2017). Epigenetics of Autism Spectrum Disorder. *Adv Exp Med Biol.*, 978:63-90.
- Skokut, M., Robinson, S., Openden, D., Jimerson S (2008). Promoting the Social and Cognitive Competence of Children with Autism: Interventions at School. *Contemp. School Psychol.*, 13, 93–108.
- Smith, S., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., Patterson, P. (2007) Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *Journal of Neuroscience*, 27(40):10695–10702.
- Snyder, D.S., Unanue, E.R. (1982) Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production. *J. Immunol.*, 81, 1803–1805.
- Sotelo, C., Dusart, I. (2009). Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience*, 162, 589–600.
- Stanfield, A.C., McIntosh, A.M., Spencer, M.D., Philip, R., Gaur, S., Lawrie, S.M. (2008). Towards a neuroanatomy of autism: A systematic review and meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. *European Psychiatry*, 23(4), 289-299.
- Steffenburg, S., Gillberg, C., Hellgren, L., Andersson, L., Gillberg, I. C., Jakobsson, G., Bohman, M. (1989). A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 30(3), 405–416.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85: 367-370
- Stoodley, C., Valera, E., Schmahmann, J. (2012) Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fmri study. *Neuroimage*, 59:1560–1570.
- Strain, P., Bovey, E. (2011). Randomized, Controlled Trial of the LEAP Model of Early Intervention for Young Children With Autism Spectrum Disorders. *Topics in Early Childhood Special Education*, 31, 33-154.

- Sun, W., Poschmann, J., Del Rosario, R., Parikshak, N., Hajan, H., Kumar, V., Ramasamy, R., Belgard, T., Elangovan, B., Wong, C., Mill, J., Geschwind, D., Prabhakar, S. (2016). Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. *Cell*, 167: 1385-1397.
- Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., Yoshihara, Y., Omata, K., Matsumoto, K., Tsuchiya, K.J., Iwata, Y., Tsujii, M., Sugiyama, T., Mori, N. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, 70(1): 49-58.
- Tartaglione, A.M., Cipriani, C., Chiarotti, F., Perrone, B., Balestrieri, E., Matteucci, C., Sinibaldi-Vallebona, P., Calamandrei, G., Ricceri, L. (2019). Early Behavioral Alterations and Increased Expression of Endogenous Retroviruses Are Inherited Across Generations in Mice Prenatally Exposed to Valproic Acid. *Molecular Neurobiology*, 56(5), 3736–3750.
- Taylor, P.D., McConnell, J., Khan, I.Y., Holemans, K., Lawrence, K.M., Asare-Anane, H., Persaud, S.J., Jones, P.M., Petrie, L., Hanson, M.A., Poston, L. (2005). Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(1), R134–R139.
- Teeling, J.L., Cunningham, C., Newman, T.A., Perry, V.H.. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1 (2010). *Brain, Behavior and Immunity*, 24(3):409-19.
- Tetreault, N.A., Hakeem, A.Y., Jiang, S., Williams, B.A., Allman, E., Wold, B.J., Allman, J.M. (2012). Microglia in the cerebral cortex in autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42(12), 2569–2584.
- Theoharides, T., Asadi, S., Patel, A. (2013). Focal brain inflammation and autism. *J Neuroinflammation*, 10:46.
- Tischner, D., Reichardt, H.M. (2007) Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275 (1-2), pp.62.
- Torrente, F., Ashwood, P., Day, R., Machado, N., Furlano, R.I., Anthony, A., Davies, S.E., Wakefield, A.J., Thomson, M.A., Walker-Smith, J.A., Murch, S.H. (2002). Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Molecular Psychiatry*, 7(4), 375–334.
- Torres-Platas, S.G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G.D., Cruceanu, C., Turecki, G., Giros, B., Mechawar, N. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *Journal of neuroinflammation*, 11, 12.
- Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., Nestler, E.J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(5), 355–367.
- Tsujino, N., Nakatani, Y., Seki, Y., Nakasato, A., Nakamura, M., Sugawara, M., Arita, H. (2007). Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. *Neuroscience Research*, 57(2), 289–295.

- Tung, E.W., Winn, L.M. (2010). Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 248(3), 201–209.
- Van Steensel, F., Bogels, S., Perrin, S. (2011). Anxiety disorders in children and adolescents with autistic spectrum disorders: a meta-analysis. *Clin. Child Fam. Psychol. Rev.*, 14:302–317.
- Vane, J.R., Botting, R.M. (1996). Mechanism of Action of AntiInflammatory Drugs. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 25:sup102.
- Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., Pardo, C.A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.*, 57, pp. 67-81.
- Vasa, R.A., Mazurek, M.O. (2015). An update on anxiety in youth with autism spectrum disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, 28(2), 83–90.
- Verkerk, A.J.M.H., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P.A., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F., Eussen, B.E., van Ommen, G.J.B., Blonden, L.A.J., Riggins, G.J., Chastain, J.L., Kunst, C.B., Galjaard, H., Caskey, T.C., Nelson, D. L., Oostra, B., Warren, S. T. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65(5), 905–914.
- Verkhatsky, A., Nedergaard, M. (2014). Astroglial cradle in the life of the synapse. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 369 (1654):20130595.
- Vivanti, G., Dissanayake, C., Victorian ASELCC Team (2016). Outcome for Children Receiving the Early Start Denver Model Before and After 48 Months. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(7), 2441–2449.
- Wagner, G.C., Reuhl, K.R., Cheh, M., McRae, P., Halladay, A.K., (2006). A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J. Autism. Dev. Disord.*, 36, 779-9.
- Wang, Z.J., Zhong, P., Ma, K., Seo, J.S., Yang, F., Hu, Z., Zhang, F., Lin, L., Wang, J., Liu, T., Matas, E., Greengard, P., Yan, Z. (2020). Amelioration of autism-like social deficits by targeting histone methyltransferases EHMT1/2 in Shank3-deficient mice. *Mol Psychiatry* 25, 2517–2533.
- Warrier, V., Baron-Cohen, S. (2001). *The Genetics of Autism*. John Wiley y Sons, Ltd (Ed.), ELS (pp. 1-9).
- Webb, S.J., Sparks, B.F., Friedman, S.D., Shaw, D.W., Giedd, J., Dawson, G., Dager, S.R. (2009). Cerebellar vermal volumes and behavioral correlates in children with autism spectrum disorder. *Psychiatry Research*, 172(1), 61–67.
- Weber-Stadlbauer, U., Richetto, J., Labouesse, M.A., Bohacek, J., Mansuy, I.M., Meyer, U. (2017). Transgenerational transmission and modification of pathological traits induced by prenatal immune activation. *Molecular Psychiatry*, 22(1), 102–112.
- Weitlauf, A.S., McPheeters, M.L., Peters, B., Sather, N., Travis, R., Aiello, R., Williamson, E., Veenstra-VanderWeele, J., Krishnaswami, S., Jerome, R., Warren, X.

- (2014) Therapies for Children With Autism Spectrum Disorder: Behavioral Interventions Update [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); Report No.: 14-EHC036-EF.
- Wessler, S. (1976). Introduction: What is a model? In: *Animal Models of Thrombosis and Hemorrhagic Diseases*. Washington, DC: The National Academies Press.
- White, S.W., Roberson-Nay, R. (2009). Anxiety, Social Deficits, and Loneliness in Youth with Autism Spectrum Disorders. *J. Autism. Dev. Disord.*, 39, 1006–1013.
- Whitney, E., Kemper, T., Bauman, M., Rosene, D., Blatt, G. (2008). Cerebellar Purkinje cells are reduced in a subpopulation of autistic brains: A stereological experiment using calbindin-D28k. *Cerebellum*, 7(3), 406–416.
- Whitney, E.R., Kemper, T.L., Rosene, D.L., Bauman, M.L., Blatt, G.J. (2009). Density of cerebellar basket and stellate cells in autism: evidence for a late developmental loss of Purkinje cells. *Journal of Neuroscience Research*, 87(10), 2245–2254.
- Wing, L. (1981). Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychological Medicine*, 11: 115–29.
- Winterer, G. (2003). Valproate and GABAergic System Effects. *Neuropsychopharmacol*, 28, 2050–2051.
- Wong, C., Meaburn, E., Ronald, A., Price, T.S., Jeffries, A., Schalkwyk, L., Plomin, R., Mill, J. (2014). Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Molecular Psychiatry*, 19(4), 495–503.
- Wyszynski, D., Nambisan, M., Surve, T., Alsdorf, R., Smith, C., Holmes, L. Antiepileptic Drug Pregnancy R (2005). Increased rate of major malformations in offspring exposed to valproate during pregnancy. *Neurology*, 64(6):961–5.
- Xu, M., Xu, X., Li, J., Li, F. (2019) Association Between Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Psychiatry*, 10: 473.
- Yang, E., Ahn, S., Lee, K., Mahmood, U., Kim, H. (2016) Early Behavioral Abnormalities and Perinatal Alterations of PTEN/AKT Pathway in Valproic Acid Autism Model Mice. *PLOS ONE*, 11(4).
- Yang, M., Crawley, J. N. (2009). Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr. Protoc. Neurosci.* CHAPTER: Unit–8.24.
- Yeshurun, S., Hannan, A. (2019). Transgenerational epigenetic influences of paternal environmental exposures on brain function and predisposition to psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 24(4), 536–548.
- Yip, J., Soghomonian, J., Blatt, G. (2007). Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications. *Acta Neuropathol.*, 113,559–568.
- Zagni, E., Simoni, L., Colombo, D. (2016). Sex and Gender Differences in Central Nervous System-Related Disorders. *Neuroscience Journal*, 2016, 1–13.

Zhao X., Pak Ch., Smrt R., Jin P. (2007). Epigenetics and neural developmental disorders. *Epigenetics*, 2: 126-38.

Zhu, L., Wang, X., Li, X. L., Towers, A., Cao, X., Wang, P., Bowman, R., Yang, H., Goldstein, J., Li, Y., Jiang, Y. (2014). Epigenetic dysregulation of SHANK3 in brain tissues from individuals with autism spectrum disorders. *Human Molecular Genetics*, 23(6), 1563–1578.

Zoghbi, H.Y. (2005). MeCP2 dysfunction in humans and mice. *Journal of Child Neurology*, 20(9), 736–740.