



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di Dottorato in Scienze morfologiche, fisiologiche e dello sport

Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute

CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE MORFOLOGICHE

Ciclo XXVIII

**CONSEGUENZE DELL'ATTIVAZIONE IMMUNITARIA MATERNA
SULLO SVILUPPO NEUROLOGICO DELLA PROLE**

BIO/16 - BIO/17

MARCO RASILE

MATRICOLA: R10003

RELATORE: Prof.ssa Isabella BARAJON

CO-RELATORE: Prof.ssa Michela MATTEOLI

COORDINATORE: Prof.ssa Chiarella SFORZA

A.A. 2015-2016

1 Sommario

1	Sommario.....	1
2	Premessa.....	5
3	Abstract.....	7
4	Introduzione	8
4.1	Infezioni prenatali ed il modello MIA.....	8
4.1.1	Infezioni nella gestante.....	8
4.1.2	Studi epidemiologici.....	8
4.1.3	Riprogrammare lo sviluppo cerebrale	10
4.1.4	Modelli di MIA.....	11
4.1.5	Composti infiammatori	13
4.1.6	Periodo gestazionale.....	13
4.2	I recettori Toll.....	15
4.2.1	Scoperta dei recettori Toll e Toll-like.....	15
4.2.2	Struttura dei TLR	16
4.2.3	Proteine adattatrici.....	17
4.2.4	Ligandi	17
4.2.5	I TLR e l'evoluzione	18
4.2.6	I TLR ed il sistema nervoso.....	19
4.3	Epilessia	20
4.3.1	Classificazione medica e segni	20
4.3.2	Eziologia	20
4.3.3	Fattori molecolari.....	21
4.3.4	L'epilessia nei MIA	21
4.3.5	Disfunzioni della barriera emato-encefalica.....	21

4.4	L'unità neuro-vascolare e lo sviluppo del sistema nervoso	23
4.4.1	Vasculogenesi ed angiogenesi	23
4.4.2	Il pathway di Wnt nel processo di angiogenesi	24
4.4.3	La Barriera Emato-Encefalica	25
4.4.4	I periciti	27
4.4.5	L'asse PDGF-R / PDGF-BB.....	28
4.4.6	Tight junctions: claudine	29
4.5	La placenta	29
4.5.1	Modulazione immunologica della placenta.....	30
4.5.2	Produzione di citochine a livello placentare.....	30
4.5.3	Microbiota a livello placentare ed uterino	31
4.5.4	Placentazione comparativa.....	31
5	Scopo del progetto	34
5.1	Fasi del progetto.....	34
6	Risultati.....	35
6.1	Scelta del modello MIA indotto dall'iniezione di POLYI:C a GD9	35
6.2	Validazione del modello MIA indotto dall'iniezione di POLYI:C.....	36
6.3	Caratterizzazione degli effetti del modello MIA a livello comportamentale.....	37
6.4	Valutazione della suscettibilità all'epilessia della prole di modelli MIA.....	40
6.5	Valutazione dei parametri infiammatori a breve termine.....	42
6.6	Valutazione dei parametri infiammatori a lungo termine	44
6.7	Valutazione della permeabilità di membrana della barriera emato-encefalica	48
6.8	Localizzazione dell'albumina a livello astrocitario	51
6.9	Valutazione del microbiota nella prole di modelli MIA	52
6.10	Analisi del pathway di Wnt e claudina5	55
6.11	Analisi del coverage pericitario dei vasi a livello cerebrale	59

6.12	Ruolo di CD248 e PDGFB nello sviluppo cerebrale	60
6.13	Densità dei vasi ematici a livello cerebrale	62
6.14	Analisi dello stato di salute della placenta	63
6.15	Valutazione della percentuale di vasi di origine embrionale (plate corionico + villi) ..	64
7	Discussione	67
8	Conclusione	79
9	Materiali e metodi	81
9.1	Animali impiegati	81
9.2	Maternal Immune Activation	81
9.3	ELISA per IL6	81
9.4	Immunofluorescenza su fettine	82
9.5	Skeleton analysis	82
9.6	Analisi di colocalizzazione	82
9.7	Analisi di localizzazione nucleare	83
9.8	Analisi di <i>coverage</i>	83
9.9	Western Blot analisi per tessuti	83
9.10	Real time PCR	84
9.11	Novel object recognition	84
9.12	Sociability test	85
9.13	Marble burying assay	85
9.14	Induzione di crisi epilettiche mediante acido kainico	85
9.15	Evan's blue	86
9.16	Analisi istologica dei preparati di placenta	87
9.17	Quantificazione dei SCFA	88
9.18	Osservazione dei campioni.....	88
9.19	Analisi statistica.....	88

10	Sigle ed acronimi.....	90
11	Bibliografia	92

2 Premessa

Lo studio delle conseguenze a lungo termine di eventi traumatici avvenuti durante il periodo gestazionale ed i loro effetti sulla prole ha una lunga storia. Uno degli episodi più rilevanti in tale ambito è stato lo *hongerwinter* o inverno della fame. Tale carestia colpì l'Olanda durante gli ultimi mesi della seconda guerra mondiale, ovvero intorno al 1944. Questo drammatico episodio costituisce l'unica carestia avvenuta in epoca moderna di cui si conoscono con certezza le conseguenze sanitarie a lungo termine. Lo *hongerwinter* è stato a lungo oggetto di studi ed ha fornito un accurato resoconto degli effetti della malnutrizione materna sullo sviluppo del feto; si è così provato che soggetti esposti alla carestia materna in epoca fetale hanno maggiori probabilità, in età adulta, di andare incontro a diverse patologie quali obesità, ipertensione, diabete di tipo II e disturbi psichiatrici quali schizofrenia e depressione, trasmessi ai discendenti tramite meccanismi epigenetici (Brown & Susser, 2008; Stein & Lumey, 2000).

In tempi più recenti, un differente fenomeno, ha portato alla coniazione di un nuovo termine: "*winter baby*" dall'inglese bambini dell'inverno. Questo termine nasce dall'insieme di due fattori: il momento del concepimento ed il periodo dell'anno con maggior prevalenza di infezioni, non solo nelle gestanti.

Recenti studi epidemiologici hanno posto in evidenza la stretta relazione tra infezioni contratte in gravidanza e disturbi della funzionalità neuronale nella prole. Patologie quali epilessia, schizofrenia e disturbi dello spettro autistico presentano una prevalenza maggiore in soggetti nati da gravidanze con provate complicanze di tipo infettivo (Brown & Derkits, 2010; Nørgaard, Ehrenstein, Nielsen, Bakkevig, & Sørensen, 2012; Sun, Vestergaard, Christensen, & Olsen, 2011). Allo scopo di mostrare il nesso causale tra infezioni prenatali e cambiamenti a breve e lungo termine nel sistema nervoso centrale (SNC) della prole, sono stati sviluppati diversi modelli animali detti *Maternal Immune Activation* (MIA) in roditori (Mandal et al., 2013; Reisinger et al., 2015). Tali modelli si propongono di mimare infezioni di tipo batterico e virale durante le diverse fasi della gravidanza tramite la somministrazione di agenti patogeni e/o composti in grado di attivare il sistema immunitario in maniera

specifica, costituendo un fondamentale mezzo per l'identificazione dei meccanismi alla base di tali mutamenti.

Da più di un ventennio, ed ufficialmente con la nascita della neuro-immunologia, si conosce e si studia il ruolo delle molecole infiammatorie nel SNC. La gravidanza rappresenta in questo contesto un periodo molto importante per la grande quantità e varietà di citochine alla quale sono esposti gli embrioni od i feti durante la risposta infiammatoria *i.e. cytokine storm*. Tali enormi cambiamenti possono portare ad uno squilibrio tra citochine pro- ed anti-infiammatorie e, di conseguenza, ad un'alterazione dell'essenziale ruolo fisiologico svolto da tali composti a livello del SNC durante lo sviluppo (Boksa, 2010; Knuesel et al., 2014; Zhao & Schwartz, 1998).

3 Abstract

Accumulating evidence indicate that immune deregulation or inflammation are linked to several types of psychiatric diseases (Patterson, 2009). Accordingly, perinatal infections have been associated with increased risk for neurodevelopmental disorders (Boksa, 2010; Meyer et al., 2006), including schizophrenia (Miller, Culpepper, Rapaport, & Buckley, 2013), autism (Shi, Fatemi, Sidwell, & Patterson, 2003) and epilepsy (Pineda et al., 2014). By using the POLY I:C (polyinosinic-polycytidylic acid) model of inflammation, we addressed the possibility that a single inflammatory event during pregnancy may alter neurodevelopmental processes, thus leading to neurologic disorders in the offspring.

Our results demonstrate that a single injection of POLY I:C at gestation day 9 causes higher susceptibility to kainate-induced seizures in the offspring and other behavioral aberrations. This is associated with increased permeability of the Blood-Brain Barrier (BBB), due to alterations in tight junctions, as demonstrated by a reduction of Claudin-5 expression levels. The inflammatory status of adult animals doesn't represent a susceptibility factor; only early alterations are visible.

No changes in microbiota was observed in the offspring of POLY I:C-treated mothers. Wnt/ β -catenin pathway and pericytes markers alterations are instead had found both in developmental and adult stages of POLY I:C-treated mothers offspring. Our results thus open to the possibility that inflammation during early pregnancy may increase susceptibility to psychiatric diseases and epilepsy by interfering with normal brain vascularization and BBB formation.

4 Introduzione

4.1 Infezioni prenatali ed il modello MIA

4.1.1 Infezioni nella gestante

La gravidanza dei mammiferi pone ardue sfide al sistema immunitario della gestante; affinché l'impianto della blastocisti a livello dell'endometrio ed il processo di placentazione avvengano correttamente è infatti necessario instaurare uno stato di tolleranza immunologica da parte della gestante rispetto al feto semi-allogenico. Al contempo, patogeni di vario tipo, possono raggiungere il compartimento feto-placentale attraverso il torrente circolatorio o risalendo il tratto genitale; anche in condizioni fisiologiche ed in assenza di correlati patologici, il fluido amniotico e le membrane fetali non sono sterili (Krishnan, Nguyen, & McComb, 2013).

Più di un secolo fa, un tentativo di trasfusione feto-feto in gemelli dizigoti permise di riconoscere l'esistenza della tolleranza immunologica durante la gravidanza (Owen, 1945), ponendosi quale punto di partenza nella comprensione dei processi immunologici che avvengono durante la gestazione.

4.1.2 Studi epidemiologici

Fattori ambientali quali stress materno, deficienze nutrizionali ed infezioni prenatali o perinatali sono ormai riconosciuti come agenti facilitanti l'insorgenza di patologie neurologiche nel nascituro (Ibi & Yamada, 2015). Molti studi epidemiologici, che complessivamente hanno preso in esame tra gli 86'000 ed i 124'000 bambini, hanno confermato che infezioni causate da differenti patogeni quali virus, batteri e parassiti protozoi, sono correlate con l'aumentato rischio di insorgenza di disordini del neurosviluppo inclusi schizofrenia, epilessia e disordini dello spettro autistico oltre che a patologie neurodegenerative e dell'anziano come morbo di Alzheimer, Parkinson e diverse forme di demenza ([FIGURA 1](#)). Questo gruppo di patologie è caratterizzato da un'insorgenza tardiva, solitamente postpuberale.

Processi infiammatori che si verificano nella gestante possono quindi avere effetti deleteri sullo sviluppo del cervello del nascituro proprio poiché esso si trova in un momento particolarmente vulnerabile, il suo sviluppo. Sono l'intensità dello stimolo, tempi, modalità

di esposizione e la natura stessa dello stimolo infiammatorio, insieme alla predisposizione genetica, a definire il *cluster* di sintomi e quindi il fenotipo del disordine neurologico a cui il nascituro può andare incontro.

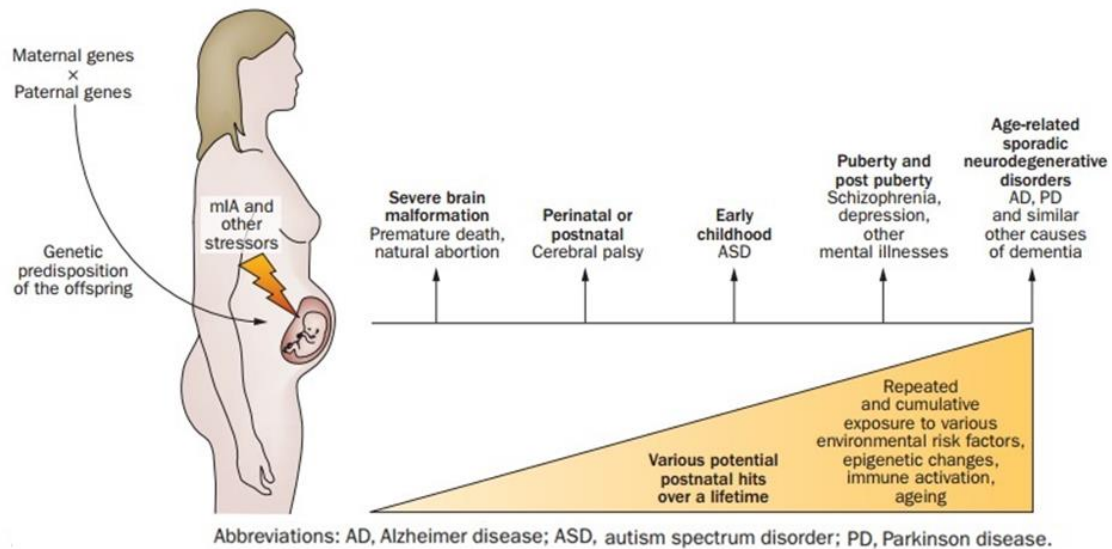


FIGURA 1 – POSSIBILE CATENA DI EVENTI A SEGUITO DI MIA (KNUESEL ET AL., 2014)

Per quanto riguarda la schizofrenia, sin dai primi anni 50 del novecento vi sono studi che documentano una specifica associazione tra infezioni da virus influenzale contratte in gravidanza ed un aumentato numero di casi di schizofrenia nei figli. Una analisi retrospettiva su sieri prelevati a donne i cui figli sono risultati affetti da tale patologia, ha mostrato come queste presentassero in gravidanza livelli di anticorpi anti-influezzali e di citochine proinfiammatorie aumentati (Brown et al., 2004). Proprio a studi di questo tipo si è potuto stimare che il 14-21% dei casi totali di schizofrenia sarebbero evitabili se si riuscisse a prevenire l'infezione a livello materno (Penner & Brown, 2007). Il virus influenzale non è però l'unico agente infettivo a presentare forti correlazioni; numerosi altri studi hanno vagliato differenti patogeni constatando una relazione tra infiammazione e schizofrenia piuttosto che con un tipo particolare di patogeno (Patterson, 2007; Sørensen, Mortensen, Reinisch, & Mednick, 2009). Questo dato è ulteriormente rafforzato dalla relazione tra episodi febbrili nella gestante ed aumentata insorgenza di crisi epilettiche nella prole (Sun, Vestergaard, Christensen, Nahmias, & Olsen, 2008).

La vaccinazione contro l'influenza stagionale è attualmente raccomandata in donne che prevedono di avere una gravidanza a breve termine o che siano incinte; sono però limitati i

dati sull'incidenza di patologie del neurosviluppo nella prole di donne che si sottopongono a tale procedura (O'Grady et al., 2014).

4.1.3 Riprogrammare lo sviluppo cerebrale

Le connessioni tra corteccia prefrontale e sistema limbico sono particolarmente importanti nel determinare il comportamento. Tali connessioni possono essere modificate nel nascituro da periodi di aumentato stress materno durante la gravidanza; alcuni autori spiegano questo fenomeno come una risposta compensatoria, affermando che tali mutamenti intenderebbero predisporre il cervello del nascituro alla gestione di un ambiente difficile e quindi stressante. Se però, l'ambiente in cui il nascituro si trova a vivere, non corrisponde a tale aspettativa, si possono verificare disturbi quali ADHD (Attention-Deficit - Hyperactivity Disorder) e schizofrenia dovuti in parte ad aumentati livelli di CRF (Corticotropin-Releasing Factor) nell'amigdala ed una ridotta espressione di recettori glucocorticoidi a livello ipocampale (Bale, 2015; Rodgers, Morgan, Leu, & Bale, 2015).

Molte delle alterazioni riscontrate in casi di MIA, hanno alla base processi epigenetici; questi possono interessare promotori di specifici geni o interni circuiti/assi. Si ritiene attualmente che modifiche epigenetiche siano alla base dell'effetto a lungo termine della riprogrammazione somatica in utero (FIGURA 2A).

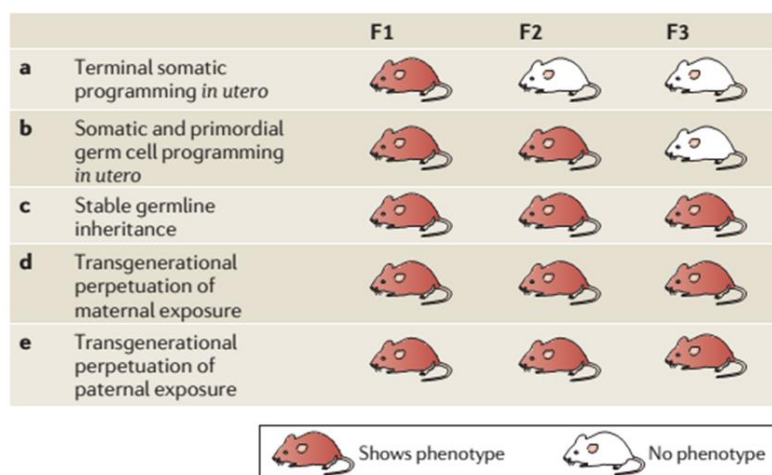


FIGURA 2 – MODALITÀ DI TRASMISSIONE DEI CARATTERI EPIGENETICI (BALE, 2015)

Maggiormente complessi sono invece i fenomeni di riprogrammazione delle cellule della linea germinale in utero o della riprogrammazione epigenetica dovuta all'influenza materna e/o paterna, che possono esitare in complicanze a livello transgenerazionale, ovvero

perdurare nella discendenza per molte generazioni senza bisogno di riesposizione all'evento scatenante (FIGURA 2). Un esempio concreto dell'influenza materna è osservabile attraverso comportamenti come il *grooming* nei roditori ed altri atteggiamenti tipici della sfera delle cure parentali, i quali sono in grado di modificare fortemente il neurosviluppo. Tali comportamenti sono influenzati da processi cerebrali sottoposti a controllo epigenetico e possono quindi essere soggetti a modificazioni a seguito di MIA con provate ripercussioni su molte generazioni (FIGURA 3B) (Bale, 2015; Danchin et al., 2011; Dias & Ressler, 2014).

Insulti che occorrono durante i periodi prenatali e/o perinatali possono rappresentare semplicemente un primo *hit* per il cervello, il quale sarà più o meno responsivo a futuri stimoli, esitando solo in ultimo un fenotipo patologico conclamato.

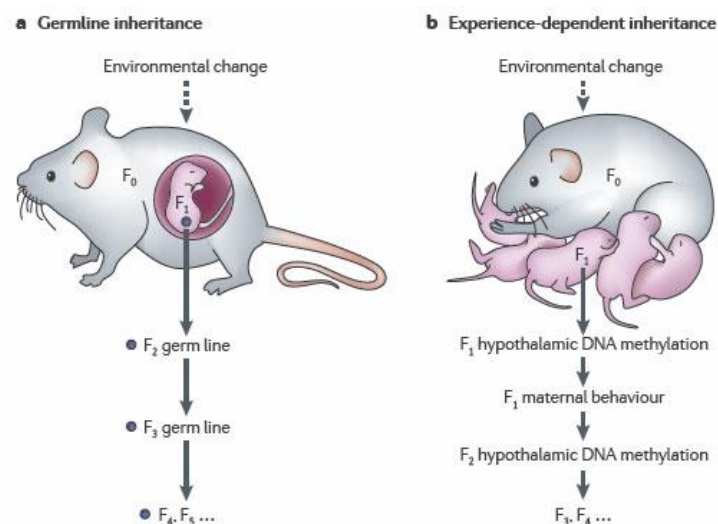


FIGURA 3 – SCHEMA ESEMPLIFICATIVO DI TRASMISSIONE EPIGENETICA PER VIA GERMINALE ED ESPERIENZA-DIPENDENTE (DANCHIN ET AL., 2011)

4.1.4 Modelli di MIA

L'esigenza di uno studio sistematico dei processi alla base del MIA ha dato vita a numerosi esperimenti su modelli animali, i quali, hanno previsto l'utilizzo di batteri normalmente patogeni per l'uomo e noti per dare complicanze associate alla gestazione. Tra i batteri maggiormente studiati vi sono: *Corynebacterium diphtheriae*, *Plasmodium falciparum* (l'agente eziologico della malaria), *Toxoplasma gondii*, *Salmonella enterica*, in grado di causare aborti spontanei, morte neonatale e di trasmettersi verticalmente alla prole e *Listeria monocytogenes*, il quale ha permesso di capire che animali gravidi rispondono con

una maggiore produzione di IL6, una citochina proinfiammatoria, ad infezioni di questo batterio rispetto ad animali dello stesso sesso non accoppiati (Krishnan et al., 2013).

I modelli di infezioni virali non sono altrettanto numerosi; diversi studi hanno valutato l'azione del virus responsabile del morbillo (*Paramyxovirus*), il poliovirus, l'herpes virus di tipo 2 e del virione dell'influenza; particolare attenzione è stata dedicata dai ricercatori proprio a quest'ultimo poiché sono noti da tempo gli effetti, per numero e gravità di patologie nella prole, di infezioni influenzali in donne gravide. Studi condotti su roditori con l'utilizzo di infezioni prenatali tramite il virus umano dell'influenza hanno dimostrato ormai in maniera convincente e riproducibile la presenza di cambiamenti a lungo termine nel sistema nervoso della prole di donne esposte ad infiammazione in gravidanza (Jamieson, Rasmussen, Uyeki, & Weinbaum, 2011; Pazos, Sperling, Moran, & Kraus, 2012).

Più recentemente si sono diffusi modelli animali di infiammazione ottenuta per mezzo di agonisti dei recettori dell'immunità innata TLR o direttamente attraverso la somministrazione di citochine pro-infiammatorie (FIGURA 4) (Ashdown et al., 2006; Krishnan et al., 2013). Tali modelli "semplificati" stanno permettendo uno studio ancor più diretto dei meccanismi molecolari alla base delle modificazioni a lungo termine nella prole sottoposta a MIA. Questi offrono infatti la possibilità di effettuare studi dose-risposta e tempo-dipendenti, grazie all'effetto limitato, generalmente 24-48 ore, dell'azione infiammatoria degli agonisti dei TLR (Cunningham, Campion, Teeling, Felton, & Perry, 2007; Shi et al., 2003). Oltre a ciò, va aggiunto che sostanze quali LPS e POLY-I:C, due dei principali agonisti dei TLR utilizzati, possono essere maneggiati dagli sperimentatori in sicurezza senza particolari precauzioni. Ogni modello MIA deve possedere essenzialmente tre caratteristiche: *face validity* – ovvero presentare nell'animale segni patologici simili a quelli riscontrabili nelle patologie umane, *construct validity* – ovvero possedere un'eziologia simile alla patologia umana e *predictive validity* – ovvero rispondere a trattamenti efficaci nell'uomo (Crawley, 2007).

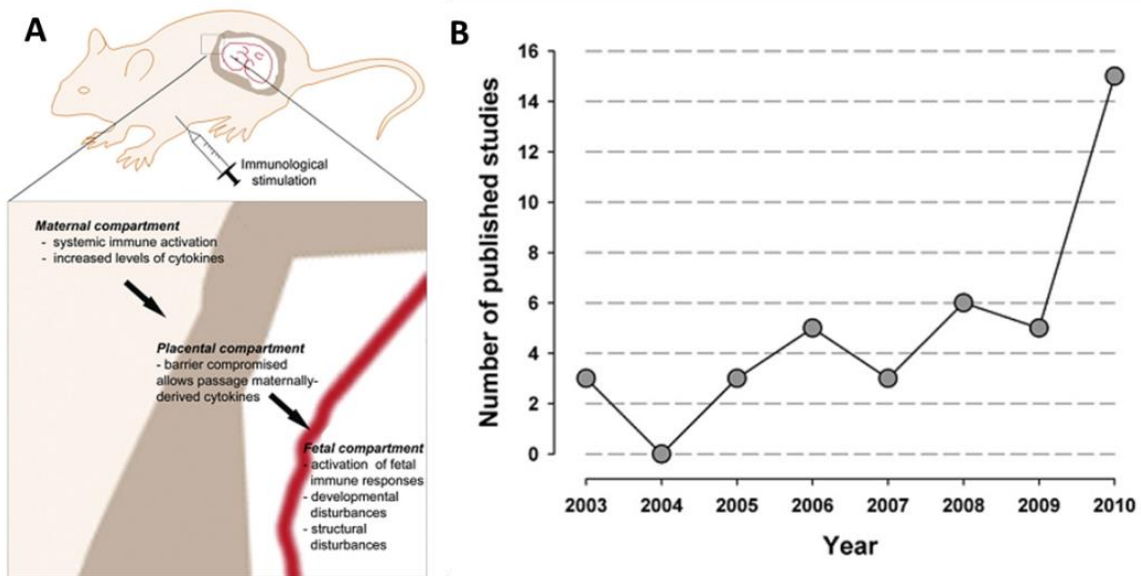


FIGURA 4 – A) POSSIBILE CATENA DI EVENTI NEI MODELLI MIA (REISINGER ET AL., 2015) B) NUMERO DI PUBBLICAZIONI CHE UTILIZZANO IN MODELLO MIA CON POLY-IC DAL 2003 AL 2010 (MEYER & FELDON, 2012)

4.1.5 Composti infiammatori

La somministrazione di POLY-I:C è riconosciuta ed accettata quale modello di infezione virale in gravidanza (Ashdown et al., 2006; Boksa, 2010). Il POLY I:C (polyinosinic-polycytidylic acid) è un analogo sintetico dell'RNA a doppio filamento normalmente prodotto durante le infezioni virali a seguito della replicazione dell'ssRNA od in seguito alla trascrizione del DNA virale. Il POLY I:C è in grado di agire da agonista del recettore dell'immunità innata TLR3. Tra i più importanti mediatori dell'azione del POLY I:C vi sono IL1 β , IL6, TNF α ed IFN β ; effettori chiave della risposta immunitaria periferica e principali mediatori delle risposte cerebrali ad infezioni ed infiammazione (Aderem & Ulevitch, 2000; Dantzer & Wollman, 2003). L'utilizzo di agenti infiammatori sintetici ha permesso di dimostrare che è la risposta infiammatoria, e non il virus per se, il responsabile dei cambiamenti patologici osservabili nella prole.

4.1.6 Periodo gestazionale

Durante l'embriogenesi la formazione del sistema nervoso è regolata da una serie di processi scanditi su base temporale atti a scolpire le funzioni dei circuiti neurali essenziali e critici per i processi cognitivi, motori, per lo sviluppo emozionale etc. Questi eventi comprendono ma non si limitano alla neurogenesi, alla crescita assonale e dell'albero

dendritico, alla sinaptogenesi, ed al rimodellamento delle sinapsi tramite *pruning*. L'intera gamma di processi ha inizio *in utero* per continuare e perfezionarsi durante le immediate fasi neonatali. Alterazioni di questi processi possono portare a gravi conseguenze per lo sviluppo cerebrale della prole.

Numerosi studi hanno identificato il periodo che intercorre tra la fine del primo ed il secondo trimestre come critico per l'esposizione ad influenza ed altre infezioni virali in grado di favorire lo sviluppo in età post-puberale di patologie neuropsichiatriche (Boksa, 2010). Un esempio concreto è stato lo studio di registri come il "Danish medical birth register"; il quale ha evidenziato come infezioni materne, risultanti in una ospedalizzazione, contratte durante il primo trimestre, ma non durante il terzo trimestre di gravidanza, siano risultate in un' aumentata incidenza di sindromi dello spettro autistico nella prole fino a 3 volte rispetto alla popolazione generale (Bale, 2015). La fase gestazionale in cui viene applicato il modello MIA è determinante rispetto all'esito patologico poiché ogni periodo è contraddistinto da particolari processi volti, nel complesso, alla maturazione del SNC (FIGURA 5).

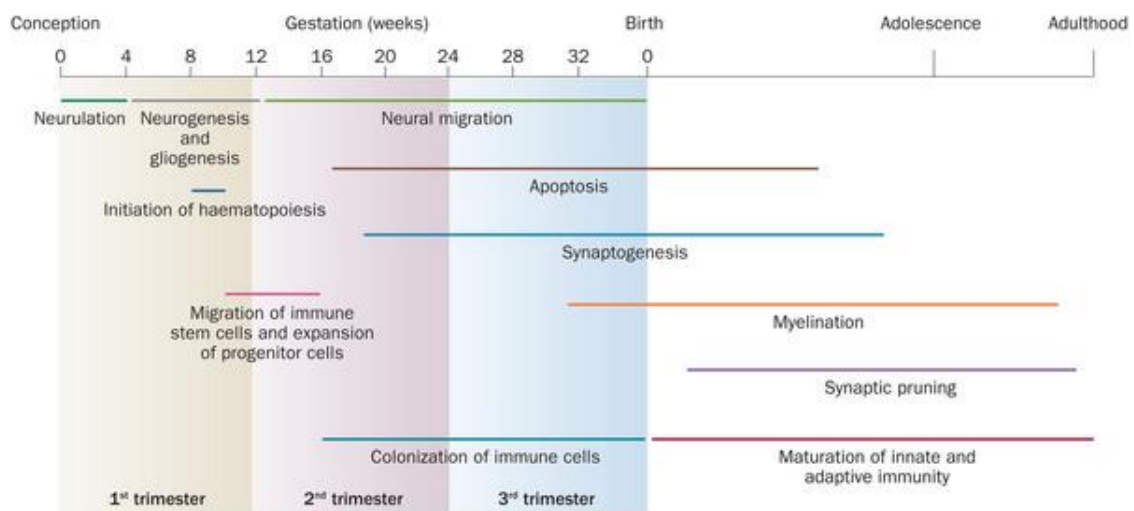


FIGURA 5 – TIMELINE DELLO SVILUPPO NEUROLOGICO UMANO (KNUESEL ET AL., 2014)

La gestazione del topo dura in media 19-21 giorni dal giorno uno, identificato come il giorno di formazione del *plug* vaginale. Alcune risposte anomale a protocolli di condizionamento classico quali il *prepulse inhibition* ed il *latent inhibition*, segni associati a patologie come la schizofrenia, si manifestano preferenzialmente a seguito di esposizione delle gestanti con

POLY-I:C alla fine del primo trimestre di gravidanza. Difetti della flessibilità cognitiva sono invece comuni in soggetti esposti a MIA durante il terzo trimestre di gravidanza (Meyer, 2013).

4.2 I recettori Toll

4.2.1 Scoperta dei recettori Toll e Toll-like

Oltre 25 anni fa Janeway (Janeway, 1989) ipotizzò l'esistenza di recettori dell'immunità innata in grado di riconoscere i patogeni attraverso motivi molecolari altamente conservati - PRR (Pattern Recognition Receptor). Solo dopo il 1996 si ebbe conferma dell'esistenza di tali recettori grazie all'identificazione del *knock-out* (KO) per Toll in *Drosophila*; tali mutanti sono preda di infezioni fungine (FIGURA 6) (K. V. Anderson, Bokla, & Nüsslein-Volhard, 1985; Lemaitre, Nicolas, Michaut, Reichhart, & Hoffmann, 1996). Sempre grazie all'utilizzo del moscerino della frutta si identificarono i principali protagonisti del *pathway* di Toll ovvero Dorsal, Cactus e Pelle (Yamamoto & Takeda, 2010).

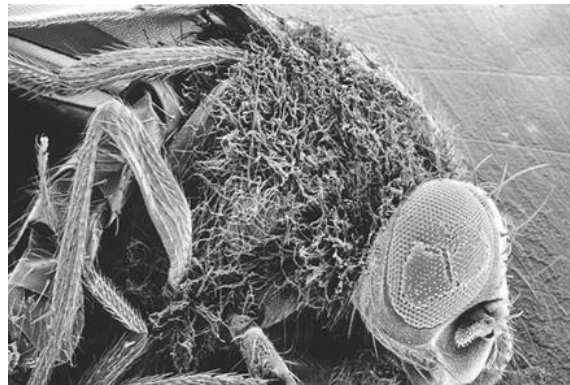


FIGURA 6 – DROSOPHILA TOLL-KO AFFETTA DA ASPERGILLUS FUMIGANTUS (LEMAITRE ET AL., 1996)

Nel 1991 fu pubblicata la sequenza citoplasmatica del IL-1R – recettore dell'interleuchina uno nei mammiferi. Le similitudini riscontrate tra la sequenza di questo recettore ed il già noto Toll, indussero la comunità scientifica a considerare l'IL-1R l'ortologo di Toll nei mammiferi. Successivamente alla scoperta dei reali ortologi del recettore Toll nei mammiferi, i recettori TLR (Toll Like Receptor), si dimostrò che sia i TLR sia l'IL-1R possiedono un dominio citoplasmatico altamente conservato ora noto come dominio TIR (Toll-IL-1R).

4.2.2 Struttura dei TLR

I TLR sono glicoproteine trans-membrana di tipo 1 le quali possiedono tre domini principali: un dominio extracellulare ricco in leucine, un dominio trans-membrana ed un dominio TIR citoplasmatico (FIGURA 7). Il riconoscimento dei ligandi avviene ad opera del dominio extracellulare il quale è costituito da 16-28 motivi LRR (leucine rich repeat) contenenti un motivo altamente conservato “LxxLxLxxN” ed una parte variabile (Jin & Lee, 2008; Kumar, Kawai, & Akira, 2009).

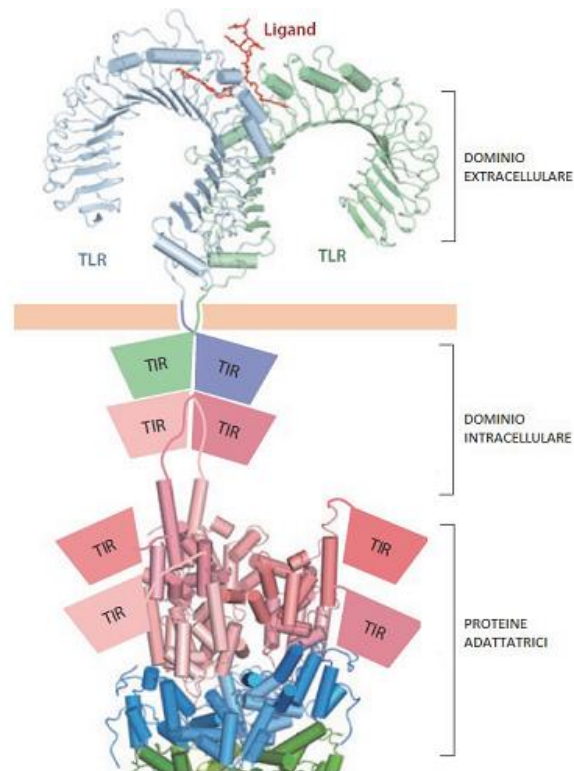


FIGURA 7 – STRUTTURA DEI TLR – IMMAGINE MODIFICATA (KANG & LEE, 2011)

Poiché vi è un piccolo numero di recettori dell'immunità innata a fronte di un numero virtualmente illimitato di ligandi patogeni, questi recettori non possono essere troppo restrittivi nella loro specificità, è stato quindi proposto che i TLR riconoscano pattern altamente conservati e condivisi dai patogeni detti PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns).

La famiglia dei TLR può essere divisa in membri a localizzazione di membrana ed intracellulare. Della prima categoria fanno parte i TLR1, 2, 4, 5, 6 ed 11, mentre i TLR3, 7, 8 e 9 sono espressi a livello intracellulare e nello specifico lungo la membrana del reticolo

endoplasmatico, dalla quale, dopo l'attivazione, si spostano ai compartimenti endosomiale e lisosomiale per mezzo della proteina trans-membrana Unc93b (Tabeta et al., 2006).

4.2.3 Proteine adattatrici

Le proteine adattatrici sono responsabili della specificità delle risposte dei TLR. Esse, come i TLR, contengono domini TIR; non sorprende quindi che l'interazione TIR-TIR, recettore-recettore, recettore-adattatore ed adattatore-adattatore sia fondamentale e critica per l'attivazione del *signaling*. Ad oggi si conoscono cinque proteine adattatrici: MyD88, MAL o TIRAP, TRIF, TRAM e SARM (Jin & Lee, 2008; Yuan et al., 2010). La proteina MyD88 (Myeloid Differentiation Response Gene 88), la prima ad essere stata scoperta, media il *signaling* di tutti i TLR ad eccezione del TLR3. MyD88, quando reclutato da TLR4 e TLR2, si assembla a MAL portando all'attivazione di NFkB e delle MAPK. L'adattatore TRIF è specifico per i TLR3 e 4 e porta all'attivazione dei fattori di trascrizione NFkB, IRF3 ed IRF7. L'adattatore TRAM, associato a TRIF, è essenziale per il *signaling* del TLR4. Il quinto ed ultimo adattatore, SARM, è l'unico ad essersi conservato attraverso i *phyla* da *C. elegans* ai mammiferi (Yuan et al., 2010).

4.2.4 Ligandi

I ligandi più conosciuti dei recettori TLR appartengono alla classe delle molecole microbiche e dei virus patogeni. Strutture di natura lipidica sono classicamente riconosciute dal recettore del TLR2 (in combinazione con TLR1 e 6) e dal TLR4 in forma omodimerica. Lo stesso TLR4 è inoltre in grado di formare eterodimeri con MD-2, i quali sono attivati dal lipopolisaccaride LPS; un componente della parete dei batteri gram negativi. I TLR3, 7, 8 e 9 a localizzazione intracellulare, riconoscono vari tipi di acidi nucleici e rispettivamente dsRNA, ssRNA (TLR7 ed 8) e dsDNA. Il TLR5 riconosce la proteina batterica flagellina, maggior costituente dei flagelli, ovvero delle appendici cellulari lunghe e sottili che permettono la motilità di numerosi batteri (Kang & Lee, 2011).

Oltre ai ligandi esogeni, già menzionati, vi sono molti ligandi endogeni che i TLR sono in grado di riconoscere. Una sottoclasse di tali ligandi prende il nome di DAMP (Damage Associated Molecular Pattern). Ai DAMP appartengono molecole citosoliche e nucleari rilasciate dalla cellula in condizioni di stress, necrosi o danno come acidi ialuronici a basso peso molecolare, fibronectina, β -defensina, eparansolfati ed HSP (Heat Shock Proteins). Gli

esiti dell'interazione tra TLR e DAMP, piuttosto che PAMP, suggerisce una risposta differenziata e coerente con il tipo di ligando (Okun, Griffioen, & Mattson, 2011).

4.2.5 I TLR e l'evoluzione

La conservazione lungo i *phyla* dei TLR suggerisce che una risposta immunitaria appropriata è fondamentale per la sopravvivenza e che la conquista di tale risposta debba essere avvenuta in un periodo precedente al mesozoico (Johnson, Brunn, Tang, & Platt, 2003). I TLR esemplificano il concetto, noto in biologia, che la stessa proteina possa acquisire diversi ruoli durante l'evoluzione (FIGURA 8). È infatti certo che molti dei geni che in *Drosophila* presiedono al *signaling* ventralizzante durante l'embriogenesi della larva (si conoscono 12 geni detti del "gruppo dorsale"), sono stati persi dai mammiferi o hanno acquisito in questi funzioni differenti. Ad esempio Gd, il primo enzima della cascata proteolitica conseguente all'attivazione di Toll in *Drosophila*, possiede una forte somiglianza con il gene protrombina dei mammiferi. Snake ed Easter, i successivi mediatori della medesima cascata, possiedono rispettivamente caratteristiche simili a callicreina (enzima proteolitico di origine plasmatica) ed al fattore C1 del complemento (Beutler & Poltorak, 2001).

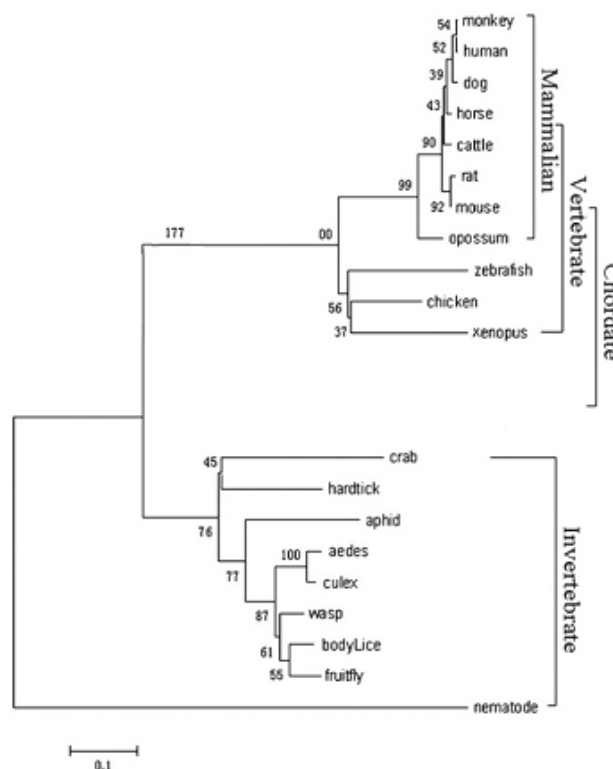


FIGURA 8 – ALBERO FILOGENETICO DI TOLL – IMMAGINE MODIFICATA (YUAN ET AL., 2010)

4.2.6 I TLR ed il sistema nervoso

L'organismo modello che ha permesso di comprendere per primo i meccanismi che regolano lo sviluppo embrionale a livello molecolare è certamente *Drosophila*. Su questo animale sono stati condotti numerosi esperimenti che hanno posto in evidenza il ruolo di Toll nella formazione del sistema nervoso (FIGURA 9). Per citare i più rilevanti, Rose e colleghi (Rose et al., 1997) hanno dimostrato che l'espressione di Toll a livello della muscolatura inibisce localmente i coni di crescita dei motoneuroni RP3, mentre il lavoro di Ritzenthaler e Chiba (Ritzenthaler & Chiba, 2003) dimostra che un'alterata espressione di Toll è sufficiente a modificare i target di riconoscimento tra muscoli e motoneuroni.

Per quanto riguarda i mammiferi sono molto recenti gli studi che hanno individuato l'espressione dei TLR a livello del sistema nervoso, rilevando l'espressione di alcuni TLR, come il TLR2 e 4 in neuroni della regione ippocampale (Rolls et al., 2007) oltre che in cellule della glia.

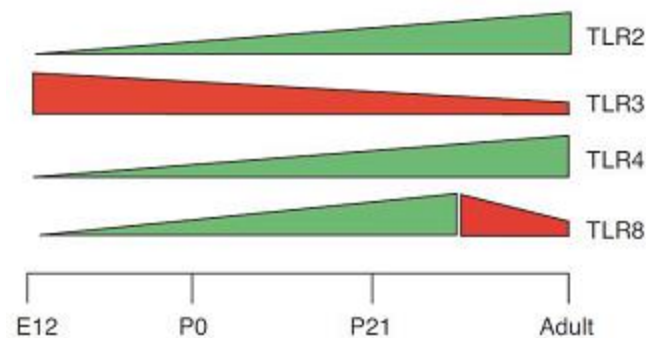


FIGURA 9 – PATTERN DI ESPRESSIONE DEI TLR NEL SNC DURANTE LO SVILUPPO DEL TOPO (OKUN ET AL., 2011)

Gli effetti dei TLR a livello del sistema nervoso ed il loro ruolo nello sviluppo dei circuiti neurali nei mammiferi è ancora fortemente dibattuto. Topi TLR2-KO possiedono un basso numero di neuroni esprimenti marker neuronali precoci quali doublecortin e TUBB3 con un aumentato differenziamento in senso astrocitario. Al contrario topi TLR4-KO possiedono un aumentato differenziamento in senso neuronale con una riduzione solo marginale di astroцитi (Rolls et al., 2007). Nel 2007 Cameron e collaboratori (Cameron et al., 2007) riportano per la prima volta l'espressione del recettore TLR3 a livello del cono di crescita di neuroni di topo ed attraverso una marcatura per F-actina, dimostrano il collasso del cono di crescita in seguito a stimolazione con POLY I:C, un'agonista del TLR3 analogo sintetico dell'RNA a doppio filamento.

4.3 Epilessia

4.3.1 Classificazione medica e segni

Le epilessie raggruppano un ampio spettro di patologie con differente eziologia caratterizzate ad un disordine neurologico cronico che si manifesta con crisi convulsivanti. I neuroni generano fisiologicamente correnti elettriche utilizzate per trasmettere segnali a grande distanza attraverso i quali regolano l'attività di ghiandole e muscoli oltre a ricevere informazioni sensoriali da tutto il corpo elaborate a diversi livelli del SNC. Durante una crisi epilettica molti neuroni producono una scarica elettrica sincrona, generando movimenti involontari, sensazioni ed emozioni inconsuete oltre a temporanee anomalie nell'attività della rete neuronale.

Come detto, esistono molti tipi di epilessia ed altrettanto varie sono le modalità in cui la patologia si manifesta. Si definisce epilettica una persona che abbia esperito almeno due crisi epilettiche non provocate con un intervallo maggiore alle 24 ore poiché crisi epilettiche si possono manifestare anche in seguito a stati febbrili, infezioni del sistema nervoso, traumi acuti o fluttuazioni dei livelli ematici di elettroliti.

4.3.2 Eziologia

Oltre 450'000 bambini ed adolescenti soffrono attualmente di epilessia nei soli Stati Uniti d'America, mentre ne è colpito più del'1% della popolazione mondiale, con un incremento di 150'000 diagnosi all'anno previsto (Fridley, Thomas, Navarro, & Yoskor, 2012; Pitkänen & Sutula, 2002). L'epilessia colpisce ambo i sessi ed indistintamente persone appartenenti a differenti etnie e fasce di età. Sebbene attualmente la maggior parte dei pazienti può beneficiare di cure farmacologiche o chirurgiche efficaci, circa il 30% dei soggetti affetti non risponde alle terapie canoniche (Berkovic, Mulley, Scheffer, & Petrou, 2006). Ad oggi oltre il 50% dei casi di epilessia è considerata idiopatica o primaria, ovvero non se ne conosce la causa. Nei restanti casi, sindromi secondarie o sintomatiche, la patologia può essere connessa a fattori genetici, difetti del neurosviluppo, infezioni, eventi traumatici, *stroke* o tumori cerebrali. Questi eventi possono portare alla patologia con periodi di latenza fino a 10 anni (O'Dell, Das, Wallace, Ray, & Banik, 2012).

4.3.3 Fattori molecolari

L'epilessia può essere l'esito di un'alterazione tra segnali eccitatori ed inibitori a livello cerebrale. A livello del singolo neurone, appartenente al focolaio epilettico, si verifica una risposta sincronizzata detta onda di depolarizzazione parossistica (ODP). Tale onda consiste di una rapida ed ampia depolarizzazione (20-40 mV) con un treno di potenziali d'azione ed una iperpolarizzazione a seguire; l'intero fenomeno ha una durata di circa 50-200 ms. Le proprietà dell'ODP dipendono in gran parte dalle caratteristiche intrinseche del neurilemma, ovvero da canali voltaggio-dipendenti ed afferenze sinaptiche inibitorie ed eccitatorie (Noebels, 2003). ODP prolungate e ripetute vengono quindi trasmesse a regioni cerebrali adiacenti e lontane tramite le vie talamo-corticali (Avanzini, 2003).

4.3.4 L'epilessia nei MIA

Come per schizofrenia e disordini dello spettro autistico, la prevalenza di epilessia in soggetti esposti ad infiammazione durante il periodo gestazionale materno è notevolmente aumentata; a questo si aggiunge dal 20 al 46% di bambini con sindromi dello spettro autistico, i quali presentano episodi epilettici sporadici durante la vita adulta. Ovvero con un *rate* 10 volte maggiore rispetto alla popolazione generale (Azmitia, Saccomano, Alzoobae, Boldrini, & Whitaker-Azmitia, 2015; Knuesel et al., 2014).

4.3.5 Disfunzioni della barriera emato-encefalica

Sin dagli anni ottanta è stata individuata la correlazione tra *deficit* della BEE ed episodi epilettici. Fino a pochi anni fa questa constatazione era effettuata su pazienti già affetti da epilessia e quindi trattata come epifenomeno della patologia. Solo recentemente è stato dimostrato come il calo nell'espressione delle *tight junctions*, una delle componenti molecolari essenziali della BEE, ed il conseguente aumento di immunoglobuline ed albumina all'interno del parenchima cerebrale può causare l'insorgere di crisi epilettiche (Friedman, Kaufer, & Heinemann, 2009; Ivens, Gabriel, Greenberg, Friedman, & Shelef, 2010). La rottura della BEE può avere gravi conseguenze e recenti studi *in vivo* hanno mostrato come la temporanea assenza della BEE, conseguita tramite l'applicazione focale di sali biliari a livello della neocorteccia, risulta, a distanza di giorni o settimane, in attività epilettiformi iper-sincronizzate (Seiffert et al., 2004).

Il danneggiamento della barriera ematoencefalica è un fenotipo comune a molte patologie neurologiche come *stroke*, meningiti e traumi. L'aumentata permeabilità della BEE è solitamente la conseguenza di un insulto, ma al tempo stesso alterazioni della permeabilità possono causare l'ingresso massivo di proteine neurotossiche come immunoglobuline, trombina e fibrina; entrate in contatto con il parenchima cerebrale queste portano a produzione di ROS ed infiammazione. Questa ipotesi, che vede BEE ed epilessia strettamente legate, si dimostra sempre più attraente (FIGURA 10). Fenomeni infiammatori che si svolgono durante il periodo dell'embriogenesi potrebbero giocare un ruolo molto importante nell'insorgenza di patologie neurologiche. La causa principale potrebbe risiedere nella massiva morte di cellule dell'unità neurovascolare durante periodi particolarmente suscettibili dello sviluppo cerebrale o alterazioni a lungo termine dei vasi sanguigni e delle funzioni della barriera emato-encefalica che, come anticipato, possono rendere il cervello maggiormente esposto a farmaci, sostanze neurotossiche così come ai normali fenomeni alla base dell'invecchiamento (Stolp & Dziegielewska, 2009).

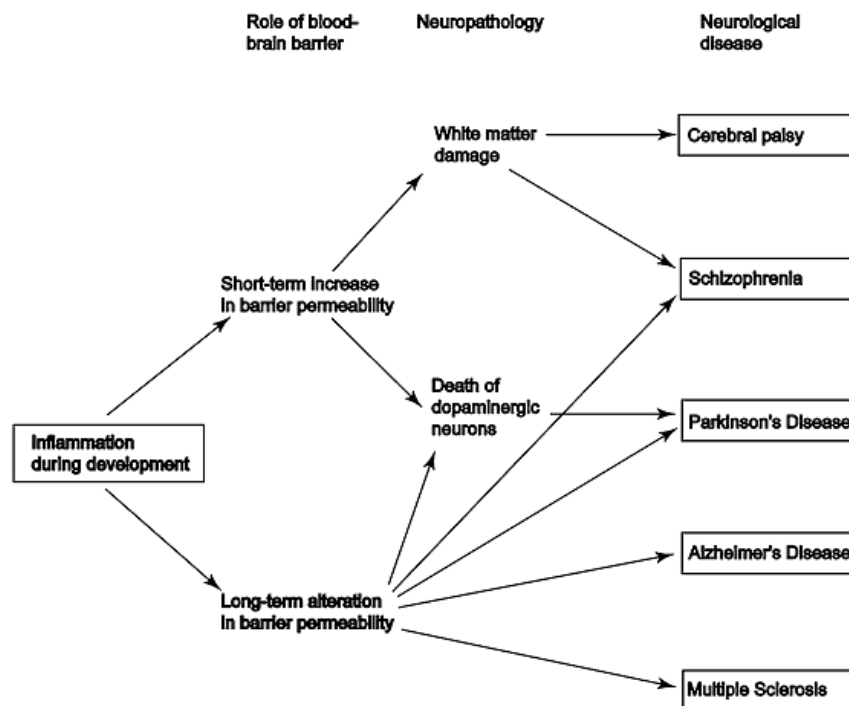


FIGURA 10 – IPOTESI DI DANNO ALLA BEE DOVUTA A PROCESSI INFIAMMATORI DURANTE I PRIMI STADI DELLO SVILUPPO EMBRIONALE (STOLP & DZIEGIELEWSKA, 2009)

4.4 L'unità neuro-vascolare e lo sviluppo del sistema nervoso

Il cervello costituisce appena il 2% della massa corporea ma riceve più del 20% della gittata cardiaca; questo enorme volume ematico è distribuito lungo 100 bilioni di vasi, ovvero possediamo nel nostro proencefalo un vaso sanguigno per ogni neurone. Il ruolo principale dei vasi è quello di trasportare l'ossigeno ed i nutrienti ai vari organi; tessuti ipossici innescano un potente stimolo di neo-vascolarizzazione. Le funzioni fisiologiche dei vasi sanguigni si estendono però al di là di questi ruoli; ad esempio, studi recenti indicano le cellule endoteliali, cellule proprie dei vasi sanguigni, come cellule capaci di rilasciare fattori angiocricini in grado di modulare lo sviluppo neuronale e promuovere processi riparativi a livello del SNC (Quaeghebeur, Lange, & Carmeliet, 2011).

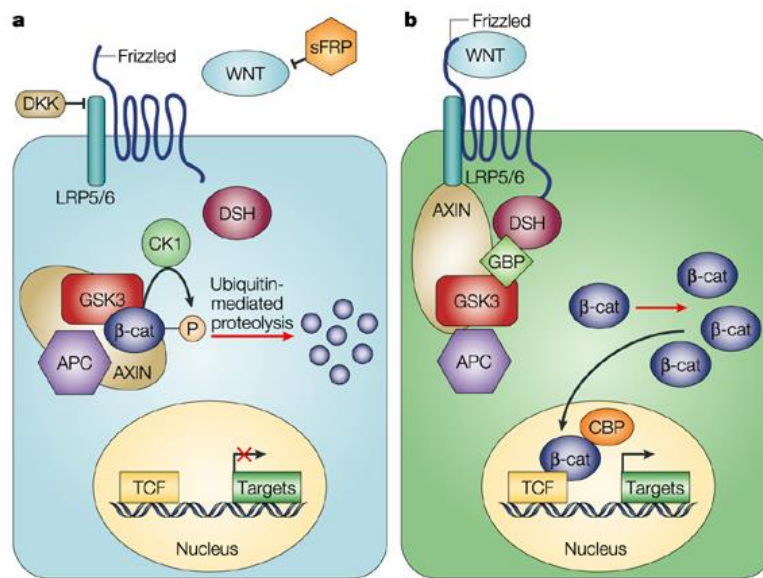
4.4.1 Vasculogenesi ed angiogenesi

Due meccanismi distinti portano alla formazione della rete vascolare a livello dell'embrione. La vascolarizzazione del SNC ha inizio a GD9/E9 tramite la vasculogenesi a partire dal plesso vascolare perineurale; lo stesso processo dà inizio alla vascolarizzazione del sacco vitellino. Una seconda fase è dovuta all'azione di un processo chiamato angiogenesi, ovvero all'invasione del tubo neurale da parte di nuovi rami vascolari. Mentre la vasculogenesi si riferisce alla crescita dei vasi sanguigni dagli emangioblasti, cellule derivate dai mesoderma, l'angiogenesi comprende due meccanismi: lo *sprouting*, ovvero la diffusione delle cellule endoteliali e lo *splitting*, ovvero la crescita della micro-vascolarizzazione tramite intussuscezione, in altre parole, la formazione di un nuovo vaso sanguigno dalla scissione di un vaso preesistente (Patan, 2004).

I vasi peri-ventricolari, all'interno del telencefalo, crescono seguendo un gradiente ventro-dorsale stabilito da fattori morfogenici quali ad esempio *Dlx1/2*, *Nkx2.1* e *Pax6*. Il processo di ramificazione dei vasi è coordinato dalla migrazione collettiva delle cellule endoteliali "*stalk cell*", che andranno a formare la struttura tubiforme, guidate dalle "*tip cell*"; sono queste ultime a rispondere al VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) rilasciato dai tessuti ipossici. Una volta formato il vaso ed il suo lume è necessario che si formino forti giunzioni e che il vaso sia stabilizzato tramite la copertura da parte delle cellule murali ovvero periciti e cellule muscolari lisce; queste circondano i vasi e depositano matrice extracellulare.

4.4.2 Il pathway di Wnt nel processo di angiogenesi

Notevole importanza a livello della formazione dei vasi sanguigni del SNC è rivestita dal *pathway* Wnt/ β -catenina. Il neuroepitelio secreta ligandi di Wnt; questi si legano al complesso recettoriale Frizzled (Fzd)/Lrp5/6 stabilizzando la β -catenina (FIGURA 11). Ciò determina la traslocazione della β -catenina al nucleo con effetto sui target trascrizionali (Daneman et al., 2009). L'attivazione di Wnt, acronimo di *wingless* (*wg*), inizialmente identificato in *Drosophila*, induce il differenziamento delle cellule endoteliali promuovendo la formazione della barriera emato-encefalica. Questo *pathway* interagisce con altri segnali: VEGFR2 e Notch1, che aumentano ed esaltano l'attività di β -catenina.



Nature Reviews | Genetics

FIGURA 11 - PATHWAY CANONICO WNT/ β -CATENINA A) NON ATTIVATA B) ATTIVATA

(MOON, KOHN, DE FERRARI, & KAYKAS, 2004)

La famiglia delle proteine Wnt include 19 membri nei mammiferi e si conoscono ad oggi tre vie di segnalazione: la via canonica Wnt/ β -catenina (*canonical pathway*), la via non canonica (*non-canonical pathway*) e la via del calcio (De Ferrari & Moon, 2006; Zhang, Yuan, Wang, & Li, 2014); tutte altamente conservate a livello evolutivo. La FIGURA 11 riporta uno schema esemplificativo della via canonica. L'attivazione del *pathway* di Wnt per la corretta formazione dei vasi non è necessario solo durante il periodo dell'embriogenesi, rivestendo una notevole importanza anche nella crescita patologica dei vasi (e.g. crescita tumorale); è

ad ogni modo vero che Wnt riveste un ruolo particolarmente e selettivamente rilevante a livello del SNC durante la sua formazione. I vasi cerebrali possiedono caratteristiche peculiari rispetto a quelli periferici: diametri ristretti, molte giunzioni ed una copertura dei vasi da parte dei periciti di notevole entità. I vasi cerebrali esibiscono una ramificazione particolarmente fitta, rendendo il SNC particolarmente vulnerabile a patologie e stress vascolari. Il pathway Wnt/ β -catenina è attivo nelle cellule endoteliali a partire da E9.5 mentre la sua espressione cala dopo E15.5 per mantenersi a questo livello anche oltre la nascita. L'espressione ed attivazione del *pathway* Wnt/ β -catenina è rara nella vita adulta (Saunders, Liddel, & Dziegielewska, 2012).

4.4.3 La Barriera Emato-Encefalica

La BEE comprende i capillari cerebrali e delle strutture anatomiche a loro annesse. Questi, con un diametro medio di 3-7 μm , sono tra i più piccoli vasi dell'intero sistema vascolare. La BEE, con una superficie totale di circa 20 m^2 nell'uomo, è la terza più grande superficie corporea di scambio dopo intestino e polmoni (Pardridge, 2003a, 2003b).

Queste componenti sono alla base della funzione di filtro della BEE, la quale protegge il SNC da sostanze normalmente presenti a livello ematico, potenzialmente dannose per il parenchima cerebrale. L'esistenza di questa barriera è nota sin dal XIX secolo, quando Paul Ehrlich, microbiologo tedesco, notò che il pigmento anilina, somministrato perifericamente in animali da esperimento, non colorava il tessuto cerebrale. Poco tempo dopo Goldmann, uno dei suoi studenti, iniettando il medesimo colorante a livello epidurale, notò che solo il SNC ne risultava colorato dimostrando quindi che non esisteva una diversa affinità del colorante anilina per il tessuto nervoso, ma bensì una barriera anatomo-funzionale a livello dei vasi ematici cerebrali ([FIGURA 11](#)).

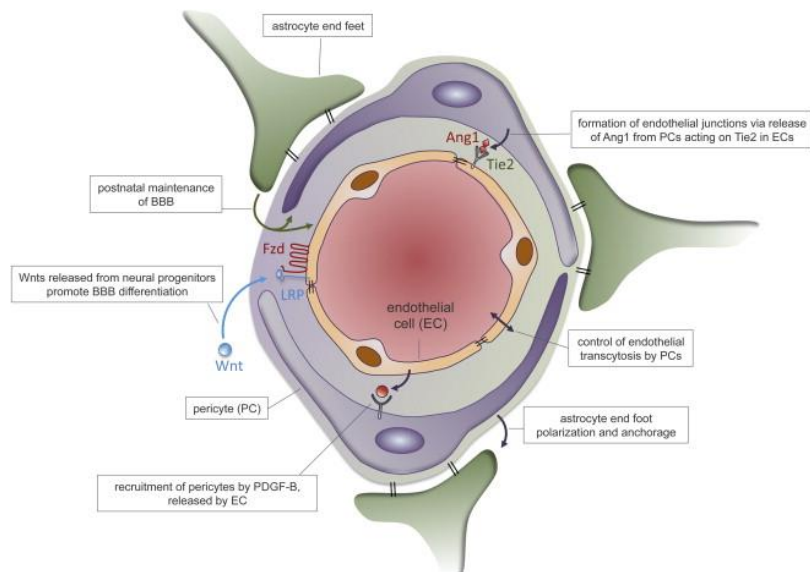


FIGURA 12 – MATURAZIONE DELLA BEE (QUAEGEBEUR ET AL., 2011)

Le cellule endoteliali dei vasi ematici a livello del SNC, diversamente dai vasi periferici, non possiedono fenestrazioni, ma sono anzi unite da giunzioni occludenti che limitano il passaggio di molte molecole idrofobe e più in generale di molecole di grande peso molecolare (>500 dalton). La presenza della BEE costituisce inoltre una barriera alla propagazione di infezioni batteriche e virali ai tessuti cerebrali; persino gli anticorpi sono molecole troppo grandi per passare questa barriera. Nel caso di infezioni cerebrali, eventi sufficientemente rari, la BEE può rispondere con una diminuzione delle sue funzioni di barriera ed un conseguente ingresso a livello cerebrale di leucociti in grado di fronteggiare l'infezione e fagocitare i detriti cellulari. Tali azioni sono regolate dalla presenza di citochine e chemochine prodotte dall'ospite (Daniels & Klein, 2015; Miner & Diamond, 2015).

Una BEE pienamente matura consiste in un complesso sistema nel quale i capillari sono coperti sul versante abluminale per il 60-80% da periciti e dalle estroflessioni degli astrociti per più dell'85%. I capillari cerebrali sono formati da singole cellule endoteliali connesse tra loro da *tight junction* intervallate da giunzioni aderenti (Liebner & Plate, 2010). Al fine di descrivere al meglio questa struttura è sempre più usato il termine "unità neurovascolare". Questa comprende le cellule endoteliali, i periciti, la microglia, gli astrociti e la membrana basale che caratterizzano la vascolatura cerebrale (Saunders et al., 2012).

4.4.4 I periciti

I periciti sono cellule dalla forma stellata le quali avvolgono ampie porzioni di capillari ponendosi in stretto contatto con le cellule endoteliali e la membrana basale. I periciti furono descritti per la prima volta da Rouget nel 1873, dal quale furono inizialmente chiamati cellule di Rouget; cambiarono nome in “periciti” nel 1923, questo nome fu scelto per la loro caratteristica localizzazione nello spazio perivascolare dei vasi ematici cerebrali (EIAli, Thériault, & Rivest, 2014).

Le cellule endoteliali secernono PDGF-B, il principale fattore trofico dei periciti ed agonista del recettore PDGFR- β posto sulla membrana plasmatica di questi ultimi. Come detto, i periciti prendono contatto diretto con le cellule endoteliali, mentre gli astrociti, posizionati sempre in posizione abluminale, interagiscono a livello dell'unità neurovascolare tramite i loro prolungamenti (*endfeet*). Questi *endfeet* o limitanti gliali, sono caratterizzati dalla polarizzazione di alcune proteine note come *Orthogonal Arrays of Particles* (OAPs), di cui la proteina canale acquaporina 4 (AQP4) fa parte.

Molti *marker* validati sono utili all'individuazione di queste cellule: il platelet-derived growth receptor β (PDGFR β), il chondroitin sulfate proteoglycan 4 (i.e. neuronal/glial 2; NG2), alanyl aminopeptidase (CD13), α -smooth muscle actin (α SMA) e desmina (EIAli et al., 2014).

I periciti che invadono il prosencefalo durante l'embriogenesi hanno origine dall'ectoderma, mentre le cellule presenti nei compartimenti del mesencefalo e del rombencefalo derivano dal mesoderma; queste possono essere rimpiazzati da cellule del midollo osseo, almeno nell'adulto (Cai et al., 2009). Il ruolo delle cellule murali si estende oltre il semplice supporto meccanico, influenzando direttamente la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali. Topi con mutazioni o alterazioni del *pathway* PDGF-B/PDGFR β possiedono vasi con un livello insufficiente di periciti, vasi maggiormente dilatati, micro-aneurismi ed un incremento della permeabilità di barriera. Una completa assenza dei periciti risulta in morte prenatale causata da edema ed emorragie vascolari. I vasi sanguigni di questi topi mostrano iperplasia, indicando inoltre che i periciti possiedono una funzione limitante la crescita dei vasi durante l'embriogenesi (Gaengel, Genové, Armulik, & Betsholtz, 2009). I periciti sono particolarmente importanti durante l'embriogenesi nella formazione della BEE; anticipando l'arrivo degli astrociti a livello dell'unità neurovascolare (FIGURA 13). Il loro ruolo nella regolazione dell'iperemia è discusso poiché l'allargamento dei vasi

riscontrabile in condizioni di basso *coverage* dei periciti potrebbe essere dovuto in parte a *deficit* delle cellule della muscolatura liscia. In condizioni patologiche una minor quantità di periciti o loro disfunzioni possono causare una minor reattività dei vasi.

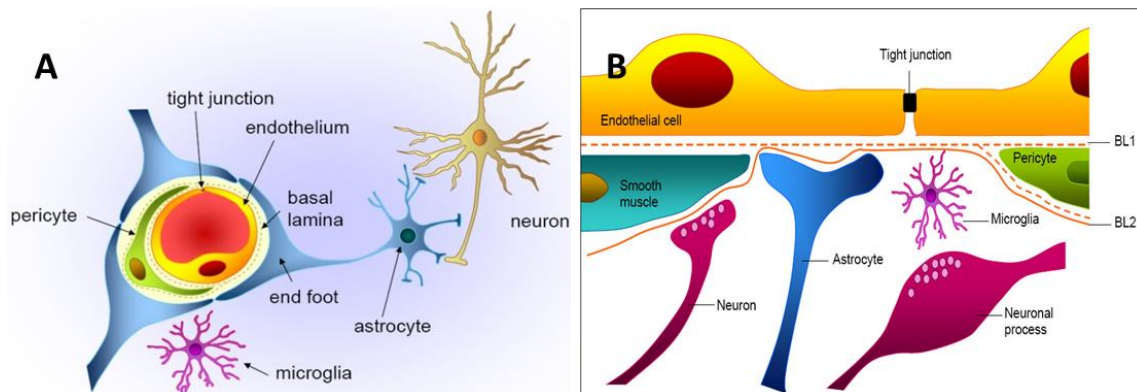


FIGURA 13 – RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELL'UNITÀ NEURO-VASCOLARE

(ABBOTT, PATABENDIGE, DOLMAN, YUSOF, & BEGLEY, 2010)

4.4.5 L'asse PDGF-R / PDGF-BB

Il Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) è uno dei fattori di crescita più importanti per la propagazione dei periciti. Questo fattore è prodotto e secreto dalle cellule endoteliali in risposta a stimoli di neo-vascularizzazione. PDGF-BB interagisce con il suo recettore pericitario guidando il reclutamento dei periciti intorno ai vasi in formazione oltre a promuovere la proliferazione di queste cellule. Studi con topi *knock-out* per PDGFR- β od il suo ligando PDGF-BB risultano in morte embrionale dovuta a complicazioni cardiovascolari, aumentata permeabilità di membrana dei vasi ed emorragie dovute primariamente all'assenza dei periciti a livello dell'unità neurovascolare. Come osservato in esperimenti *in vitro*, l'asse PDGF-BB/PDGFR- β può essere inibito dal silenziamento di endosialina/TEM1/CD248. Questo silenziamento non influisce direttamente sui livelli di espressione genica di PDGFR- β , rendendo evidente che endosialina agisce nel *pathway* di PDGF-BB a valle della sua interazione con il recettore PDGFR- β ; segni del suo intervento sono rilevabili nella mancata fosforilazione di ERK-1/2 e nella ridotta espressione di c-fos (Demoulin, 2010; Tomkowicz et al., 2010).

4.4.6 Tight junctions: claudine

Sebbene la scoperta della BEE si possa far risalire alla fine dell'800, sono a metà del '900 Reese e Karnovsky poterono apprezzarne l'intima struttura utilizzando il microscopio elettronico ed osservando per la prima volta le *tight junctions* (Brightman & Reese, 1969). Le *tight junctions* consistono di proteine transmembrana tra le più rappresentate sono claudine, tricellulina ed occludina, connesse al citoscheletro actinico tramite la zona occludens (ZO-1) (Tscheik, Blasig, & Winkler, 2013). Le claudine in particolare sono proteine integrali di membrana espresse a livello di molti endoteli ed epiteli. Queste proteine contribuiscono sia alla funzione di barriera paracellulare che di poro, giocando un ruolo essenziale nel determinare la permeabilità di molti tessuti. La scoperta delle claudine come parte della famiglia delle *tight junctions* fu pubblicata nel 1998 da S. Tsukita e colleghi (Furuse, Fujita, Hiiragi, Fujimoto, & Tsukita, 1998); da allora il numero delle proteine appartenenti a questa classe è andato aumentando. Si contano ad oggi 27 geni che codificano per claudine nei mammiferi, non tutti presenti negli umani (Günzel & Yu, 2013). Gli endoteli vascolari esprimono normalmente numerose claudine anche se claudina 5 è sicuramente la più abbondante, seguita da claudina 1, 3 e 12. Nel tessuto cerebrale ed in particolare a livello dell'endotelio dei capillari l'mRNA di claudina 5 è espresso quasi 600 volte di più che quello di claudina 3 (Ohtsuki, Yamaguchi, Katsukura, Asashima, & Terasaki, 2008).

4.5 La placenta

La placenta rappresenta il condotto di comunicazione per il passaggio di ossigeno e nutrienti, così come dei prodotti del catabolismo fetale che tornano al circolo sanguigno materno per l'escrezione, tra la donna ed il feto durante il periodo della gravidanza. La placenta è una caratteristica essenziale della classe dei mammiferi che possiamo tuttavia ritenere una conquista evolutivamente recente. Circa 200 milioni di anni fa i primi mammiferi deponevano ancora le uova come il moderno platipo (ornitorinco) e solo in seguito all'integrazione a livello genomico di un retrovirus, fatto scoperto nei primi anni '90 (FIGURA 14), fu possibile l'azione immunomodulatoria sull'endometrio uterino necessaria alla gestazione così come la conosciamo oggi (Lavialle et al., 2013).

4.5.1 Modulazione immunologica della placenta

Organo principe della gestazione e fondamentale barriera a tutela del nascituro, sono le membrane fetali. La placenta costituisce un immediato indice della salute del feto (quadri-test) e sue eventuali alterazioni, sia morfologiche che funzionali, hanno provate conseguenze sul neuro-sviluppo fetale (Y. H. Chen et al., 2006). Si riconoscono alla placenta la funzione barriera/filtro ed il ruolo di mediatore della risposta immunitaria. Il primo ruolo emerge facilmente dal confronto e dallo studio di modelli di MIA indotti tramite infezione con ceppi di influenza, iniezioni intraperitoneali di LPS, IL6 o IL8. Mentre i virioni dell'influenza sono osservabili sia nei tessuti placentari che in quelli embrionali, LPS e IL8 non penetrano le membrane fetali (Ashdown et al., 2006). L'IL6, uno dei più importanti mediatori della risposta infiammatoria acuta (Paintlia, Paintlia, Barbosa, Singh, & Singh, 2004), in grado di attraversare la barriera ematoencefalica ed iniziare la sintesi di mediatori flogistici (e.g. PEG2), impiega circa 30 minuti ad attraversare la placenta. Questo tempo è però dipendente dalla fase gestazionale, IL6 attraversa le membrane fetali più lentamente durante il terzo trimestre di gravidanza (Dahlgren, Samuelsson, Jansson, & Holmäng, 2006). Risultati simili sono stati osservati in preparati di placenta umana a termine in vitro, la quale permette il passaggio di IL6 ma non di IL1 β o TNF α (Zaretsky, Alexander, Byrd, & Bawdon, 2004). La variabilità del trasporto transplacentare di citochine emerge quindi come fattore chiave nel determinare un "periodo finestra" di maggior vulnerabilità all'attivazione immunitaria prenatale. Al momento non sono disponibili dati sul passaggio di POLY I:C a livello placentare.

4.5.2 Produzione di citochine a livello placentare

Non vi sono attualmente prove convincenti sull'origine delle citochine in modelli MIA; queste possono essere prodotte dalla madre e/o dal feto. Studi condotti su topi femmina *knock-out* per IL6 incrociati con maschi *wild type*, grazie alla peculiare origine in parte materna ed in parte fetale (IL6^{+/-}) delle membrane fetali, dimostrano che la placenta costituisce una delle fonti di tali citochine (Mandal et al., 2013).

La letteratura riporta l'espressione di tutti e 10 i TLR nella placenta umana; il tipo cellulare che esprime principalmente questi recettori è quello trofoblastico. I fattori prodotti dai trofoblasti hanno un potente effetto modulatore delle cellule immunitarie materne determinandone la differenziazione e lo stato di attivazione. Monociti e macrofagi incubati

in presenza di trofoblasti, o nel media condizionato da questi, sono meno responsivi allo stimolo mediato dalla molecola pro-infiammatoria LPS (agonista del TLR4); nelle medesime condizioni la risposta dei monociti alla stimolazione con POLY I:C è significativamente aumentata (Koga, Aldo, & Mor, 2009). Ulteriori studi, effettuati su linee cellulari di trofoblasti aventi caratteristiche simili a quelle di questo tipo cellulare, durante il primo trimestre di gravidanza (i.e. SV40 transformed HTR8 cells), hanno mostrato come i trofoblasti rispondano al POLY I:C producendo IL6 ed IL8 in maniera dose-dipendente (Koga, Cardenas, et al., 2009).

4.5.3 Microbiota a livello placentare ed uterino

Il microbiota consiste dell'intera popolazione di batteri residenti. I batteri dentro e sopra (sulla nostra pelle), sono circa 10^{14} cellule e formano di fatto un super-organismo con un genoma 100 volte più esteso di quello umano. Nonostante il dogma dell'embrione e dell'utero quali territori immuno-privilegiati e sterili, alcune evidenze mostrano la presenza di batteri *in utero*. Si è inoltre provato come questi possano influenzare il microbiota del nascituro durante il periodo della gestazione (Jiménez et al., 2008). La presenza di specie batteriche nel feto potrebbe essere il risultato della traslocazione di alcuni batteri dall'intestino materno attraverso il sangue e quindi la placenta; l'isolamento di alcune specie a livello del cordone ombelicale fa propendere per questa visione (Satokari, Grönroos, Laitinen, Salminen, & Isolauri, 2009). Più recentemente si è identificata la "firma" dei batteri normalmente presenti a livello della cavità orale materna in placenta; questa scoperta apre la strada a futuri studi per la comprensione e caratterizzazione della funzione di tali batteri anche nel contesto del neurosviluppo (Aagaard et al., 2014; Borre et al., 2014).

4.5.4 Placentazione comparativa

Si intende per placentazione l'insieme degli eventi che intervengono alla formazione della placenta. Pur avendo ogni specie sviluppato una propria strategia per la placentazione, si possono distinguere fondamentalmente due categorie: placentazione non-invasiva o placentazione epiteliocoriale e placentazione invasiva o emocoriale (FIGURA 14). La placentazione emocoriale è caratterizzata dall'invasività delle cellule trofoblastiche di derivazione fetale che penetrano attraverso i vasi uterini per entrare in diretto contatto con il sangue materno. Gli umani possiedono una placentazione emocoriale così come molti

animali da laboratorio, come ad esempio topi, ratti e conigli; persino tra questi la placentazione umana è da considerarsi particolarmente invasiva (Moffett & Loke, 2006).

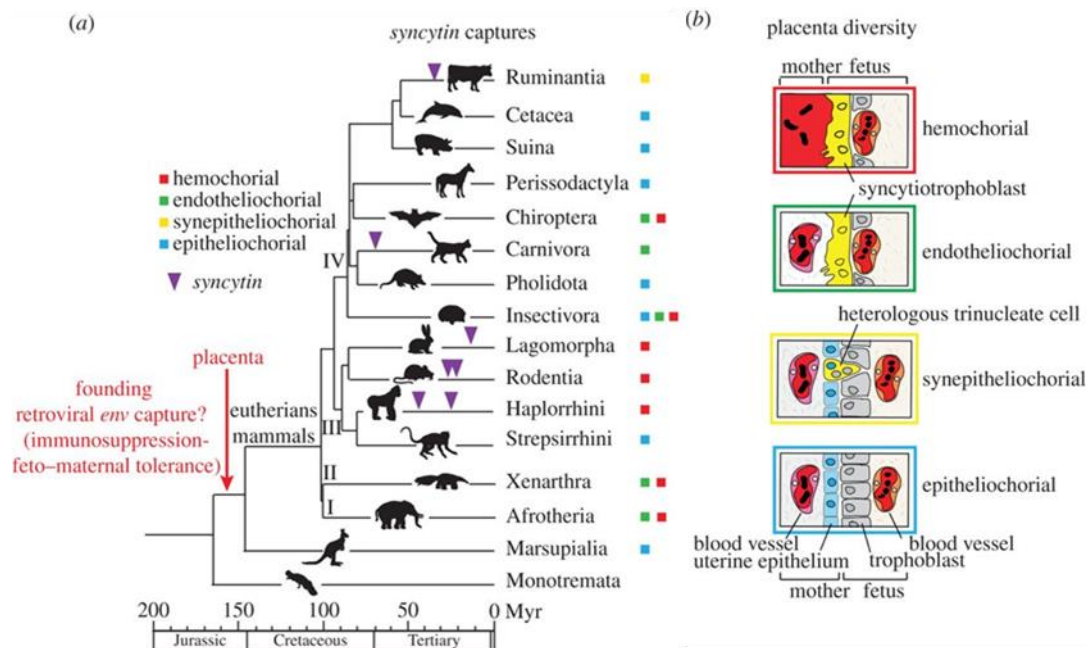


FIGURA 14 – A) LO SCHEMA MOSTRA L'INTRODUZIONE DEI GENI CHE REGOLANO IL SINCIZIO TROFOBlastICO NELLA CLASSE DEI MAMMIFERI PLACENTATI B) TIPI DI PLACENTAZIONE SCHEMATIZZATI A LIVELLO DELL'INTERFACCIA MATERNO-FETALE – IMMAGINE MODIFICATA (LAVIALLE ET AL., 2013)

Negli esseri umani (e nei roditori) la placenta è composta da tre strati principali: lo strato materno esterno, il quale include le cellule deciduali dell'utero e la vascolarizzazione materna; la regione di congiunzione, la quale permette l'adesione della placenta fetale all'utero che contiene cellule fetoplacentari, i trofoblasti, atti ad invadere la parete uterina ed i vasi materni; uno strato interno composto da villi altamente ramificati. I villi sono bagnati dal sangue materno e sono composti da strati epiteliali esterni derivanti dalla linea cellulare trofoblastica e da un *core* interno di cellule stromali e vasi. La maggior parte dei fenotipi placentari patologici conosciuti, comportano difetti della maturazione e della sviluppo dei villi. Nei topi, lo sviluppo placentare inizia nella blastocisti ad E3.5, quando lo strato del trofoderma inizia a separarsi dalla massa cellulare iniziale; successivamente l'ectoderma extraembrionico si sviluppa nelle cellule trofoblastiche del corion e quindi del labirinto (Watson & Cross, 2005).

La porzione vascolare della placenta è derivata dal mesoderma extraembrionico (allantoide) che si estende dalla porzione caudale dell'embrione ad E8.0. Ad E8.5 l'allantoide ed il corion si uniscono in un processo chiamato collegamento corioallantoico. Dopo poco, il corion inizia a ripiegarsi per formare i villi, creando uno spazio nel quale i vasi fetali crescono/protrudono dall'allantoide. L'endotelio dei capillari fetali è circondato da cellule sinciziotrofoblastiche multinucleate, mentre le arterie spirali sono delimitate da cellule trofoblastiche mononucleate (Watson & Cross, 2005).

Il modello murino è quindi da considerarsi valido e traslabile, con le dovute precauzioni, allo studio dei fenomeni che avvengono a livello della placenta umana. È inoltre noto che la ripetuta stimolazione immunitaria durante la gestazione è caratterizzata dall'aumento dei livelli di citochine nel flusso ematico materno con conseguente compromissione della stabilità della barriera placentale; il MIA può quindi agire sulla placenta a diversi livelli, non ultimo, facilitando l'ingresso di sostanze nocive nel circolo ematico dell'embrione (Ibi & Yamada, 2015).

5 Scopo del progetto

Questo lavoro, svolto sotto la supervisione della Professoressa Isabella Barajon, si inserisce nell'ambito di un più ampio progetto di ricerca del gruppo di lavoro di cui faccio parte (*Laboratory of Pharmacology and Brain Pathology* - Professoressa Michela Matteoli).

Il lavoro si è articolato in differenti "fasi" ognuna relativamente indipendente per scopo e finalità, ma organica alla caratterizzazione del modello MIA scelto e quindi allo studio dei *pathway* cellulari e molecolari alla base dei fenotipi patologici evidenziati.

5.1 Fasi del progetto

1. Scelta e validazione del modello MIA indotto dall'iniezione di POLY I:C a GD9
2. Validazione del modello MIA indotto dall'iniezione di POLY I:C
3. Caratterizzazione degli effetti del modello MIA a livello comportamentale
4. Valutazione della suscettibilità all'epilessia della prole di modelli MIA
5. Valutazione dei parametri infiammatori a breve termine nella prole di MIA
6. Valutazione dei parametri infiammatori a lungo termine nella prole di MIA
7. Valutazione della permeabilità di membrana della barriera emato-encefalica
8. Localizzazione dell'albumina a livello astrocitario
9. Valutazione del microbiota nella prole di modelli MIA
10. Analisi del *pathway* di Wnt e claudina5
11. Analisi del *coverage* pericitario dei vasi a livello cerebrale
12. Ruolo di CD248 e PDGFB nello sviluppo cerebrale
13. Valutazione della densità dei vasi ematici a livello cerebrale
14. Analisi dello stato di salute della placenta
15. Valutazione della percentuale di vasi di origine embrionale (*plate* corionico + villi)

6 Risultati

6.1 Scelta del modello MIA indotto dall'iniezione di POLYI:C a GD9

Nella prima fase dello studio, in conformità con la paradigma già presente in letteratura (Meyer et al., 2006) (FIGURA 15), sono state selezionate le condizioni sperimentali ed i periodi, durante la crescita della prole, più utili alla valutazione degli eventuali effetti patologici indotti dalla procedura di MIA. La corposa letteratura riguardante i modelli MIA è di difficile interpretazione a causa dell'uso di una grande varietà di sostanze, dosi e tempi ai quali fanno seguito differenti effetti.

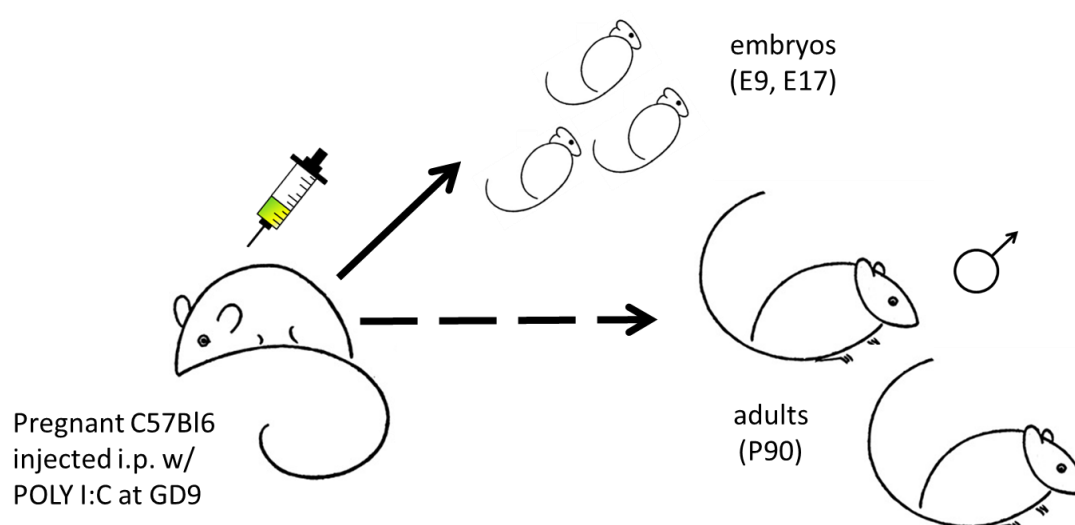


FIGURA 15 – SCHEMA ESEMPLIFICATIVO DEL MODELLO MIA UTILIZZATO;

PER LE ANALISI SUL FENOTIPO DELLA PROLE SONO STATI IMPIEGATI PRINCIPALMENTE TOPI AD E17 E P90

Sulla base di quanto riportato in letteratura ed allo scopo di mimare una condizione patologica materna di lieve entità, ovvero con animali esenti da segni manifesti di malessere fisico, il modello MIA utilizzato in questo studio è stato indotto tramite iniezioni intraperitoneali di 2 mg/Kg di POLY I:C ovvero il 40% della quantità di POLY I:C comunemente utilizzata in letteratura (Boksa, 2010; Meyer, Feldon, Schedlowski, & Yee, 2005; Meyer et al., 2008; Meyer et al., 2006; Shi, Tu, & Patterson, 2005). Si è scelto di effettuare l'iniezione a GD9, giorno corrispondente, nel modello murino, alla fine del primo trimestre di gravidanza umano per livello di sviluppo fetale e percentuale di durata della gravidanza (Clancy, Darlington, & Finlay, 2001). Come già detto nella parte introduttiva, si

ritiene che questo periodo della gravidanza costituisca una finestra di suscettibilità ad eventi infiammatori (Fortier, Luheshi, & Boksa, 2007; Zuckerman & Weiner, 2005). L'analisi è stata quindi effettuata sia durante il periodo embrionale (3-6-24h dall'iniezione ed E17) sia durante la vita adulta (P90) della prole di sesso maschile. Questi periodi sono stati scelti per investigare gli eventi che nell'embrione seguono l'insulto infiammatorio materno ed il manifestarsi della patologia; come precedentemente detto, molte patologie del neurosviluppo si manifestano in età post-puberale ed interessano quindi maggiormente la vita adulta dell'individuo (Blas-Valdivia, Cano-Europa, Hernández-García, & Ortiz-Butrón, 2009; Flores, Silva-Gómez, Ibáñez, Quirion, & Srivastava, 2005). La scelta di animali di sesso maschile è da ricondursi all'assenza del ciclo ormonale, il quale pone variabili di difficile controllo da parte dello sperimentatore, soprattutto per quanto riguarda i test comportamentali, ma non meno per gli esami biochimici. È inoltre noto che sia a livello anatomico che funzionale il cervello è profondamente influenzato dal genere e dall'azione di ormoni steroidei secreti a livello delle gonadi (Durdiakova, Ostatnikova, & Celec, 2011). Inoltre, dati riguardanti la prevalenza di patologie neurologiche e psichiatriche nell'uomo mostrano una diversa vulnerabilità dei sessi a questo tipo di patologie oltre che un dimorfismo sessuale (Davies, 2013). Si è reso quindi necessario per questo studio attuare una scelta a priori riguardo al genere da prendere il esame.

6.2 Validazione del modello MIA indotto dall'iniezione di POLY:I:C

Per verificare l'efficacia della stimolazione immunogena selezionata nel sollecitare una risposta immunitaria ed effettuare al tempo stesso un raffronto con i dati presenti in letteratura, sono stati valutati i livelli di IL6 nel plasma di femmine di topo di età compresa tra i 4 ed i 5 mesi a 3h dal trattamento con POLY I:C 2 mg/Kg i.p.

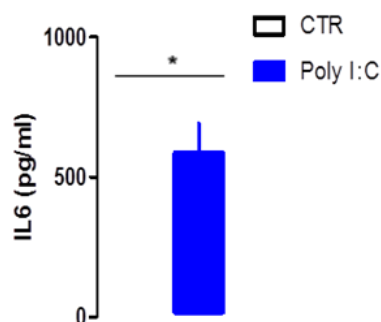


FIGURA 16 – IL6 NEL PLASMA DI FEMMINE TRATTATE CON POLY I:C (2 MG/KG) O SALINA A 3H DALL'INIEZIONE

(COLLABORAZIONE CON ELISA FOCCHI)

IL6 è una citochina multifunzionale con proprietà pro- ed anti-infiammatorie presente in quantità inferiori il pg/ml nell'uomo di condizioni fisiologiche ma capace di veloci regolazioni (aumento) in prossimità di stati patofisiologici (Wolf, Rose-John, & Garbers, 2014). La somministrazione di POLY I:C (2 mg/Kg, i.p.), determina una aumento significativo dei livelli plasmatici di IL6 in topi di sesso femminile rispetto alla condizione controllo, non rilevabile dal test ELISA (FIGURA 16). Il kit ELISA utilizzato ha una sensibilità superiore ai 50 pg/ml. I livelli di IL6 nel plasma dei topi trattati risultano aumentati in accordo con i dati riportati in letteratura (Meyer et al., 2008; Meyer et al., 2006) confermando la validità del paradigma scelto per l'induzione del MIA.

6.3 Caratterizzazione degli effetti del modello MIA a livello comportamentale

Al fine di caratterizzare il fenotipo comportamentale della prole MIA, in continuità con la letteratura presente sull'argomento, topi maschi P90, ovvero a 3 mesi di età, sono stati sottoposti a *test* in grado di valutare le capacità mnemoniche ippocampo-dipendenti, il grado di socialità, l'ansia ed il livello di stress, oltre alla presenza di comportamenti ripetitivi. Tali *test* hanno confermato i dati presenti in letteratura (Coyle, Tran, Fung, Summers, & Rofe, 2009; Golan, Lev, Hallak, Sorokin, & Huleihel, 2005), mostrando sia un calo della capacità di apprendimento e socialità, sia un'aumentata ansia oltre a rivelare la propensione a comportamenti ripetitivi in topi nati da madri trattate con POLYI:C rispetto ai controlli (FIGURA 17).

Molte patologie neurologiche e psichiatriche sono attualmente diagnosticate in prevalenza sulla base di criteri comportamentali; i test impiegati in questo studio sono stati selezionati per la loro riconosciuta capacità di evidenziare nel modello murino fenotipi patologici correlabili alle patologie umane (Kazdoba, Leach, & Crawley, 2015). Negli esseri umani i sintomi dell'autismo si possono manifestare in differenti stadi della vita, anche se solitamente, si arriva alla diagnosi intorno al terzo anno di vita (incidenza 0.9%) (Toro et al., 2010). Segni caratteriali del paziente autistico comprendono ritardo o assenza della comunicazione verbale, difficoltà nell'interazione sociale e frequenti comportamenti ripetitivi. I sintomi di diverse patologie neurologiche, come ad esempio la schizofrenia, emergono invece in età adolescenziale o adulta e si manifestano con un lento distacco

emozionale che progredisce rapidamente sia in sintomi positivi come allucinazioni ed alienazione sia in sintomi negativi come apatia e deficit dell'attenzione solo per fare alcuni esempi.

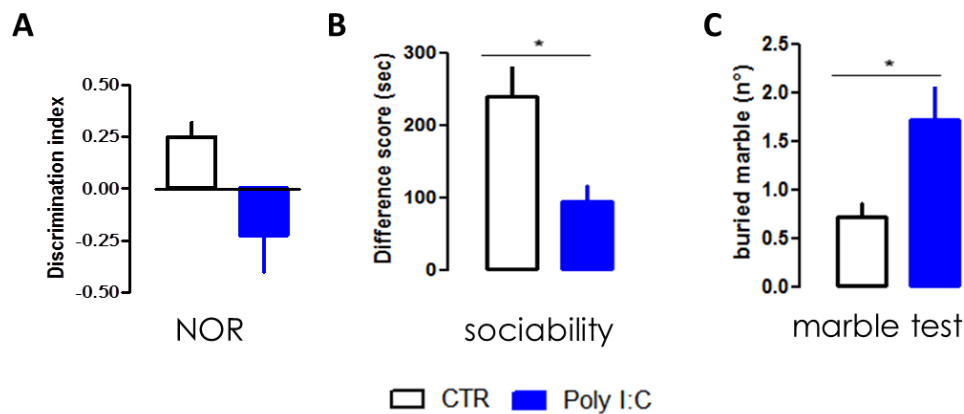


FIGURA 17 – A) NOR TEST SU PROLE DI MODELLI MIA POLY I:C VS CTR B) TEST SOCIABILITY SU PROLE DI MODELLI MIA POLY I:C VS CTR C) MARBLE BURYING ASSAY SU PROLE DI MODELLI MIA POLY I:C VS CTR (NOR E SOCIABILITY SONO STATI SVOLTI IN COLLABORAZIONE CON ELISA FOCCHI E MARIAELVINA SALA)

Il *novel object recognition test* (NOR) (FIGURA 17/A), ad esempio, è un *test* in grado di evidenziare difetti mnemonici ippocampo-dipendenti. La memoria è un'abilità superiore intaccata in molte patologie neurologiche umane come morbo di Alzheimer, schizofrenia, morbo di Parkinson e disordini dello spettro autistico; questo *test* è stato utilizzato in oltre 900 pubblicazioni scientifiche con roditori (Grayson et al., 2015). Il NOR è un test basato sulla naturale propensione dei roditori ad esplorare oggetti nuovi e riflette l'uso di capacità quali l'apprendimento e la memoria di riconoscimento nei soggetti in esame. Topi MIA esposti ad LPS a GD9 mostrano *deficit* in questo *test* (Coyle et al., 2009) simili a quelli da noi riscontrati con POLY I:C; lo stesso fenomeno non si presenta invece in seguito ad esposizione ad LPS a GD17 (Golan et al., 2005), ovvero in un periodo gestazionale avanzato. L'insieme di questi dati suggerisce che non vi sia un vero *deficit* di riconoscimento dell'oggetto nella prole MIA, ma piuttosto una differente preferenza per gli oggetti vecchi o per quelli nuovi. Di più immediata comprensione sono i *test* che prendono in esame gli aspetti della socialità; comportamento adattativo fondamentale in numerose specie animali. La sfera della socialità si differenzia in riconoscimento sociale, competenza sociale, capacità sociali e comportamento sociale. Come detto, molti disturbi neuropsichiatrici sono

caratterizzati dalla perdita del riconoscimento sociale con ripercussioni sulla stabilità della struttura e delle relazioni sociali con il gruppo; ad esempio nel caso di patologie dello spettro autistico, in accordo con il DSM-IV (manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali), si evidenziano difetti nella socialità, nella comunicazione e nella varietà di interessi dell'individuo (Cook & Oliver, 2011). Per i roditori, e nello specifico per i topi, un corretto comportamento sociale si esprime principalmente nel mantenimento della gerarchia e nella scelta del *partner*. Il test di riferimento in questo ambito è caratterizzato da un paradigma a tre camere chiamato *Crawley's sociability and preference for social novelty protocol* (FIGURA 17/B). Nel quadro delle patologie già citate si inseriscono anche comportamenti ripetitivi e persistenti che, oltre ai classici segni di stress, sono segni distintivi di patologie del neurosviluppo presenti in età post-puberale in soggetti che abbiano difficoltà ad esprimere le proprie emozioni in maniera appropriata (El-Radhi, 2015). I comportamenti ripetitivi di scavo ed interrimento sono naturali e spontanei nei roditori ed è quindi solo frequenza degli stessi a variare e ad essere valutata. Il *marble burying test* (FIGURA 17/C E FIGURA 18) si è dimostrato un buon modello predittivo per disturbi psichiatrici come disturbi ossessivo-compulsivi e disturbi dello spettro autistico. Alcuni studi hanno dimostrato che le biglie utilizzate nel test, non inducono paura nel roditore e che la risposta al test non è quindi influenzata dal fenomeno di abitudine.

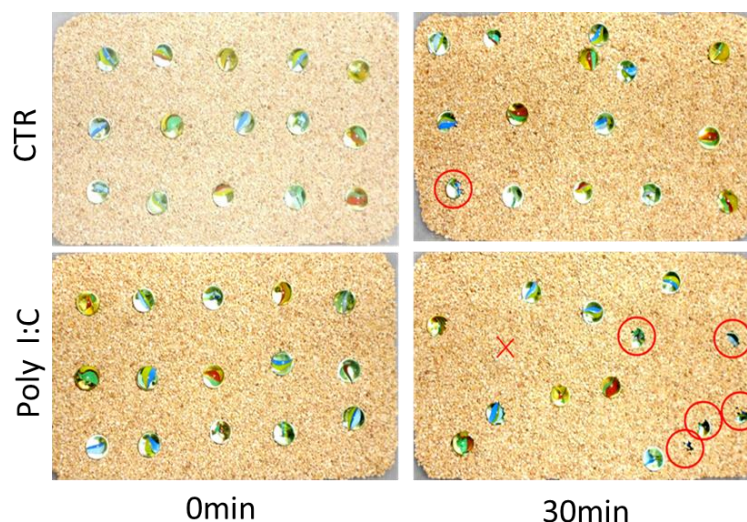


FIGURA 18 – IMMAGINE RAPPRESENTATIVA AI TEMPI 0 MINUTI (INIZIO TEST) E 30 MINUTI (FINE TEST) DEL MARBLE BURYING ASSAY SU PROLE DI MODELLI MIA POLY I:C VS CTR.

6.4 Valutazione della suscettibilità all'epilessia della prole di modelli MIA

Un recente lavoro ha mostrato come fenomeni di suscettibilità a crisi epilettiche siano riconducibili ad episodi di infiammazione durante la vita fetale (Pineda et al., 2014). Al contempo, studi epidemiologici, mostrano come la prevalenza di epilessia sia notevolmente aumentata in soggetti esposti ad infiammazione durante il periodo gestazionale materno. A questo dato vanno aggiunti il 30% dei soggetti affetti da sindromi dello spettro autistico, i quali presentano episodi epilettici sporadici durante la vita adulta con un rate 10 volte superiore rispetto alla popolazione generale (Knuesel et al., 2014).

Durante questo studio è stata effettuata da Elisa Focchi una valutazione della suscettibilità all'induzione di crisi epilettiche in animali *wild type* trattati durante il periodo prenatale con POLY I:C rispetto ai controlli. Lo studio è stato effettuato nella prole MIA in età adulta (P90), mediante la somministrazione intraperitoneale *in vivo* di acido kainico (35 mg/kg), un potente agonista di un sottotipo di recettore del glutammato in grado di indurre crisi epilettiche in maniera stereotipata (Corradini et al., 2012). A seguito della somministrazione di acido kainico i topi sono stati osservati e valutati ogni 5 minuti per 3h, assegnando loro di volta in volta un punteggio da 0 a 7 in base alla scala di Racine modificata (Bozzi, Vallone, & Borrelli, 2000).

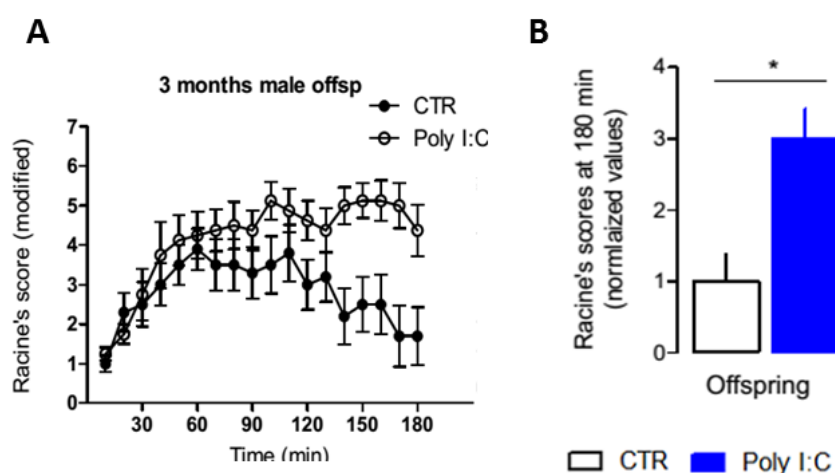


FIGURA 19 - A) ANDAMENTO RAPPRESENTATIVO DELLA RISPOSTA ALL'INIEZIONE DI ACIDO KAINICO IN UN FIGLIO DI MODELLO MIA POLY I:C A P90 VS CTR. B) IL PUNTEGGIO RAGGIUNTO DAGLI ANIMALI PROGENIE DI MADRI POLY I:C VS CTR MOSTRA UN AUMENTO DELLA RISPOSTA SIGNIFICATIVO STATISTICAMENTE – SI RINGRAZIA E.FOCCHI PER I GRAFICI

Come osservabile in figura (FIGURA 19), mentre i soggetti controllo rispondono alla somministrazione di acido kainico con un aumento transiente delle crisi indotte, in grado di normalizzarsi entro le tre ore di osservazione, i soggetti esposti a POLY I:C in epoca prenatale mostrano una durata maggiore delle crisi epilettiche, che tendono a rimanere sostenute anche dopo tre ore dal trattamento e mostrano, in generale, un punteggio più alto nel test. Da ciò si deduce che gli animali con MIA POLY I:C mostrano una maggior suscettibilità a crisi epilettiche indotte, e suggeriscono che il trattamento prenatale con agenti proinfiammatori possa alterare il livello di eccitabilità neuronale nell'animale adulto, rendendolo più suscettibile allo stimolo convulsivante. A conferma e controllo del risultato ottenuto sono stati iniettati, con la stessa quantità di POLY I:C, topi adulti P90 (*naive male mice*) e topi di sesso femminile utilizzati in prima istanza come madri per l'induzione del modello MIA. Entrambe queste categorie sono state trattate con acido kainico dopo un periodo di 30 giorni, simile a quello della gestazione nel topo e necessario per escludere un'azione acuta della somministrazione degli agenti proinfiammatori.

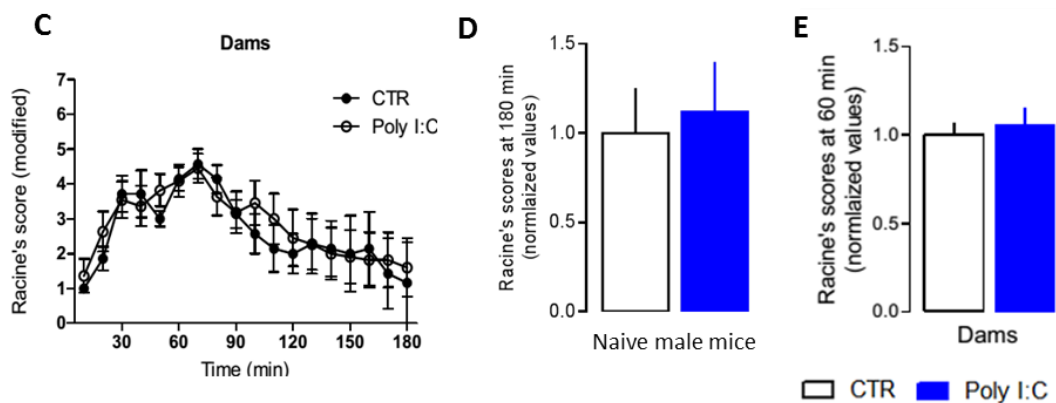


FIGURA 20 - C) ANDAMENTO RAPPRESENTATIVO DELLA RISPOSTA ALL'INIEZIONE DI ACIDO KAINICO P90

D) PUNTEGGIO SULLA SCALA DI RACINE RAGGIUNTO DALLE MADRI DEL MODELLO MIA POLY I:C VS CTR

E) PUNTEGGIO SULLA SCALA DI RACINE RAGGIUNTO DA TOPI P90 INIETTATI I.P. CON POLY I:C E SOLUZIONE SALINA

— SI INGRAZIA E.FOCCHI PER I GRAFICI

Come osservabile in figura (FIGURA 20), topi esposti a POLY I:C in periodi differenti da quello prenatale non mostrano una risposta alterata ad agenti epilettogeni. Questi dati confermano la validità del modello MIA in esame e l'importanza del periodo prenatale come momento decisivo nel determinare mutamenti a lungo termine a livello del SNC.

Molte delle metodiche utilizzate per l'induzione di crisi epilettiche nei modelli murini, compreso l'acido kainico utilizzato in questo studio, hanno in comune un'azione sul sistema immunitario rilevabile come innalzamento dei livelli di citochine proinfiammatorie a livello cerebrale. Nel giro di 30 minuti dalla somministrazione dell'agente convulsivante e per le 48-72 ore successive, si registrano nei roditori, alti livelli di espressione dell'mRNA per le principali citochine proinfiammatorie quali IL1 β , TNF α ed IL6. È possibile osservare un aumento di espressione di IL1 β nel cervello fino a 60 giorni dopo la scomparsa di fenomeni epilettici anche in modelli murini soggetti a crisi epilettiche spontanee (De Simoni et al., 2000; Turrin & Rivest, 2004). Ad oggi, non sono state rilevate variazioni dei marcatori dell'immunità adattativa entro le 72 ore dalla somministrazione di agenti epilettogeni nei roditori, ovvero mancano le prove di un coinvolgimento di linfociti T e B nell'attività convulsiva. Si è quindi reso necessario stabilire lo stato di attivazione del sistema immunitario in topi sottoposti a MIA.

6.5 Valutazione dei parametri infiammatori a breve termine

Il modello MIA, come già discusso, consiste nell'attivazione del sistema immunitario materno durante il periodo gestazionale. Al fine di verificare se lo stimolo infiammatorio da noi scelto sia in grado di sollecitare, direttamente o indirettamente, una risposta del sistema immunitario dell'embrione, sono state effettuate analisi per REAL TIME condotte su embrioni interi a 3, 6 e 24h dal trattamento con POLY I:C a GD9 per le maggiori citochine proinfiammatorie. A valle del TLR3 si trova l'adattatore TRIF, il quale porta all'attivazione dei fattori di trascrizione CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein), AP1 (activator protein 1), NF κ B (nuclear factor- κ B), IRF3 ed IRF7 (interferon-regulatory factors). Questi, in ultimo, portano alla produzione di citochine proinfiammatorie ed interferone di tipo 1 (FIGURA 22) (O'Neill, Golenbock, & Bowie, 2013; Yamamoto et al., 2003). Come è possibile osservare in FIGURA 21, a tempi brevi dalla somministrazione nella madre dell'agente proinfiammatorio POLY I:C si verifica un aumento della trascrizione delle citochine proinfiammatorie IL1 β ed IL6 (FIGURA 21/A-B), già indicate come le principali artefici dei fenotipi patologici conseguenti il MIA. Interferone beta (IFN β) (FIGURA 21/C) non mostra invece variazioni statisticamente differenti negli embrioni di madri trattate con POLY I:C rispetto al gruppo controllo a nessuno dei tempi analizzati.

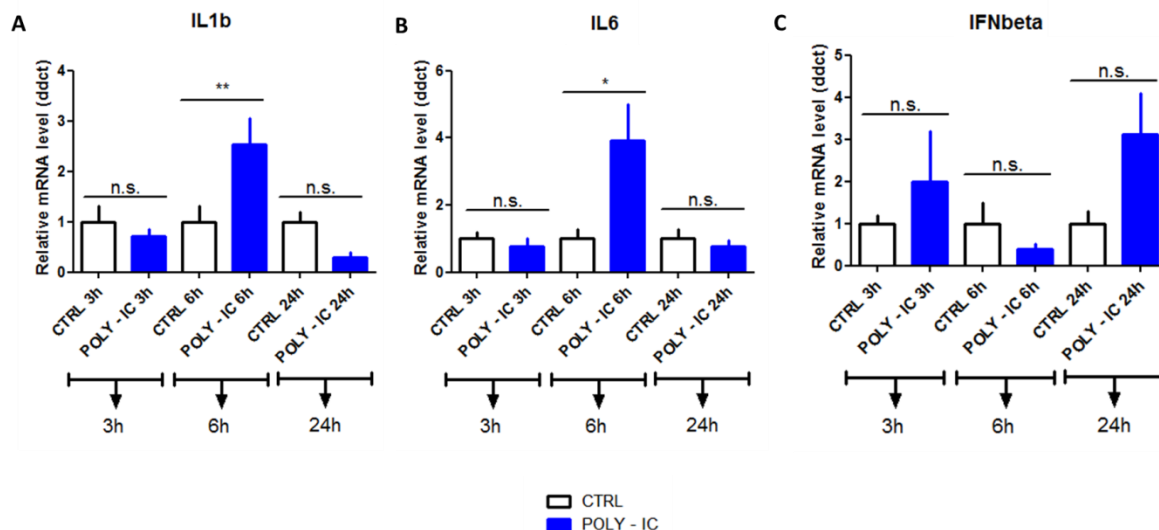
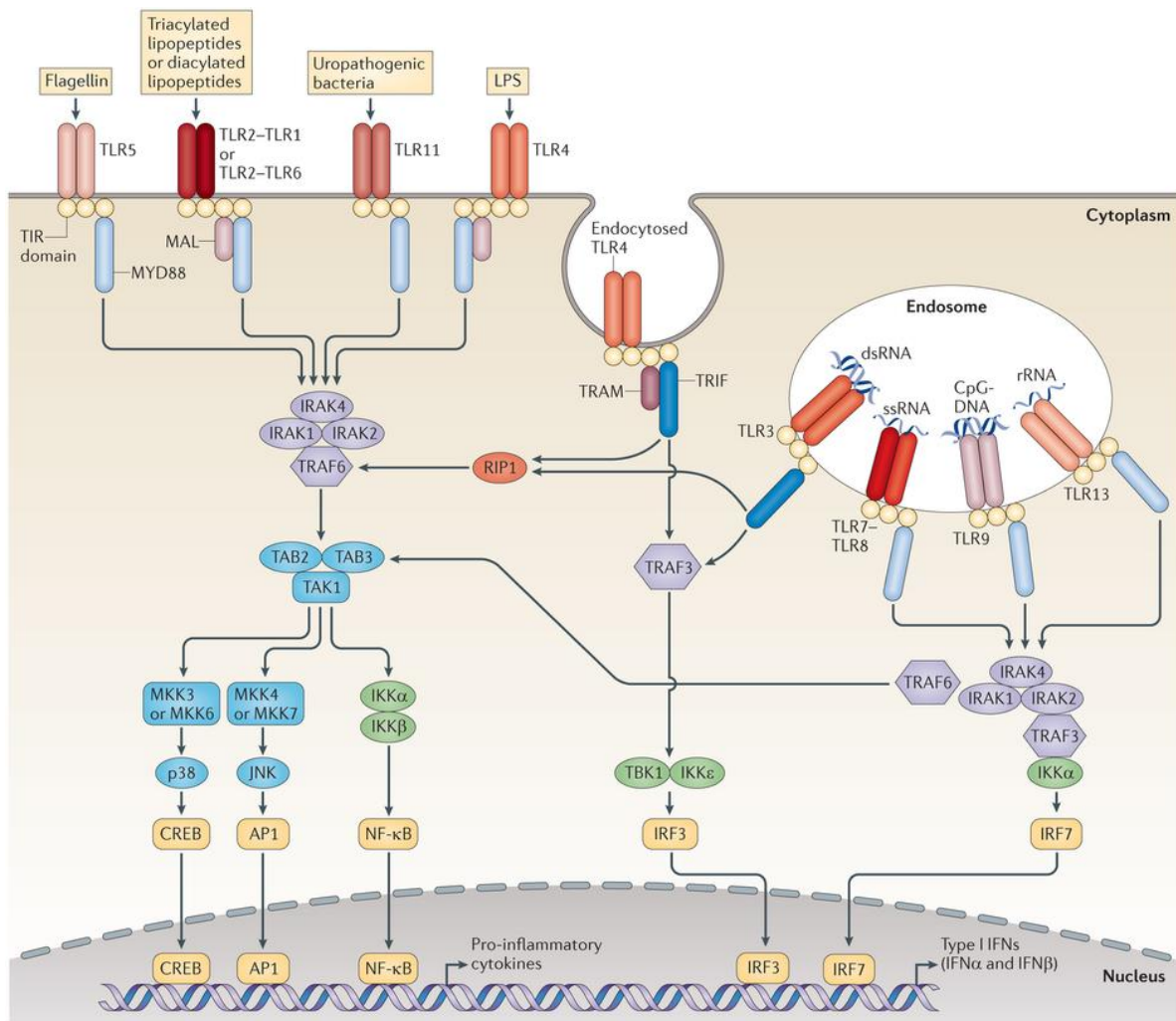


FIGURA 21 – ANALISI PER REAL TIME DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI A) IL1B B) IL6 C) IFNBETA A 3, 6 E 24H IN FETI DI TOPI MIA POLY I:C VS CONTROLLI

Questi risultati indicano l'attivazione del sistema immunitario non solo della madre, ma anche dell'embrione in conseguenza del MIA. Seppure le differenze riscontrabili nelle tempistiche (l'incremento di IL6 a livello ematico nella madre è visibile già a 3h dall'insulto (FIGURA 16)) possano accordarsi con un differente *delay* potenzialmente dovuto al passaggio dell'agente immunostimolante POLY I:C attraverso la placenta prima di raggiungere i tessuti fetali, il mancato aumento di IFN β fa propendere per un'attivazione secondaria del sistema immunitario dell'embrione. Sebbene differenti autori abbiano riportato l'aumento dei livelli di mRNA per le citochine IL1 β , TNF α ed IL6 a livello dell'encefalo di roditori sottoposti a MIA a differenti stadi di sviluppo trattati con differenti composti immuno-stimolanti, non esiste al momento *consensus* sull'entità di queste variazioni (Gayle et al., 2004; Liverman et al., 2006; Paintlia et al., 2004). Non mancano studi effettuati con POLY I:C a GD9, ovvero con un paradigma di stimolazione simile a quello utilizzato nel presente lavoro, ma anche in questo caso non tutti i dati sono concordi; Meyer e colleghi riportano che un trattamento di questo tipo porta ad una riduzione di mRNA per IL1 β a tre ore dal trattamento ed un aumento dei livelli di IL6 e TNF α (Meyer et al., 2006). Differenze nella metodiche di stabulazione degli animali, nelle tempistiche di accoppiamento, nella qualità e quantità dell'agente immunostimolante potrebbero essere all'origine delle differenze osservate.



Nature Reviews | Immunology

FIGURA 22 – TLR PATHWAYS (O'NEILL ET AL., 2013)

È interessante notare come il trascritto delle citochine IL1 β ed IL6 subisca un aumento transitorio a 6h dal trattamento (FIGURA 21/A-B) con POLY I:C; questo fatto risulta rilevante al fine di comprendere il *pathway* coinvolto e verrà discusso in dettaglio più avanti nel testo.

6.6 Valutazione dei parametri infiammatori a lungo termine

Visti i risultati sin qui presentati si è ritenuto necessario analizzare la condizione infiammatoria anche in animali adulti (P90), ovvero allo stadio di sviluppo utilizzato per i test comportamentali e di suscettibilità all'epilessia già discussi in questo testo.

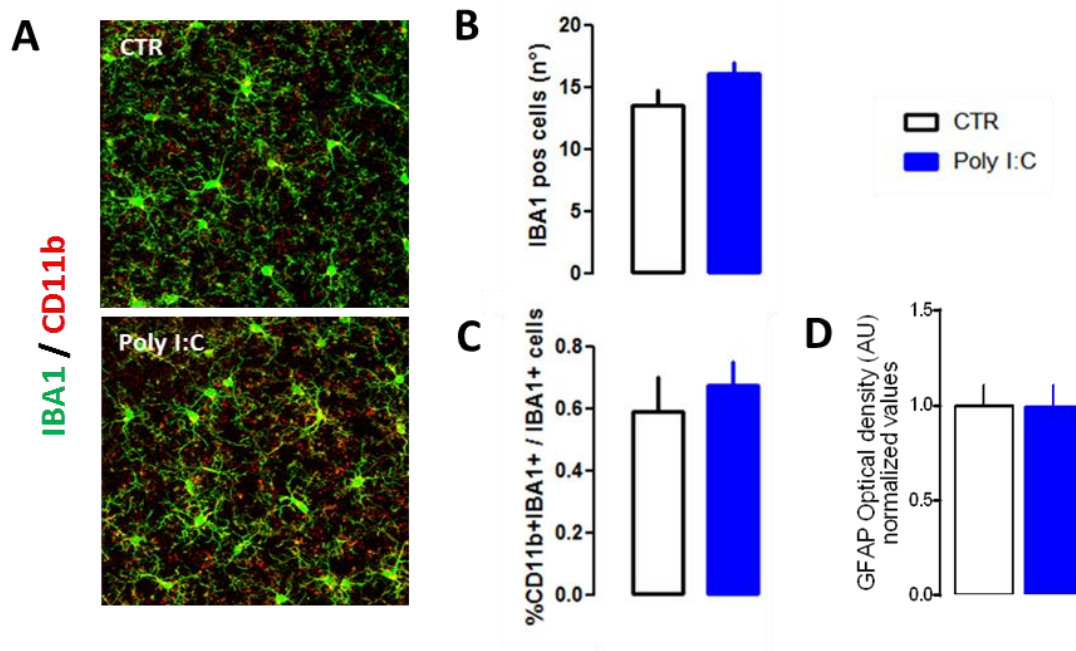


FIGURA 23 – A) IF PER IBA1 (MICROGLIA) E CD11B B) NUMERO DI CELLULE MICROGLIARI PRESENTI NEL TESSUTO (IBA1 POSITIVE) C) PERCENTUALE DI CELLULE MICROGLIALI (IBA1 POSITIVE) CD11B POSITIVE D) ANALISI PER WB DEL MARKER ASTROCITARIO GFAP

La neuroinfiammazione è solitamente definita come una risposta dell'immunità innata con il contributo delle cellule gliali per la sua propagazione. Numerosi studi hanno ormai provato che l'instaurarsi di uno stato infiammatorio è un fattore importante in casi di patologie neurologiche e psichiatriche come ad esempio la depressione maggiore e come farmaci noti per le loro proprietà antidepressive esibiscono al tempo stesso caratteristiche antinfiammatorie (Hashioka, 2011). In linea con il coinvolgimento di una componente infiammatoria, studi *post-mortem* condotti su cervelli di pazienti autistici hanno permesso di rivelare la presenza di glia reattiva dall'infanzia sino all'età adulta. La microglia rappresenta la componente immune del cervello e molti insulti al sistema nervoso portano a cambiamenti morfologici e/o funzionali di queste cellule, chiamati complessivamente microgliosi. Se mantenuta in modo persistente, l'attivazione della microglia, che inizialmente ha la funzione di ripristinare l'omeostasi, può esacerbarsi e diventare dannosa di per sé (Pekny & Pekna, 2015). Oltre alla microglia, anche gli astrociti intervengono nel processo infiammatorio, attraverso la produzione di citochine e l'aumento di numero e dimensioni (astro-gliosi).

In questo studio si è quindi valutata la presenza di alterazioni a carico delle citochine proinfiammatorie già valutate in età embrionale; queste analisi, tramite REAL TIME-PCR, hanno mostrato livelli di mRNA sotto soglia sia in prole di MIA POLY I:C che nella condizione controllo (Ct>35 – dati non presentati). Sono quindi stati presi in esame altri parametri a carico di astrociti e microglia, in particolare attraverso la misura quantitativa per *western blot* dell'espressione di GFAP (glial fibrillary acidic protein) (FIGURA 23/D), proteina dei filamenti intermedi arricchita nel citotipo astrocitario, indice del coinvolgimento in processi patologici di questo citotipo (M. A. Anderson, Ao, & Sofroniew, 2014), e tramite l'analisi d'immagine compiute su fettine di cervello a P90 colorate tramite immunofluorescenza.

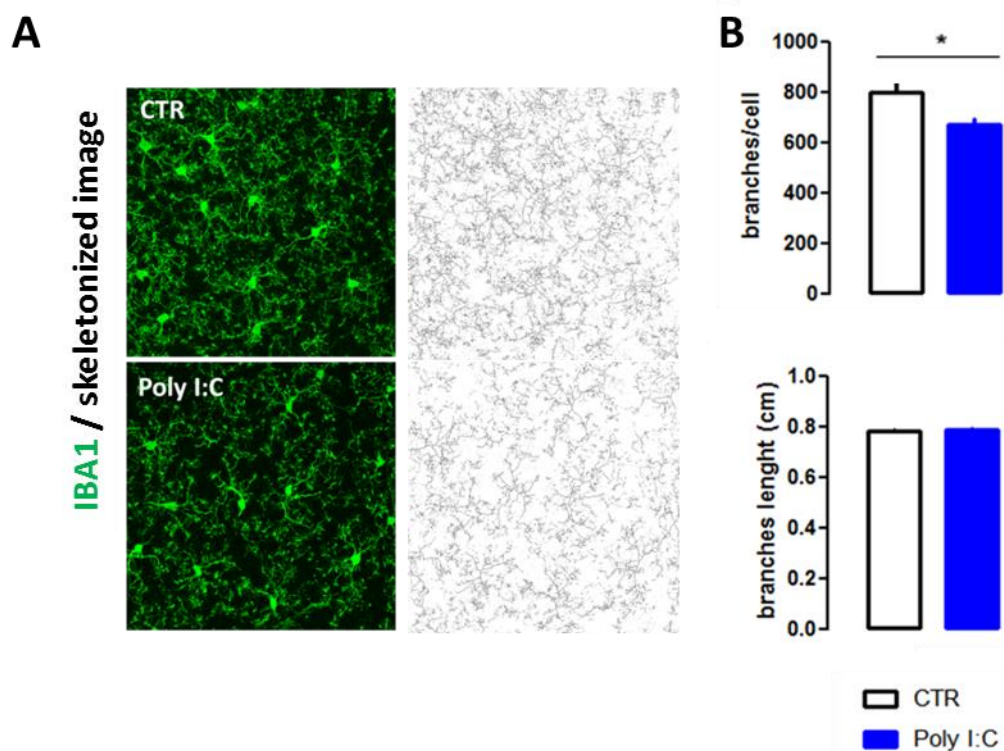


FIGURA 24 – A) IF PER IBA1 (MICROGLIA) E ANALISI DI SCHELETRIZZAZIONE PER L'INDIVIDUAZIONE DEI PROLUNGAMENTI B) NUMERO DI PROLUNGAMENTI PER CELLULA E LUNGHEZZA MEDIA DEI PROLUNGAMENTI

Sono state effettuate analisi per attestare il numero di cellule microgliali (FIGURA 23/B) e lo stato di attivazione di queste sia misurando l'espressione del marker CD11b (FIGURA 23/C), sia tramite analisi morfologica (FIGURA 24) (Morrison & Filosa, 2013).

La microglia sorveglia continuamente il cervello. In risposta a stati fisiopatologici e patologici questo citotipo, che si trova normalmente in uno stato definito "resting", va incontro a modificazioni morfologiche e funzionali riassunte nel termine attivazione. Tra i marker noti

per essere sensibili a variazioni dello stato di attivazione microgliale (Iba-1, CD68, HLA-DR ed altri) vi è CD11b, un'integrina in grado di legare CD18 e formare quindi eterodimeri diventando funzionalmente attiva. CD11b è normalmente espresso sulla superficie di monociti, neutrofili, cellule *natural killer*, granulociti e microglia. A livello funzionale il CD11b regola l'adesione leucocitaria e la migrazione cellulare in risposta all'attivazione immunitaria (Korzhevskiy & Kirik, 2015). Come è possibile vedere in figura [\(FIGURA 23/C\)](#) non si registrano significative differenze di espressione di questa integrina a livello microgliale nel tessuto cerebrale di topi adulti MIA POLY I:C rispetto ai controlli.

Se quindi risulta chiaro che l'insulto infiammatorio a GD9 ha degli effetti sul cervello della prole e che questi alterano lo stato infiammatorio dell'embrione nel giro di poche ore, dalle analisi effettuate sulla microglia, una delle cellule responsabili della risposta infiammatoria nel SNC, non risulta una risposta infiammatoria sostenuta o evidente a P90. Come mostrato in figura [\(FIGURA 23\)](#) né il numero di cellule microgliali, né lo stato di attivazione di queste ultime, evidenziato dalla presenza del marker CD11b, sono significativamente differenti nella prole MIA POLY I:C rispetto ai controlli. Un secondo parametro di valutazione dello stato di attivazione delle cellule microgliali è la loro morfologia ed in particolare lo stato delle ramificazioni. Normalmente una microglia quiescente è molto ramificata e stazionaria; come è possibile vedere in figura [\(FIGURA 24/B\)](#) la microglia di prole MIA presenta una minor ramificazione; questo parametro di per se non può però essere interpretato come segno di infiammazione; le cellule microgliali passano infatti fisiologicamente attraverso differenti stati di attivazione come già detto nel testo. Le analisi effettuate e qui presentate, mostrano complessivamente un'attivazione dei processi infiammatori a tempi brevi rispetto all'*hit* ed un mancato o lieve mantenimento del tono infiammatorio a lungo termine.

Come già discusso in questo testo, diversi studi sperimentali hanno mostrato come reazioni immunitarie indotte da stati neuroinfiammatori possano essere all'origine di una maggior eccitabilità neuronale e quindi dell'insorgere di patologie epilettiche (Ravizza et al., 2008; Vezzani, French, Bartfai, & Baram, 2011; Vezzani & Granata, 2005). I risultati qui presentati ci fanno propendere per un effetto di tipo differente in questi animali MIA. Gli effetti comportamentali e di suscettibilità all'epilessia osservati non sono giustificabili a fronte dello stato infiammatorio esibito da topi MIA POLY I:C in età adulta.

6.7 Valutazione della permeabilità di membrana della barriera emato-encefalica

La formazione di una barriera emato-encefalica (BEE) stabile e il mantenimento della sua integrità assicurano il mantenimento di un microambiente ottimale per la crescita neuronale. Una barriera intatta è inoltre essenziale al fine di proteggere il tessuto cerebrale da batteri e/o semplici macromolecole presenti a livello ematico. Proteine sieriche normalmente escluse dall'encefalo, quali trombine e proteasi, possono aumentare l'eccitabilità della rete neuronale e portare a facilitazione nell'LTP (long-term potentiation) (Han et al., 2011; Maggio, Shavit, Chapman, & Segal, 2008).

Al fine di indagare se la prole di topi MIA POLY I:C fosse affetta da calo della funzionalità della BEE abbiamo effettuato differenti analisi: colorazioni *in vivo* con Evans blue (FIGURA 25/A), IF per albumina su tessuto cerebrale di topi in età adulta (P90) (FIGURA 25/B), IF per claudina 5 e ZO-1, due proteine coinvolte nel mantenimento dell'integrità delle BEE, su tessuto cerebrale e relative analisi mediante *western blot* (FIGURA 26).

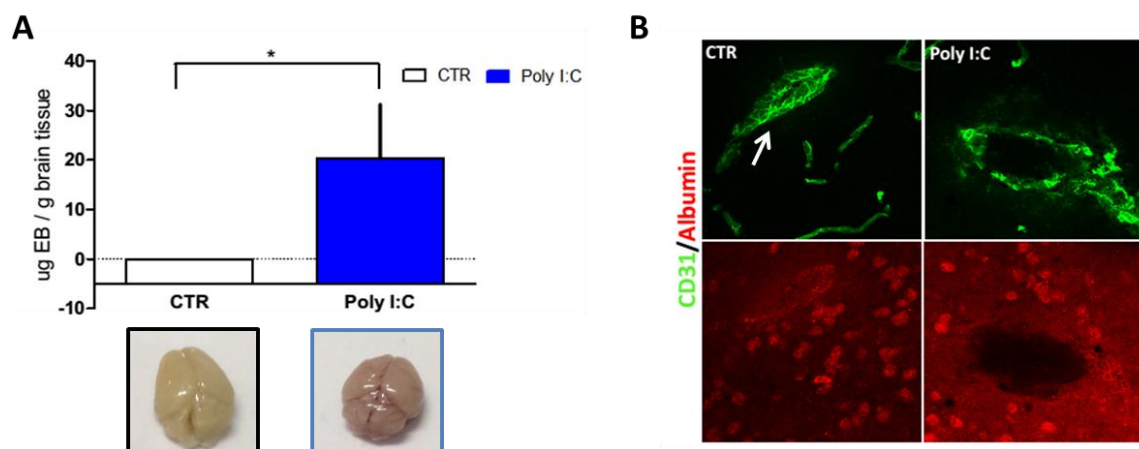


FIGURA 25 – A) QUANTITÀ DI EVANS BLUE EXTRAVASATA NEL TESSUTO CEREBRALE, AL DI SOTTO DEL GRAFICO VI È ANCHE UN'IMMAGINE RAPPRESENTATIVA DI DUE CERVELLI DI TOPI TRATTATI CON IL COLORANTE B) IF PER ALBUMINA E CD31 (CELLULE ENDOTELIALI)

Evans blue (EB) è un colorante vitale con alta affinità per la proteina sierica albumina. Questo colorante è comunemente utilizzato per testare la permeabilità della BEE a macromolecole; albumina è infatti fisiologicamente esclusa dal parenchima cerebrale. Il colorante è disciolto in soluzione fisiologica ed iniettato per via intraperitoneale nei soggetti

sperimentali. Dopo un periodo di 24h dall'iniezione, gli animali sono sacrificati e perfusi con fisiologica per eliminare dall'interno dei lumi vascolari possibili residui di EB. Il cervello essiccato è quindi processato e analizzato tramite spettrofotometria. Come è possibile osservare ([FIGURA 25/A](#)), topi prole di madri trattate a GD9 con POLY I:C presentano una più alta concentrazione di EB a livello cerebrale. Tale fenomeno, è quindi il sintomo di una maggiore internalizzazione di albumina, osservabile anche attraverso specifiche IF ([FIGURA 25/B](#)), ed in ultimo di una maggiore permeabilità della BEE in questi animali.

Per confermare questa osservazione, abbiamo valutato l'espressione di alcune proteine delle *tight junctions*, le quali rappresentano la prima struttura di contenimento a livello dell'unità neurovascolare. Queste sono poste nella zona baso-laterale delle cellule endoteliali, assieme alle *aderens junctions* (Gavard & Gutkind, 2008). Le *tight junctions* limitano la diffusione paracellulare di sostanze idrosolubili dal flusso ematico al tessuto cerebrale e consistono essenzialmente di proteine transmembrana tra le quali vi sono claudine, tricellulina ed occludina, connesse al citoscheletro actinico tramite la zona occludens (ZO-1) (Tscheik et al., 2013). Le proteine delle *tight junctions* sono strutture dinamiche, fisiologicamente soggette a variazioni di espressione. Alterazioni delle *tight junctions* possono portare a gravi compromissioni della BEE con aumentata permeabilità a livello cerebrale. Tali proteine sono state quindi prese in esame e valutate in animali MIA POLY I:C e relativi controlli. In particolare, abbiamo analizzato claudina 5 e ZO-1.

Nell'idea di valutare se il *deficit* della BEE con extravasazione di macromolecole quali l'albumina fosse dovuta probabilmente ad un calo nell'espressione di alcuni dei principali componenti molecolari che ne assicurano la stabilità, le *tight junctions* claudina 5 e ZO-1 ([FIGURA 26/A](#)). Entrambe le proteine appaiono meno espresse dalle analisi in WB e disorganizzate quando osservate in IF. Claudina 5, la *tight junction* maggiormente alterata, mostra un calo del 50% circa di espressione oltre ad un ampio rimodellamento della proteina a livello del vaso. A conferma e controllo del risultato ottenuto sono state effettuate le stesse analisi per *western blot* in topi adulti P90 (*naive male mice*) iniettati con la medesima quantità di POLY I:C ed in topi di sesso femminile utilizzati in prima istanza come madri MIA analizzate dopo lo svezzamento dei piccoli ([FIGURA 26/D](#)). Come già osservato per la suscettibilità all'epilessia ([FIGURE 19-20](#)), i fenomeni di calo dell'espressione delle proteine delle *tight junctions* claudina 5 e ZO-1 appaiono come fenomeni strettamente

connessi al paradigma di stimolazione MIA POLY I:C, ovvero non come epifenomeni procurati dell'infiammazione in se (POLY I:C), ma come risultante di un più sofisticato disequilibrio venutosi a creare durante il periodo di sviluppo embrionale.

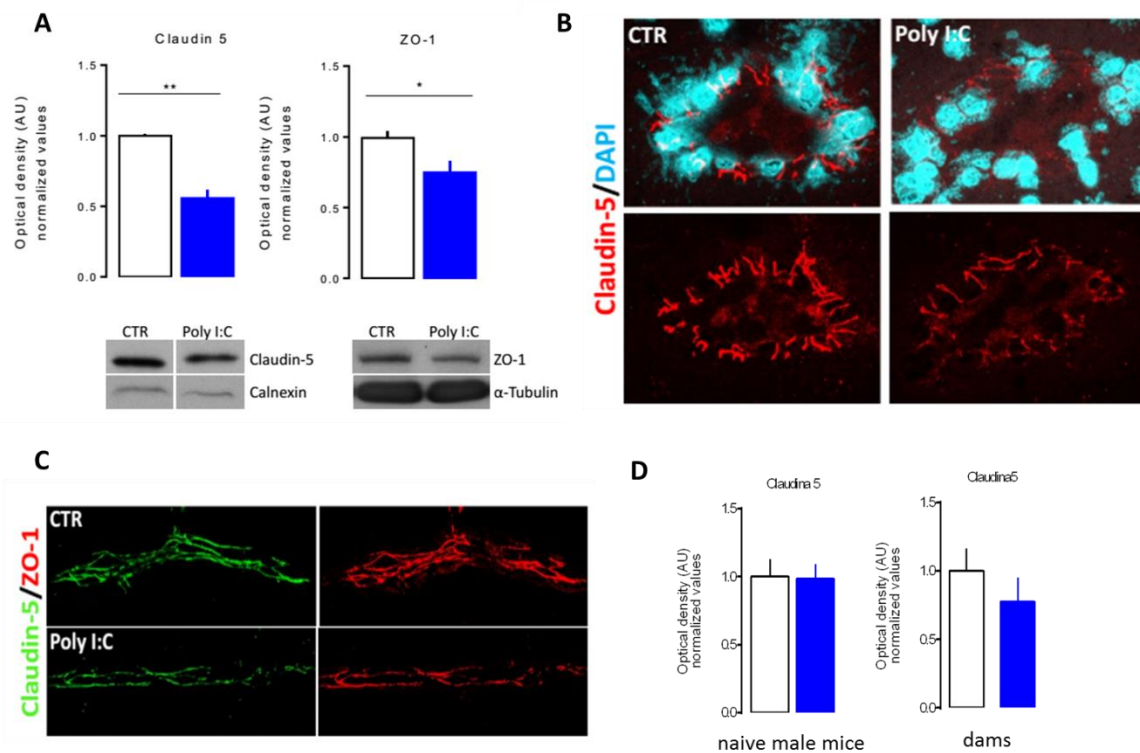


FIGURA 26 – A) ANALISI PER WB DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CLAUDINA 5 E ZO-1 IN ANIMALI P90 PROLE MIA POLY I:C VS CTR B) IF PER CLAUDINA 5 C) IF PER ZO-1 D) CONTROLLI IN ANIMALI P90 NAIVE E MADRI MIA

Claudina 5 è una delle proteine più importanti proteine della classe della *tight junctions*, arricchita di circa 90 volte a livello dei capillari cerebrali rispetto alla restante vascolarizzazione. Le immunolocalizzazioni per claudina 5 mostrano che le proteine *tight junctions* iniziano ad essere espresse a livello dell'interfaccia emato-cerebrale poco dopo l'invasione del parenchima cerebrale da parte dei vasi in via di sviluppo in tutti i mammiferi, compreso l'uomo (Saunders et al., 2012; Virgintino et al., 2004). Nei nostri animali è evidente una disorganizzazione di questa proteina a livello dei vasi ematici (FIGURA 26/B-C).

La delezione di claudina 5 in animali di esperimento, non porta alla mancata formazione delle *tight junctions*, ma piuttosto ad un'aumentata permeabilità dimensione-selettiva (Stamatovic, Keep, & Andjelkovic, 2008), mentre la completa sua completa assenza è

associata a morte neonatale entro 10 ore dalla nascita (Nitta et al., 2003); questo dato ci restituisce un'idea dell'importanza di questa proteina e della sua funzione.

Nel loro insieme, questi risultati dimostrano che una singola iniezione di POLY I:C, somministrata a GD9, induce nella prole una riduzione dell'espressione ed una disorganizzazione delle *tight junctions* claudina 5 e ZO-1. Tali cambiamenti sono associati con un aumento della permeabilità della BEE ed una extravasazione di macromolecole, tra per quali anche albumina.

6.8 Localizzazione dell'albumina a livello astrocitario

Recentemente, il ruolo della barriera emato-encefalica ed alterazioni della sua funzione sono emerse quali possibili iniziatori e causa per le patologie epilettiche. Alcuni studi hanno infatti evidenziato la presenza di albumina a livello del parenchima cerebrale in roditori a seguito di eventi epilettici (van Vliet et al., 2007); tale presenza correla con il numero di crisi epilettiche.

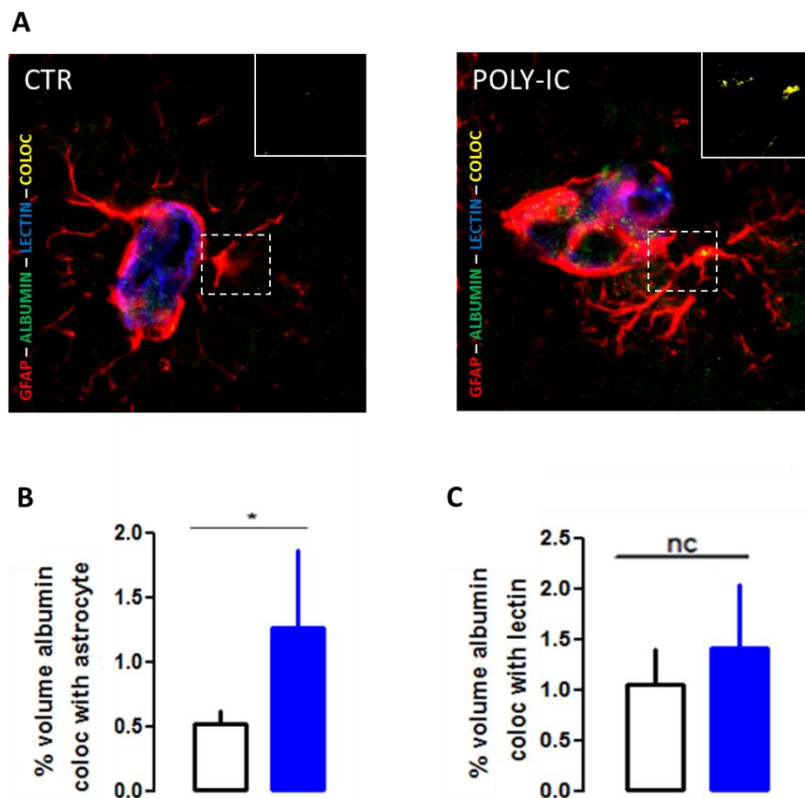


FIGURA 27 – A) IF PER GFAP (ASTROCITI-ROSSO), ALBUMINA (VERDE), LECTINA (VASI SANGUIGNI-BLU), COLOCALIZZAZIONE (GIALLO). B) ANALISI DI COLOCALIZZAZIONE TRA ASTROCITI ED ALBUMINA C) ANALISI DI COLOCALIZZAZIONE TRA LECTINA ED ALBUMINA NORMALIZZATO

Differenti studi hanno testato come la somministrazione *in vivo* di albumina, somministrata ad animali con ridotta funzionalità della BEE, sia in grado di generare correnti ipersincronizzate tra i 5 ed i 49 giorni dopo il trattamento (Ivens et al., 2007).

Alla base di questi fenomeni, differenti studi, hanno posto internalizzazione dell'albumina da parte degli astrociti mediata dall'interazione di quest'ultima con il TGF β -R. A tale internalizzazione farebbe seguito un calo dei canali potassio (Kir 4.1) a livello degli astrociti, con aumento dell'attività neuronale dipendente dall'aumentata presenza di potassio extracellulare attraverso il meccanismo di facilitazione dei recettori NMDA (N-methyl-d-aspartate) (Friedman et al., 2009; Ivens et al., 2007).

Date tali premesse, è stato analizzato il grado di colocalizzazione tra l'albumina e marcatori astrocitari nel tessuto cerebrale di topi adulti MIA POLY I:C ed animali controllo. Come è possibile osservare in [FIGURA 27/A-B](#), l'albumina extravasata colocalizza in modo significativo con le cellule astrocitarie (segnale giallo). Come controllo interno all'analisi, lo stesso tipo di paradigma è stato seguito per l'analisi di colocalizzazione tra albumina e lectina, un *marker* abluminale dei vasi ematici. In questo caso non si evidenziano differenze tra topi MIA POLY I:C e controlli ([FIGURA 27/C](#)). Il segnale colocalizzante dell'albumina con lo *staining* per lectina è probabilmente dovuto alla fisiologica presenza di albumina sierica a livello dei vasi ematici. L'abbassamento di integrità della barriera emato-encefalica ed il conseguente ingresso di molecole plasmatiche a livello del parenchima cerebrale potrebbe quindi portare ad una trasformazione astrocitaria in senso pro-epilettogeno, conducendo le cellule neuronali verso una più bassa soglia di eccitabilità ovvero, in ultimo, ad una più alta suscettibilità a fenomeni epilettici. Ulteriori studi sono necessari per dimostrare questa possibilità in modo diretto.

6.9 Valutazione del microbiota nella prole di modelli MIA

Il microbiota è l'insieme dei batteri presenti sul e nel nostro corpo. Questi possiedono numerose e provate funzioni; il microbiota è ad esempio in grado di proteggere l'ospite da infezioni batteriche patogene, di metabolizzare nutrienti utili a partire dalla dieta, di influenzare l'assorbimento dei grassi. La più grande componente del microbiota umano si trova a livello del tratto gastrointestinale (GI), la sua influenza si estende però ben oltre, costituendo il principale veicolo di comunicazione dell'asse GI-SNC (Borre et al., 2014).

Il rimodellamento e la definizione dei ceppi *core* del microbiota nell'adulto si definiscono durante il periodo prenatale ed immediatamente postnatale; proprio come per i processi relativi al neurosviluppo, il microbiota può essere alterato durante tali periodi, portando a patologie nella vita adulta. Studi condotti su topi *germ-free*, ovvero che non possiedono una flora intestinale, mostrano come questi animali siano affetti da *deficit* sociali e da comportamenti ripetitivi simili a quelli osservabili in persone con sindromi dello spettro autistico (Desbonnet, Clarke, Shanahan, Dinan, & Cryan, 2014). Allo stesso modo, due modelli animali associati a questa sindrome, mostrano anomalie del microbiota (de Theije et al., 2014; Hsiao et al., 2013). Uno studio, ha persino mostrato come, l'introduzione in un modello murino di autismo di un particolare ceppo batterico (*Bacteroides fragilis*) durante l'adolescenza sia in grado di mitigare alcuni dei tratti comportamentali tipici di questa condizione (Hsiao et al., 2013).

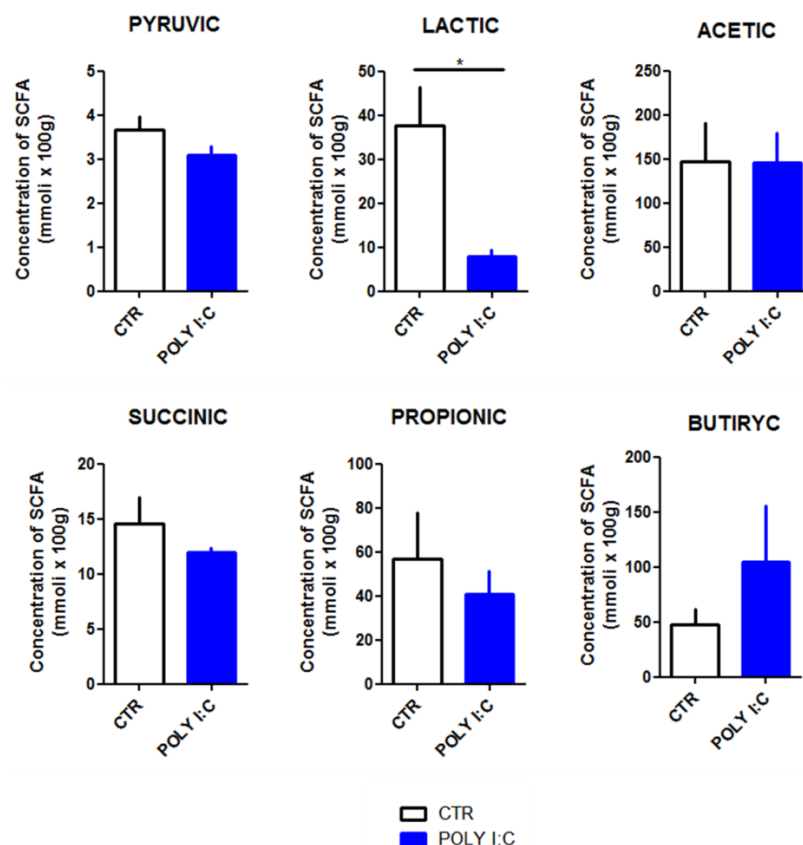


FIGURA 28 – ANALISI DEGLI ACIDI GRASSI A CORTA CATENA IN ANIMALI MIA POLY I:C VS CTR IN FECI DI ANIMALI P90

(SI RINGRAZIA IL PROF. GUGLIEMMETTI)

Il microbioma ha un'origine molto ben definita, la gestante prima e la madre poi tramite l'allattamento. Queste premesse ad uno studio compiuto da Braniste e colleghi, i quali hanno messo in relazione una aumentata permeabilità della barriera emato-encefalico in topi *germ-free* con l'assenza del butirrato, un acido a corta catena metabolita dei batteri residenti a livello intestinale (Braniste et al., 2014), hanno portato alla nostra attenzione il microbiota e gli acidi grassi a corta catena (SCFA).

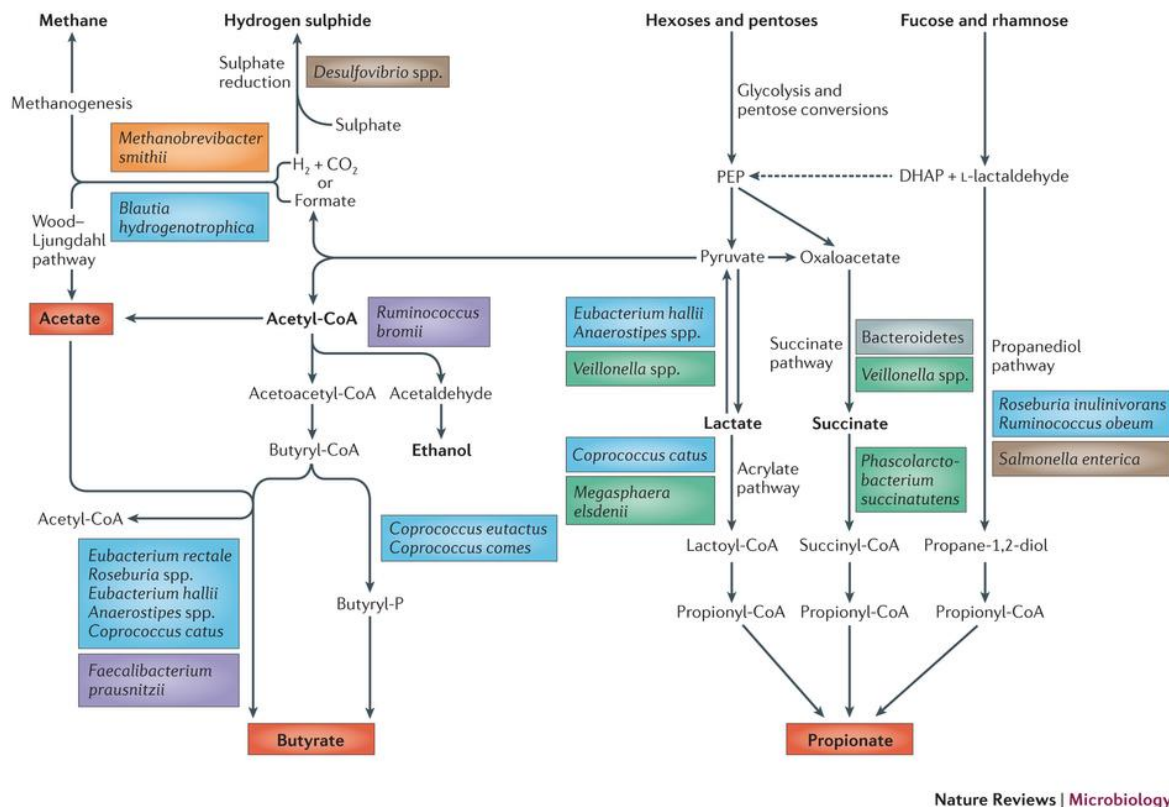


FIGURA 29 – PRINCIPALI PATHWAY DI BIOSINTESI DEL MICROBIOMA (LOUIS, HOLD, & FLINT, 2014)

Gli SCFA sono prodotti del metabolismo batterico utili al mantenimento della barriera a livello dell'epitelio intestinale attraverso il corretto assemblaggio delle proteine *tight junctions* (Korecka et al., 2013; Peng, He, Chen, Holzman, & Lin, 2007); la somministrazione di butirrato è inoltre in grado di consolidare la BEE (Fessler, Chibane, Wang, & Chuang, 2013), evidenziando l'effetto degli SCFA anche a livello cerebrale. Abbiamo quindi analizzato e comparato la concentrazione dei principali acidi grassi a corta catena (SCFA) nelle feci di animali adulti prole MIA POLY I:C con animali controllo (FIGURA 29). Come è possibile osservare in FIGURA 28 non si riscontrano differenze statisticamente rilevanti per quanto

riguarda la presenza di butirrato, piruvato, succinato ed acido propionico (*propionic*) a livello fecale; è invece evidente la scarsa presenza di lattato in animali sottoposti a MIA POLY I:C rispetto ai controlli.

Il significato funzionale di questa variazione, che dimostra una deregolazione a livello del microbiota in topi sottoposti a MIA con POLY I:C, deve essere ulteriormente integrato. Tuttavia, la mancata variazione dei livelli di butirrato esclude che il nostro modello derivi da una profonda modifica del microbiota, tale da giustificare il calo della barriera emato-encefalica rilevato.

6.10 Analisi del pathway di Wnt e claudina5

La funzione barriera della BEE, che si è vista essere alterata in topi MIA POLY I:C, richiede l'azione combinata di molte proteine, tra le quali le *tight junctions* rivestono un ruolo particolarmente importante. Come mostrato in (FIGURA 26) claudina 5 è down-regolata in topo MIA POLY I:C rispetto ai controlli. Questo può spiegare, assieme alle alterazioni di ZO-1, la maggiore permeabilità della BEE mostrata, ma non come questa sia legata al periodo embrionale, ovvero l'origine dell'instabilità della BEE.

L'attivazione del *pathway* di Wnt è associata con molte patologie del SNC quali Alzheimer, schizofrenia e di recente anche epilessia (Huang, Fu, Zhou, & Li, 2015). Il gene Wnt, acronimo di *wingless*, inizialmente identificato in *Drosophila*, è essenziale per determinare a livello cellulare l'espressione di un corretto fenotipo neuronale.

L'attivazione del *pathway* Wnt/ β -catenina e la conseguente traslocazione nucleare di FoxO1 e β -catenina è una delle cause di repressione del promotore di claudina 5 (Gavard & Gutkind, 2008; Liebner et al., 2008); al fine di vagliare la possibilità che questo *pathway* sia coinvolto negli effetti patologici osservati nella prole di topi MIA POLY I:C, sono state effettuate diverse analisi tra le quali: analisi per WB dei livelli di GSK3 β e della sua forma fosforilata (FIGURA 30), analisi della traslocazione nucleare di β -catenina (FIGURA 31), analisi per REAL TIME dei livelli di espressione di PDGF, DKK1 e SNAIL1 (FIGURA 32).

In assenza della stimolazione di Wnt i livelli citoplasmatici di β -catenina sono mantenuti bassi per azione della costante fosforilazione della stessa ad opera di GSK3 β (FIGURA 11/A). La proteina fosfo- β -catenina è quindi ubiquitinata e degradata a livello dei proteosomi. Al contrario, in presenza di ligandi specifici per Wnt, questo lega Fz ed il co-recettore LRP5/6 formando un complesso per il reclutamento a livello nucleare di β -catenina (FIGURA 11/B).

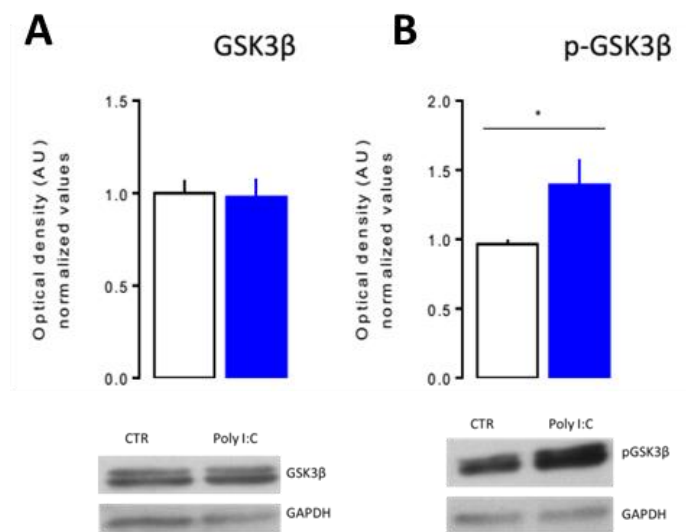


FIGURA 30 – A) ANALISI PER WB DEL MEDIATORE GSK3β B) ANALISI PER WB DEL MEDIATORE FOSFO-GSK3β

Abbiamo quindi valutato nel nostro modello di prole MIA POLY I:C ad E17 l'espressione di fosfo-GSK3β, un regolatore chiave della cascata di attivazione del segnale di Wnt. Come è possibile vedere ([FIGURA 30/B](#)), maggiori livelli di fosfo-GSK3β sono evidenziabili in topi prole di MIA POLY I:C; questo dato è in linea con una maggiore attivazione del *pathway* di Wnt in questi topi (Hur & Zhou, 2010). Come diretta conseguenza è possibile osservare l'innalzamento dei livelli di β-catenina nucleare ([FIGURA 31](#)) valutata mediante analisi d'immagine di IF effettuate su tessuto cerebrale di animali adulti (P90).

L'attivazione del *pathway* di Wnt, ancora osservabile nell'animale adulto, potrebbe quindi essere la causa, o per lo meno concorrere, al calo di espressione di claudina 5 osservato ([FIGURA 26](#)). Attraverso i dati fin qui presentati è possibile far risalire l'attivazione di questo *pathway* già ad E17 ([FIGURA 30](#)), ovvero ad un periodo embrionale temporalmente vicino allo stimolo infiammatorio somministrato alla gestante. Per indagare se questa attivazione è direttamente correlabile allo stimolo proinfiammatorio, abbiamo effettuato analisi per REAL TIME durante una finestra temporale precoce, ovvero a 3, 6 e 24h dallo stimolo con POLY I:C. Come precedentemente osservato, a 6h dallo stimolo, è possibile individuare un aumento transitorio delle citochine proinfiammatorie IL1β ed IL6 ([FIGURA 21](#)), le quali potrebbero portare all'attivazione del *pathway* Wnt/β-catenina. In animali anziani, ad esempio, si verifica un'attivazione di GSK3β proporzionale allo stato infiammatorio degli animali; è inoltre noto che sia il fattore NFκB, sia alcune citochine proinfiammatorie, sono in

grado di modulare i livelli di attivazione di questo fattore cardine nel *signaling* Wnt/ β -catenina (Gustafson & Smith, 2006; Orellana et al., 2015).

Per vagliare questa ipotesi sono stati analizzati per REAL TIME i livelli di espressione di PDGFA, PDGFB, DKK1 e SNAIL1 (FIGURA 31); come si dirà in seguito, tutte molecole strettamente connesse a questo *pathway*.

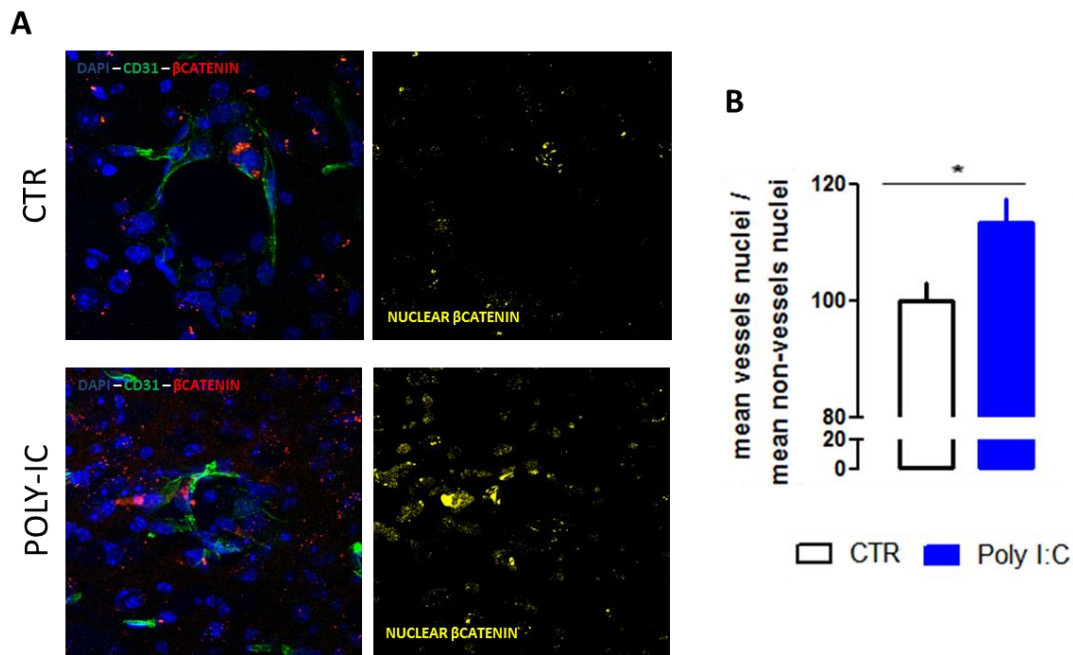


FIGURA 31 – A) IF PER CD31 (VERDE), BETA-CATENINA (ROSSO) E DAPI (BLU), IL SEGNALE INTRANUCLEARE PER BETA-CATENINA, ELABORATO DOPO ANALISI D’IMMAGINE, È VISUALIZZATO IN GIALLO B) ANALISI DEI LIVELLI DI INTENSITÀ DEL SEGNALE NUCLEARE DI BETA-CATENINA IN CELLULE ATTORNO AL VASO SU CELLULE DEL PARENCHIMA IN ANIMALI MIA POLY I:C vs CTR

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) è una citochina biologicamente attiva in forma di dimeri; questi possono essere composti dai due peptidi A e B in differenti combinazioni. L’espressione di PDGF-B è direttamente regolata dall’attività trascrizionale di β -catenina, portando al reclutamento delle cellule murali (Reis et al., 2012). DKK1 (dickkopf-1) è invece una proteina coinvolta nei processi di embriogenesi con funzioni inibitorie rispetto al *pathway* di Wnt mediante l’isolamento del co-recettore LRP6. DKK1, normalmente poco espresso durante l’embriogenesi, è direttamente regolato dall’internalizzazione di β -catenina nel nucleo, agendo come *feed-back* negativo (Busceti et al., 2007).

La down-regolazione di claudina 5 è preceduta dall'aumentata espressione di SNAIL1, un fattore trascrizionale in grado di inibire la trascrizione delle proteine delle *tight junctions*. L'importanza di questo fenomeno è messa in evidenza da studi che dimostrano come l'inibizione di SNAIL1 è sufficiente a rafforzare la barriera dell'epitelio intestinale (Clarke, Francella, Huegel, & Weiser, 2011).

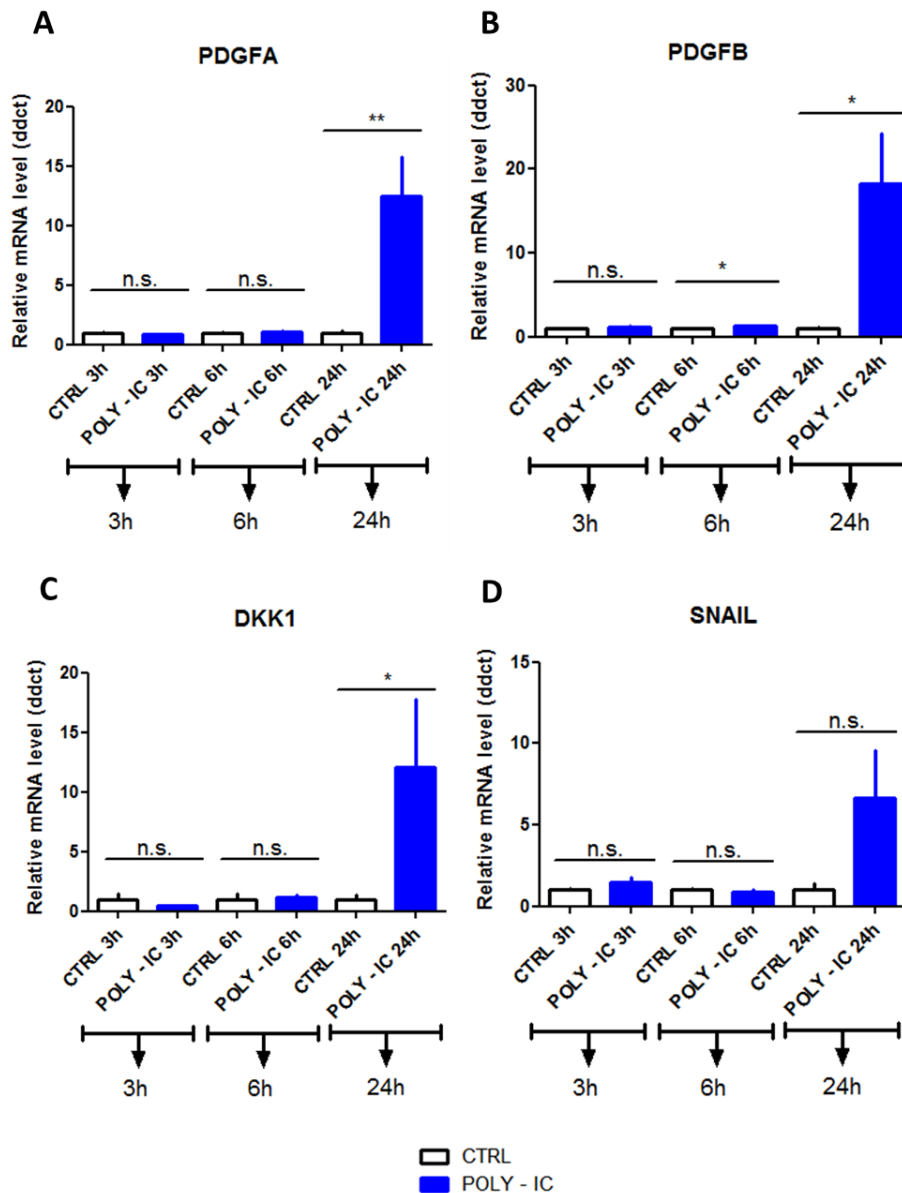


FIGURA 32 – ANALISI PER REAL TIME A 3-6-24H DA MIA POLYI:C E RELATIVI CONTROLLI SU EMBRIONI INTERI

A) PDGFA B) PDGFB C) DKK1 D) SNAIL1

Come è possibile osservare in figura (FIGURA 32), si evidenziano variazioni di PDGFA, PDGFB, DKK1 e SNAIL1 a 24 ore dallo stimolo infiammatorio in embrioni di madri sottoposti a MIA con POLY I:C rispetto ai controlli. Tutte le variazioni sono significative a 24h dallo stimolo

tranne per SNAIL1, il quale mostra comunque una tendenza interessante (FIGURA 32/D). PDGF-B mostra alterazioni significative, anche se di proporzioni contenute, già a 6h dallo stimolo infiammatorio (FIGURA 32/B).

Le tempistiche e le strette relazioni di queste molecole con il *pathway* Wnt/ β -catenina concorrono a rafforzare l'ipotesi di un'attivazione da parte di parte di citochine proinfiammatorie di Wnt con alterazioni a valle visibili già a 24h (FIGURA 32), osservabili ad E17 (FIGURA 30) e che perdurano, in topi prole di madri MIA POLY I:C, fino all'età adulta (P90) (FIGURA 31).

6.11 Analisi del coverage pericitario dei vasi a livello cerebrale

Il mantenimento delle *tight junctions* tra le cellule endoteliali e l'omeostasi delle cellule che compongono l'unità neurovascolare dipendono in larga parte della quantità di periciti che ricoprono i vasi cerebrali. L'endotelio del SNC presenta fisiologicamente un *coverage*, ovvero una copertura, di molto maggiore rispetto ai tessuti periferici (60-80%). Questo suggerisce come i periciti siano particolarmente rilevanti nei vasi che irrorano il tessuto cerebrale.

I periciti, sulla cui funzione si è a lungo speculato, possiedono un ruolo importante nella formazione e nel mantenimento della barriera emato-encefalica, tanto nell'embrione quanto nell'adulto.

Visti i risultati fin qui ottenuti si è deciso di indagare più a fondo il ruolo dell'unità neurovascolare nella patogenesi dei topi MIA POLY I:C. Ci si è concentrati nello specifico sui peritici, ovvero sulle cellule che concorrono alla formazione della barriera emato-encefalica, prima ancora che la genesi degli astrociti sia avvenuta (Daneman, Zhou, Kebede, & Barres, 2010). Come è possibile osservare dall'immagine (FIGURA 33) i vasi cerebrali di topi adulti MIA POLY I:C presentano una copertura minore dei vasi sanguigni da parte dei periciti rispetto ai relativi controlli; come specificato, si tratta di dati preliminari.

I periciti sono richiesti per il corretto sviluppo della vascolarizzazione cerebrale durante il periodo neonatale; questi stabilizzano i vasi sanguigni durante la loro formazione ed inducono la corretta formazione della BEE durante la vita postnatale. Come detto, in condizioni fisiologiche i periciti avvolgono i vasi cerebrali con una copertura tra il 60 e l'80% (Armulik, Abramsson, & Betsholtz, 2005); con l'avanzare dell'età questa percentuale tende

fisiologicamente a ridursi, con un conseguente aumento del traffico trans-endoteliale e paracellulare a livello dei vasi ematici (Bell et al., 2010).

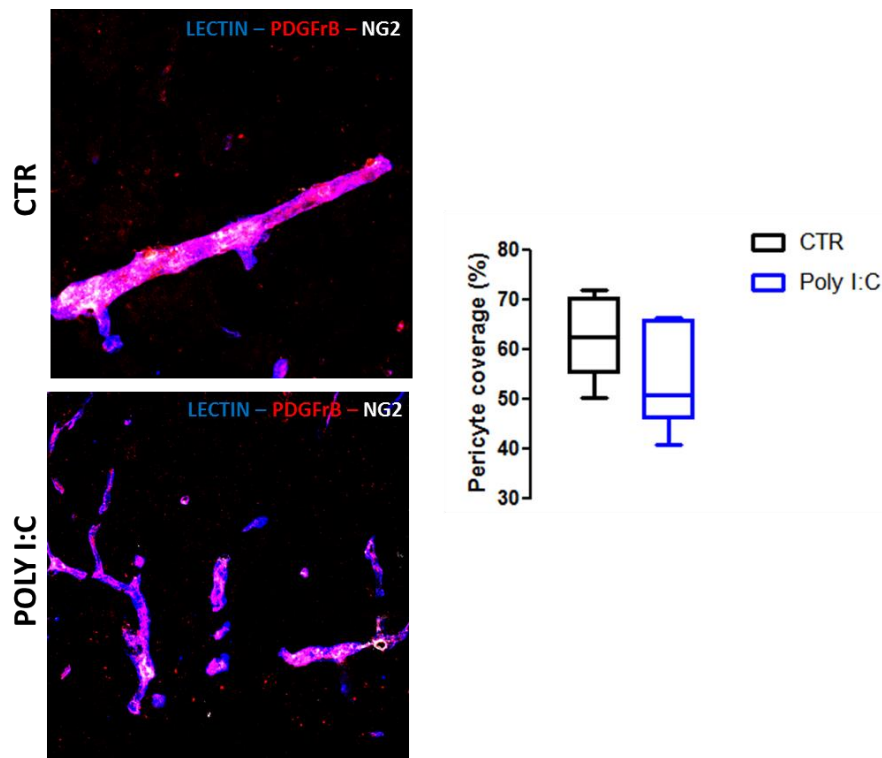


FIGURA 33 – IF PER LECTINA (BLU), PDGFRβ (ROSSO) ED NG2 (BIANCO) METTONO IN LUCA LA COPERTURA DEI VASI EMATICI DA PARTE DEI PERICITI NEL TESSUTO CEREBRALE DI ANIMALI P90 MIA POLY I:C VS CTR (DATI PRELIMINARI)

Un sostanziale calo dei periciti porta ad un calo di espressione delle *tight junctions*, come quello da noi osservato, che può portare in ultimo ad una maggior permeabilità della BEE. Il *deficit* del *coverage* pericitario evidenziato in questo studio potrebbe concorrere al mantenimento, ed in vero anche al progressivo aggravarsi, dei fenomeni patologici evidenziati nella prole MIA POLY I:C.

6.12 Ruolo di CD248 e PDGFB nello sviluppo cerebrale

I periciti controllano le funzioni della BEE almeno in due modi: regolando negativamente l'espressione di geni per la fenestrazione e la permeabilità transendoteliale (plasmalemma vesicle-associated protein - PLVAP) ed inducendo la polarizzazione degli astrociti, ovvero aumentando i contatti tra *endfeet* astrocitari ed endotelio (EIAli et al., 2014). Come precedentemente detto i periciti rispondono positivamente al PDGF-BB, il più potente fattore trofico per questo tipo cellulare, secreto dalle cellule endoteliali durante lo

l'accrescimento dei vasi ematici. L'importanza di questo fattore per la sopravvivenza e proliferazione dei periciti è percepibile dall'utilizzo di topi deficitari per il segnale PDGF-BB come modelli animali utili allo studio dei fenomeni legati al depauperamento dei periciti (Bell et al., 2010).

L'espressione di PDGF-B è aumentata a seguito dell'attivazione del *pathway* Wnt/ β -catenina (Reis et al., 2012); tale fenomeno è osservabile anche nel nostro modello sperimentale (FIGURA 32/B). Tuttavia differenti analisi (i.e. *coverage* pericitario) ed il quadro del fenotipo patologico in topi prole di madri MIA POLY I:C, indicano un *deficit* di questo tipo cellulare in questi animali.

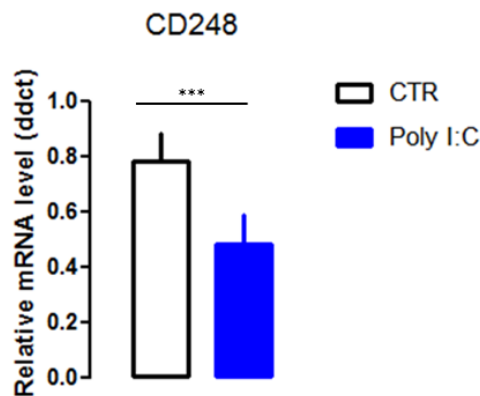


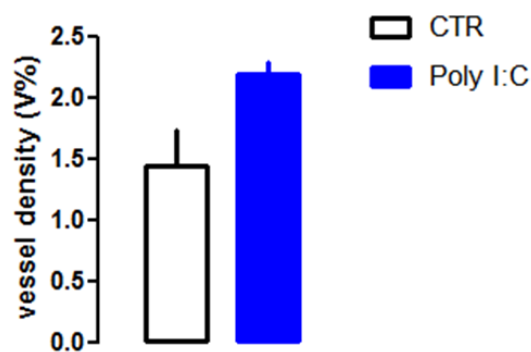
FIGURA 34 – ANALISI PER REAL TIME DI CD248 /TEM1/ENDOSIALINA IN CERVELLI DI EMBRIONI E17

Per completare la caratterizzazione dei periciti anche a tempi brevi rispetto all'*hit* immunologico e per verificare l'efficacia del *signaling* iniziato da PDGF-BB per la sopravvivenza dei periciti, sono stati valutati i livelli di espressione di CD248/TEM1/endosialina nel tessuto cerebrale di embrioni E17 tramite REAL TIME (FIGURA 34). CD248/TEM1/endosialina, per il quale d'ora in avanti saranno utilizzati nel testo indistintamente i tre eponimi, è un recettore di superficie di tipo C lectin-like con funzione sconosciuta espresso a livello delle proiezioni citoplasmatiche dei periciti in vasi di nuova formazione. L'ortologo murino mEs possiede il 77% di omologia con il gene umano (Rupp et al., 2006). CD248 non è espresso da vasi sanguigni quiescenti CD31-positivi ma solo in quelli di origine tumorale (neo-vascularizzazione) e/o durante lo sviluppo embrionale (Bagley et al., 2008). CD248 è inoltre implicato nella proliferazione dei periciti ed alcuni studi mostrano come la sua assenza o cali della sua espressione rendano inefficacie il *signaling* di PDGF-BB.

Test *in vitro* mostrano che il *knockdown* di CD248 non altera di per se l'espressione di PDGFrB a livello di mRNA suggerendo che questo agisca a valle dell'attivazione del *signaling* PDGF-BB-PDGFrB, incidendo sui livelli di fosforilazione di ERK1/2 e *c-fos* conseguenti l'attivazione del *pathway* (Demoulin, 2010; Tomkowicz et al., 2010). CD248/TEM1/endosialina avrebbe quindi il controllo della risposta dei periciti rispetto allo stimolo proliferativo PDGF-BB. Come è possibile osservare in [FIGURA 34](#) embrioni E17 MIA POLY I:C, mostrano un drastico calo di espressione per CD248 a livello del tessuto cerebrale rispetto ai controlli. La mancata espressione di questo importante fattore, a breve tempo dall'insulto immunologico nelle gestanti, potrebbe essere la causa dell'inefficacia del *signaling* di PDGF-BB ovvero del mancato reclutamento dei periciti in sede vascolare, e quindi, dei difetti della BEE osservati in questi animali in età adulta.

6.13 Densità dei vasi ematici a livello cerebrale

L'albero cerebrovascolare origina da una larga anastomosi alla base dell'encefalo chiamata circolo di Willis. Si stima vi siano fino a 700km di vasi cerebrali perfusi in un uomo adulto e che piccoli mammiferi come i topi possano avere capillari ogni $\sim 15\mu\text{m}$ (Winkler, Bell, & Zlokovic, 2011).



[FIGURA 35 – DENSITÀ DEI VASI CEREBRALI IN ANIMALI ADULTI MIA POLY I:C VS CTR \(DATI PRELIMINARI\)](#)

I periciti possiedono numerosi ruoli durante l'angiogenesi, promuovono infatti la sopravvivenza e la migrazione delle cellule endoteliali durante l'embriogenesi ma acquisiscono invece funzioni opposte a breve termine dalla nascita (Winkler et al., 2011). Date le alterazioni a carico dei periciti fin qui evidenziate ed il noto ruolo di questo tipo cellulare nel mantenimento e formazione dell'albero vascolare a livello cerebrale, sono state effettuate alcune analisi per la densità dei vasi in topi adulti MIA POLY I:C rispetto ai relativi

controlli. Pur trattandosi di dati preliminari, è bene specificarlo, risulta molto interessante la tendenza, mostrata dal grafico, dei topi figli di madri trattate con POLY I:C a GD9 di avere un albero cerebrovascolare più esteso del normale (FIGURA 35). Durante lo sviluppo del SNC, una perdita massiva od il distaccamento dei peritici dall'endotelio può risultare in iperproliferazione delle cellule endoteliali con mantenimento della densità vascolare e delle sue ramificazioni (Hellström et al., 2001). Al contrario un calo del segnale PDGF-BB prodotto dalle cellule endoteliali può portare ad una regressione o iperproliferazione del letto vascolare, suggerendo che i peritici possono avere differenti effetti sull'architettura vascolare in ragione della loro quantità (Enge et al., 2002).

6.14 Analisi dello stato di salute della placenta

Una delle prime indicazioni di sofferenza fetale, avente un vasto riscontro in letteratura, è il peso della placenta e del feto stesso. Come si vede in (FIGURA 36/A), il peso delle placente di embrioni MIA POLY I:C non varia rispetto ai controlli. Negli umani una variazione maggiore al 10%, rispetto al peso fisiologico, viene considerata patologica. Durante questo studio, sono stati inoltre presi in esame il numero di piccoli partoriti, il peso degli embrioni ad E17 e l'incremento di peso dei topi gravidi tra il giorno GD9 e GD17 nel protocollo MIA POLY I:C e relativi controlli. Anche in questi casi, non si osserva alcuna variazione significativa (FIGURA 36/B-D). Come discusso in precedenza, la placenta rappresenta un organo attivo durante la gestazione. Questa non si limita infatti a tramite per le sostanze nutritive tra l'embrione e la gestante, ma esercita forti influenze anche a livello immunologico. Diversi studi condotti utilizzando paradigmi di stimolazioni immunitaria in gravidanza, dimostrano la produzione di citochine proinfiammatorie da parte in questo organo. Si riporta, ad esempio, l'aumento di IL1 β , IL6 e TNF α , in seguito a trattamento con LPS o POLY I:C nel periodo GD16-18 in roditori (Ashdown et al., 2006; Urakubo, Jarskog, Lieberman, & Gilmore, 2001). Tali osservazioni hanno portato alla formulazione dell'ipotesi che le citochine prodotte a livello placentare possano concorrere alle alterazioni del neurosviluppo *in utero*.

Per indagare questo la produzione di citochine da parte del tessuto placentare nel paradigma di stimolazione da noi utilizzato, sono state effettuate analisi per ELISA su omogenato di tessuto placentare per le citochine proinfiammatorie IL6, IL1 β ed antinfiammatoria IL10 ad E17; tutti i valori sono risultati al di sotto dei 15pg/ml, ovvero al di sotto del *range* di rilevanza dei kit elisa da noi utilizzati (dati non mostrati).

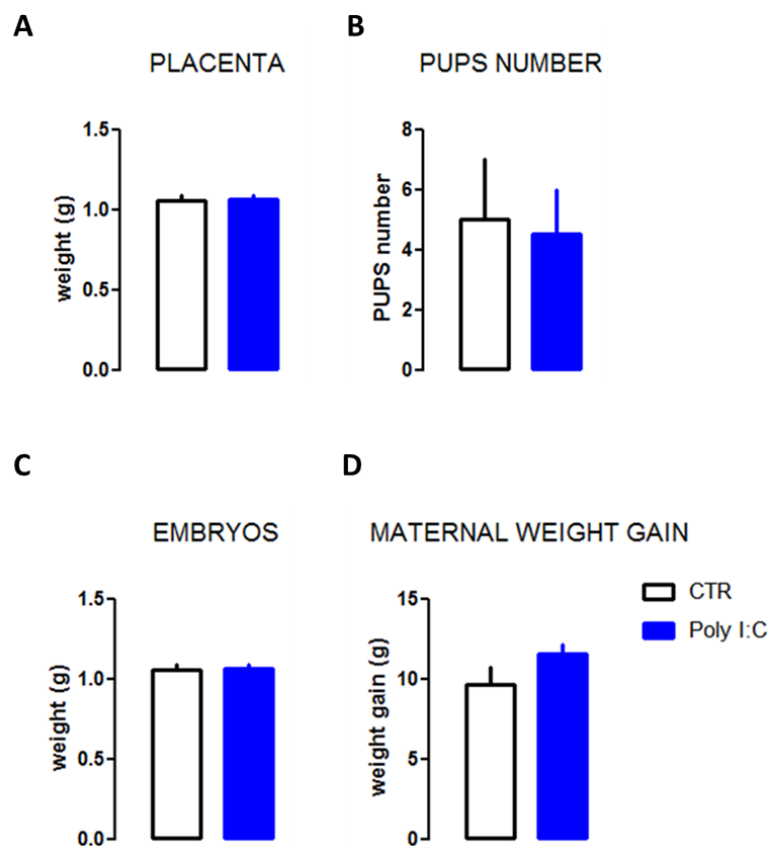


FIGURA 36 – A) PESO PLACENTARE DI EMBRIONI E17 MIA POLYI:C VS CTR B) NUMERO DI EMBRIONI E17 MIA POLYI:C VS CTR C) PESO DEGLI EMBRIONI E17 MIA POLYI:C VS CTR D) INCREMENTO DI PESO NEI TOPI GRAVIDI TRA GD9 E GD17

6.15 Valutazione della percentuale di vasi di origine embrionale (plate corionico + villi)

La placentazione emocoriale è caratterizzata da due cambiamenti dell'utero: la differenziazione dell'endometrio in decidua e la trasformazione delle arterie spirali, con conseguente riduzione della resistenza ovvero incremento della pressione e del flusso ematico (FIGURA 37/C) (Moffett & Loke, 2006). Viste le modificazioni presenti a livello dei vasi cerebrali di topi prole MIA POLY I:C rispetto ai controlli si è deciso di indagare se alterazioni del letto vascolare fossero presenti anche nel tessuto placentare. A tale fine è stata effettuata un'analisi d'immagine su fettine di placenta colorare con HeE con relativa stima della percentuale di vasi di origine embrionale presenti. La FIGURA 37 mostra alcune immagine di placente, dalle quali è possibile osservare la grande variabilità nella quantità di

villi presenti all'interno del tessuto placentare ed un grafico (FIGURA 37/B) riportante i valori ottenuti calcolando la percentuale di tessuto occupata dai villi e dal plate corionico, ovvero dai vasi di origine embrionale. Come è possibile osservare vi è una significativa diminuzione di questo parametro in placentate derivanti da topi MIA POLY I:C rispetto ai controlli.

Anche per la placenta, si è voluto testare se vi fossero differenze per il marker pericitario CD248.

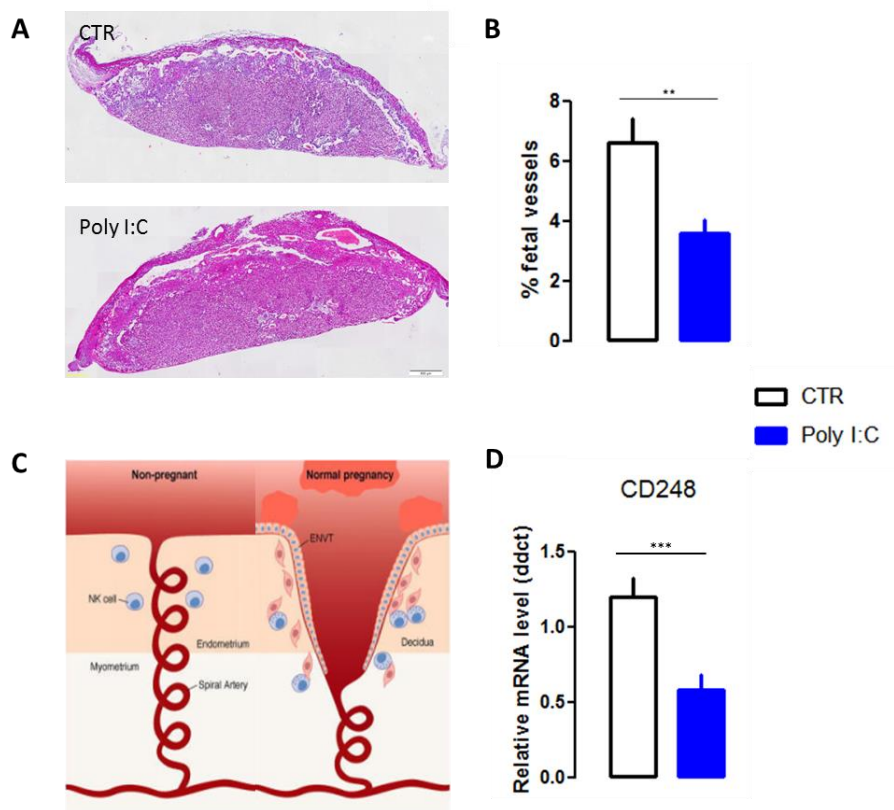


FIGURA 37 – A) SEZIONI DI PLACENTA COLORATE PER H&E B) ANALISI DELLA PERCENTUALE DI VASI DI ORIGINE FETALE C) SCHEMA SULLA TRASFORMAZIONE DELLE ARTERIE SPIRALE D) ANALISI PER REAL TIME SUI LIVELLI DI ESPRESSIONE DI CD248 NEI TESSUTI PLACENTARI DI FETI MIA POLY I:C VS CTR

Come è possibile osservare (FIGURA 37/D) placentate derivate da topi MIA POLY I:C presentano bassi livelli di CD248, in stretta relazione con il dato osservabile a livello cerebrale (FIGURA 35). Come già discusso i periciti esercitano un notevole influsso sulla crescita e maturazione dei vasi ematici. La placenta, che è un organo effimero, richiede durante la sua formazione una crescita vascolare molto rapida e di notevole portata. *Deficit* di espressione di *marker*

pericitari associati alla crescita vascolare, quali CD248, possono ben giustificare le alterazioni visibili a nel labirinto.

Le analisi appena presentate ci hanno quindi permesso di confermare a livello molecolare l'esistenza di un difetto nei processi di neovascolarizzazione della placenta di embrioni MIA POLY I:C rispetto ai controlli. Il dato riportante un calo dell'espressione di CD248 ([FIGURA 37/D](#)) infatti correla con la valutazione morfometrica di un calo della vascolarizzazione di origine embrionale ([FIGURA 37/B](#)).

7 Discussione

I risultati qui presentati, in parte già discussi nelle relative sezioni, mostrano la validità dei modelli MIA nel riprodurre fenotipi patologici caratteristici di sindromi dello spettro autistico, schizofrenia ed epilessia nella prole degli animali trattati. Nel presente studio è stato utilizzato un paradigma di stimolazione con POLY I:C, in grado di mimare infezioni di tipo virale a GD9, un periodo della gravidanza posto alla fine del primo trimestre (Clancy et al., 2001). La somministrazione di 2 mg/Kg i.p. ha inteso mimare infezioni di viene entità nella gestante, esenti da segni di *stress* o malessere nell'animale. Tale stimolo, pur rappresentando solo il 40% della quantità di POLY I:C comunemente utilizzata in letteratura (Boksa, 2010; Meyer et al., 2005; Meyer et al., 2008; Meyer et al., 2006; Shi et al., 2005), si è dimostrato il grado di determinare un significativo aumento dei livelli plasmatici di IL6 nei topi trattati (FIGURA 16). L'analisi comportamentale effettuata su animali prole MIA in età adulta, ovvero durante il periodo post-puberale, il più rilevante per la diagnosi di malattie del neurosviluppo negli umani (Blas-Valdivia et al., 2009; Flores et al., 2005), hanno mostrato *deficit* della capacità di apprendimento e socialità, oltre ad una propensione a comportamenti ripetitivi in topi MIA POLY I:C rispetto ai controlli (FIGURA 17), in accordo con i dati presenti in letteratura (Coyle et al., 2009; Golan et al., 2005). Questi test ed il modello utilizzato sono particolarmente rilevanti a fronte del legame, presente anche negli umani, tra malattie neurologiche, e psichiatriche in particolare, e diagnosi in base a criteri comportamentali (Kazdoba et al., 2015).

Il presente lavoro inoltre, in accordo con una recente pubblicazione (Pineda et al., 2014), mostra come topi MIA POLY I:C siano affetti da una maggior suscettibilità a fenomeni epilettici (FIGURA 19). Questo dato, fornito da Elisa Focchi, arricchisce il quadro di patologie riproducibili dal paradigma MIA, sia per quanto riguarda le sindromi epilettiche in sé, sia per quanto riguarda le patologie dello spettro autistico. Questo perché, soggetti affetti da tale sindrome, presentano crisi epilettiche sporadiche con una frequenza 10 volte superiore rispetto alla popolazione generale (Knuesel et al., 2014).

Pur essendo nota in letteratura la stretta associazione tra stati epilettici e neuroinfiammazione (De Simoni et al., 2000; Jankowsky & Patterson, 2001; Turrin & Rivest, 2004), i livelli delle principali citochine infiammatorie valutati negli animali MIA POLY I:C in età adulta (P90) non restituiscono il quadro di una prolungata situazione infiammatoria. Sia il trascrittoma delle citochine proinfiammatorie IL1 β ed IL6 (dati non mostrati), le valutazioni morfologiche della componente microgliale (FIGURA 23-24), sia le analisi WB di *marker* astrocitari (FIGURA 23/D), non evidenziano alterazioni in senso infiammatorio negli animali MIA POLY I:C in età adulta. È invece osservabile, a brevi tempi dall'insulto infiammatorio, un aumento della trascrizione delle citochine IL1 β ed IL6 (FIGURA 21/A-B) a 6h dall'*hit*. Queste citochine sono indicate da numerosi autori come le principali artefici dei fenotipi patologici conseguenti il MIA.

Il presente studio intende dimostrare che i fenotipi patologici osservati in animali adulti MIA POLY I:C sono il risultato di una complessa serie di alterazioni avvenute a carico della barriera emato-encefalica e della rete vascolare cerebrale in età precoce. Una BEE sana assicura il mantenimento di un microambiente ottimale per la crescita neuronale, impedendo l'ingresso a proteine sieriche normalmente escluse dall'encefalo, quali albumina, trombine e proteasi, le quali, se introdotte a livello del parenchima cerebrale, possono aumentare l'eccitabilità della rete neuronale (Han et al., 2011; Maggio et al., 2008). Attorno al 1930 Aird e Cobb mostrarono come specifici coloranti vitali fossero in grado di colorare il parenchima cerebrale a seguito di crisi epilettiche in animali da esperimento. A seguito di tali esperimenti si rafforzarono le teorie che vedono legati fenomeni epilettici ed alterazioni della BEE. Si unirono, in seguito, studi che evidenziano l'aumento della pressione vascolare e della vasodilatazione cerebrale durante le crisi epilettiche (Bolwig, Hertz, & Westergaard, 1977; Petito, Schaefer, & Plum, 1977). Tali fenomeni non si limitano ai modelli animali, ma sono documentati anche in pazienti, nei quali l'intensità e la durata delle crisi spesso si correla con il danno delle BEE (Cornford & Oldendorf, 1986; Ivens et al., 2010). Come evidenziato dalle analisi *in vivo*, effettuate con il colorante Evans Blue (FIGURA 25/A), e dalle IF per albumina su tessuto cerebrale (FIGURA 25/B), topi MIA POLY I:C mostrano difetti della permeabilità della BEE in età adulta. Dette anomalie si correlano con la minor espressione delle proteine delle *tight junctions* claudina 5 e ZO-1 (FIGURA 26).

Come anticipato, il POLY I:C è un agonista del TLR3 in grado di mimare infezioni di tipo virale. Tale infezione, nel modello MIA, viene ricreata durante il periodo della gestazione, peculiare sotto molti punti di vista.

Infezioni virali in siti periferici, anche se causate da virus neurotrofici, difficilmente arrivano a causare infezioni a livello del SNC (Barzon et al., 2015). Questo assunto si dimostra però debole in topi in età giovanile, i quali sono maggiormente soggetti ad encefaliti virali rispetto a topi adulti (Sabin & Olitsky, 1937); un'osservazione pubblicata più di 80 anni fa' da Albert Bruce Sabin, famoso virologo che sviluppò negli anni '50 il vaccino contro la poliomielite. Tale fenomeno non si limita agli animali da esperimento o ai virus con tropismo neuronale, ma è presente anche nella specie umana (Gaensbauer, Lindsey, Messacar, Staples, & Fischer, 2014).

Alcuni autori hanno proposto come causa di questa maggior suscettibilità una BEE la sua immaturità, non tenendo conto, che le *tight junctions* e molte delle strutture che compongono la BEE nell'adulto, sono già presenti in età prenatale (Saunders et al., 2014; Saunders et al., 2012). Claudina 5, ad esempio, è espressa a livello dell'interfaccia emato-cerebrale poco dopo l'invasione del parenchima cerebrale da parte dei vasi in via di sviluppo in tutti i mammiferi, uomo compreso (Saunders et al., 2012; Virgintino et al., 2004).

In questo studio si è mostrato come i fenotipi patologici osservati in topi MIA POLY I:C siano strettamente dipendenti dal periodo di stimolazione del sistema immunitario. L'assenza di fenomeni epilettici in animali trattati in età avanzata con POLY I:C a seguito di iniezione con acido kainico ([FIGURA 20](#)), e l'assenza di albumina, fisiologicamente esclusa dal parenchima cerebrale, in topi trattati in età adulta con POLY I:C ([FIGURA 26/D](#)). Questi sono la prova che i *deficit* mostrati, sono la conseguenza della stimolazione immunologica durante il periodo gestazionale, piuttosto che dello stato infiammatorio in sé. Ciò convalida l'idea della gravidanza come finestra di particolare suscettibilità agli eventi infiammatori per il nascituro (Fortier et al., 2007; Zuckerman & Weiner, 2005).

Il calo delle funzioni della BEE quindi, così come la maggior suscettibilità all'epilessia, risulta essere un fenomeno connesso al paradigma di stimolazione MIA POLY I:C durante il periodo di sviluppo embrionale.

Numerosi fattori nell'ospite regolano l'integrità della barriera emato-encefalica, sia per proteggere il SNC dall'invasione di patogeni, sia, se necessario, per aumentare il passaggio di leucociti verso quegli stessi territori (Miner & Diamond, 2015). L'abbassamento della BEE, ovvero l'aumento della sua permeabilità, nella prole MIA POLY I:C potrebbe risultare dalla diretta interazione del POLY I:C con le strutture cerebrali dell'embrione. Clarke e colleghi (Clarke et al., 2011) suggeriscono come i TLR, presenti sull'endotelio, rispondano a segnali batterici e virali evolutivamente conservati con un abbassamento delle funzioni di barriera; questa risposta sarebbe alla base del potere invasivo di molti patogeni. L'aumento di TGF β ed il conseguente aumento transiente di SNAIL1, da noi mostrato in [FIGURA 33/D](#), porterebbe alla down-regolazione delle *tight junctions*, permettendo ai patogeni il passaggio attraverso le barriere endoteliali.

A valle del TLR3 si trova l'adattatore TRIF ed i fattori di trascrizione CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein), AP1 (activator protein 1), NF κ B (nuclear factor- κ B), IRF3 ed IRF7 (interferon-regulatory factors). L'attivazione del TLR3 porta normalmente alla produzione di citochine proinfiammatorie e dell'interferone di tipo 1 ([FIGURA 22](#)) (O'Neill et al., 2013; Yamamoto et al., 2003). I risultati qui presentati, in particolare l'assenza di variazione per quanto riguarda IFN β , fanno pensare che il sistema immunitario del feto abbia subito un'attivazione secondaria allo stimolo con POLY I:C. Le vie di segnalazione a valle di IFN α e β attivano un programma di risposta antivirale attraverso il recettore IFN di tipo I. Tale programma include il rafforzamento della BEE attraverso la formazione di *tight junctions* in maniera Rac-1-dipendente (Daniels & Klein, 2015). Nel modello animale qui presentato non si evidenziano significative variazioni nell'espressione dell'interferone beta (IFN β) ([FIGURA 21/C](#)) in embrioni di madri trattate con POLY I:C rispetto al gruppo controllo.

Differenti autori hanno già riportato l'aumento dei livelli di mRNA per le citochine IL1 β , TNF α ed IL6 a livello dell'encefalo di roditori sottoposti a MIA trattati con differenti composti immuno-stimolanti. Non vi è però *consensus* sull'entità di queste variazioni (Gayle et al., 2004; Liverman et al., 2006; Paintlia et al., 2004). Differenze nelle metodiche di stabulazione degli animali, nelle tempistiche di accoppiamento, nella qualità e quantità

dell'agente immuno-stimolante potrebbero essere all'origine delle discrepanze che si riscontrano.

Il trattamento di BMECs (bone marrow microvascular endothelial cell) con TNF α o IL1 β attivano il *pathway* della chinasi RhoA, il quale degrada le *tight junctions* aumentando la permeabilità del monostrato di BMEC *in vitro* (Miner & Diamond, 2015). In accordo con quanto detto, topi KO per TLR3 mostrano una minor produzione sistemica di IL6 e TNF α esibendo un minor calo delle funzioni della BEE in seguito ad infezioni con WNT (West Nilo Virus) rispetto ad animali *wild type* (Roe, Orillo, & Verma, 2014).

Dai dati qui presentati risulta chiaro che l'insulto infiammatorio a GD9 ha effetti repentini sulla prole in termini di infiammazione (FIGURA 21), senza tuttavia essere la causa di un prolungato stato infiammatorio nell'animale adulto. In altri termini, gli effetti comportamentali e di suscettibilità all'epilessia osservati in animali MIA POLY I:C adulti non sono giustificabili a fronte dello stato infiammatorio esibito in età adulta. A rivestire un ruolo di particolare interesse per questo lavoro sono invece le variazioni della barriera emato-encefalica, osservati con differenti *marker*, sia nella fase embrionale, sia in età adulta.

Il microbiota gastrointestinale è stato recentemente identificato come uno dei modulatori dell'integrità della BEE. L'espressione di occludina e claudina 5 da parte delle cellule endoteliali *in vivo* è diminuita in topi *germ-free* e positivamente modulata dalla somministrazione di butirrato, un acido grasso a corta catena (Fessler et al., 2013). Topi *germ-free*, ovvero che non possiedono una flora intestinale, mostrano, inoltre, sintomi comportamentali tipici delle sindromi dello spettro autistico (Braniste et al., 2014; Desbonnet et al., 2014). Dato che la distruzione della BEE avviene in topi *germ-free* di tutte le età, la colonizzazione dell'intestino da parte di una flora batterica normale in giovane età potrebbe contribuire alle proprietà età-dipendenti della BEE, di cui si è discusso in precedenza, durante le infezioni virali (Miner & Diamond, 2015). Alterazioni del microbiota, non riscontrate in questo studio (FIGURA 29), avrebbero potuto spiegare il fenomeno di persistenza del danno alla BEE. Il microbiota è infatti un'entità che si instaura precocemente nell'infante ed il cui *core* di ceppi batterici, a meno di gravi patologie, rimane immutato lungo tutta la vita dell'individuo (Borre et al., 2014).

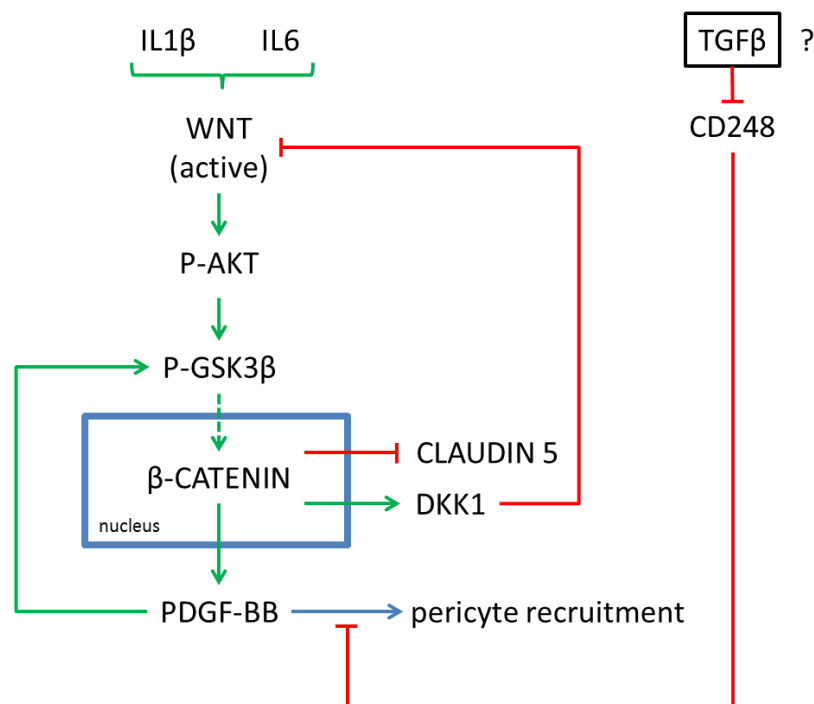
L'attivazione del *pathway* Wnt/ β -catenina, e la conseguente traslocazione nucleare di FoxO1 e β -catenina, è una delle cause conosciute di repressione del promotore di claudina 5 (Gavard & Gutkind, 2008; Liebner et al., 2008). L'attivazione del *pathway* di Wnt β -catenina, spesso associata a patologie del SNC quali Alzheimer, schizofrenia ed epilessia (Huang et al., 2015), è essenziale per lo sviluppo dell'organismo. Tale segnale è infatti fortemente associato con l'allungamento del tubo neurale attraverso il processo di estensione convergente, ovvero l'allungamento dell'embrione lungo l'asse antero-posteriore ed il conseguente restringimento (convergenza) dell'embrione lungo l'asse medio-laterale tipico dei cordati. L'attivazione di Wnt nell'embrione, possiede una tipica polarità morfologica e funzionale, presentando un gradiente anteroposteriore (Machon et al., 2007; Simons & Mlodzik, 2008), oltre ad una specifica finestra temporale. Il *pathway* Wnt/ β -catenina è attivo in molte cellule endoteliali durante l'embriogenesi. La sua attivazione ha inizio a GD9.5, ovvero in un periodo molto vicino a quello utilizzato in questo studio per lo stimolo infiammatorio del MIA (GD9), e diminuisce dopo GD15.5, per mantenersi costante fino al periodo post-natale (Saunders et al., 2012).

Analisi per WB dei livelli di GSK3 β (FIGURA 30), le quali mostrano un aumento della forma fosforilata già ad E17; analisi della traslocazione nucleare di β -catenina (FIGURA 31), le quali mostrano un'aumentata presenza di β -catenina nucleare in topi adulti MIA POLY I:C; analisi per REAL TIME dei livelli di espressione di PDGF, DKK1 e SNAIL1 (FIGURA 32), le quali mostrano aumentati livelli di trascrizione per tutti i *marker* analizzati negli embrione a 24h dallo stimolo infiammatorio materno; concorrono a provare l'attivazione del *pathway* Wnt/ β -catenina come conseguenza del paradigma MIA POLY I:C da noi utilizzato.

All'origine dell'aumentata attivazione del *pathway* Wnt/ β -catenina potrebbe esserci il transitorio aumento trascrizionale, a 6h dallo stimolo, delle citochine proinfiammatorie IL1 β ed IL6 (FIGURA 21).

L'iper-attivazione di Wnt, che normalmente induce il differenziamento delle cellule endoteliali promuovendo la formazione della barriera emato-encefalica attraverso i *pathway* di VEGFR2, Notch1 e β -catenina, porterebbe quindi ad una BEE instabile. Per

meglio spiegare come ciò avvenga, sulla base di quanto detto e dei risultati ottenuti in questo lavoro, si è quindi formulata un'ipotesi del *pathway*, riassunto dalla [FIGURA 38](#), responsabile delle alterazioni osservabili nella prole di madri trattate a GD9 con POLY I:C. Dal presente studio emerge infatti un *deficit* delle funzioni tipiche dei periciti in topi MIA POLY I:C, evidenziato dal basso *coverage* dei vasi ematici cerebrali ([FIGURA 33](#)) in animali adulti e dalla bassa espressione del marker pericitario CD248 durante la fase embrionale ([FIGURA 34](#)).



[FIGURA 38 – SCHEMA RIASSUNTIVO DEI PATHWAY COINVOLTI NEL MIA POLY I:C](#)

CD248/TEM1/endosialina fu individuato per la prima volta all'interno di un gruppo di antigeni specifici per fibroblasti embrionali umani, selettivamente espressi da cellule tumorali ed a questo deve l'origine del suo nome: *Tumor Endothelial Markers* (TEM). Più recentemente alcuni studi hanno dimostrato che l'espressione di CD248 è specifica, ovvero presente solo in contesti tumorali e non in HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) o cellule endoteliali normali o affette da patologie non tumorali (Tomkowicz et al., 2010). Diversi studi hanno dimostrato l'importanza di CD248 nella regolazione della proliferazione dei periciti, formazione di strutture tubiformi su matrigel e migrazione cellulare. Allo stato attuale non è chiaro come questa proteina eserciti tali funzioni pleiotropiche.

In condizioni fisiologiche i periciti avvolgono i vasi cerebrali con una copertura tra il 60 e l'80% (Armulik et al., 2005), mentre con l'avanzare dell'età questa percentuale tende fisiologicamente a ridursi, con conseguente aumento del traffico trans-endoteliale e paracellulare a livello dei vasi ematici (Bell et al., 2010). I periciti possiedono un ruolo fondamentale sia nella formazione sia nel mantenimento della BEE, ovvero tanto nell'embrione quanto nell'adulto. Pur essendo l'espressione di PDGF-B aumentata a seguito dell'attivazione del *pathway* Wnt/ β -catenina (FIGURA 32/B), come mostrano, topi MIA POLY I:C mostrano un *coverage* (FIGURA 33) e fenomeni a carico della BEE che indicano un *deficit* di questo tipo cellulare. L'efficacia del *signaling* iniziato da PDGF-BB per la sopravvivenza dei periciti, risulta limitata a causa di un calo nell'espressione di CD248 nel tessuto cerebrale di embrioni E17 valutato in questo studio tramite REAL TIME (FIGURA 34). Diversi studi mostrano infatti come il *knockdown* di CD248 alteri i al fosforilazione di ERK1/2 e *c-fos* normalmente conseguenti all'attivazione del *pathway* PDGF-PDGFR β (Demoulin, 2010; Tomkowicz et al., 2010). Periciti posti in coltura, nei quali l'espressione genica di CD248 sia stata silenziata tramite trasfezione, mostrano un rate proliferativo diminuito di 5 volte rispetto al controllo (Tomkowicz et al., 2010). Dimostrando la necessità di CD248 per la proliferazione dei periciti.

Un sostanziale calo dei periciti in animali MIA POLY I:C potrebbe inoltre concorrere al calo di espressione di claudina 5. Modelli murini con *deficit* dei periciti mostrano come questi animali soffrano di una ridotta micro-circolazione e maggior permeabilità della BEE in maniera età dipendente e come tali difetti siano correlati a neurodegenerazione ed *impairment* cognitivi (Bell et al., 2010). I periciti sono richiesti per il corretto sviluppo della vascolarizzazione cerebrale durante il periodo neonatale stabilizzando i vasi sanguigni durante la loro formazione ed inducendo la corretta formazione della BEE durante la vita postnatale. Recenti studi in vitro con l'utilizzo di sistemi di co-coltura di più tipi cellulari (e.g. cellule endoteliali, atrociti e periciti) iniziato a mostrare i complessi meccanismi attraverso i quali astrociti e periciti sono in grado di regolare la BEE. L'infezione dei periciti in sistemi *in vitro* di co-coltura BMECs-periciti con il virus JEV (Japanese encephalitis virus) porta ad una aumentata produzione di IL6 e quindi alla degradazione della proteina ZO-1 a livello delle

cellule endoteliali (C. J. Chen et al., 2014). I periciti sono implicati nella risposta immunologica del cervello a differenti livelli. Queste cellule sono in grado di secernere molecole immuno-attive, possiedono attività macrofagiche, di presentazione dell'antigene e di richiamo per i leucociti (ElAli et al., 2014). I periciti esprimono alcuni TLR tra i quali il TLR4 (Edelman, Jiang, Tyburski, Wilson, & Steffes, 2007) e sono quindi in grado di rispondere autonomamente a stimoli infiammatori di tipo infettivo. In condizioni di infiammazione, i periciti aumentano la produzione di ossido nitrico (NO), IL1 β , IL6, TNF α e metalloproteasi (i.e. MMP2 ed MMP9), i quali concorrono al distacco di queste cellule dai vasi sanguigni e alla loro migrazione (Kovac, Erickson, & Banks, 2011). In caso di eventi ischemici, i quali portano all'attivazione della caspasi-3-attivata, fino al 40% dei periciti migra verso il sito del trauma (Dore-Duffy et al., 2000). È però noto, che una ridotta quantità di periciti non risulta in un incremento della risposta immunitaria proinfiammatoria. Citochine quali IL1 β , IL6, TNF α o chemochine quali CCL2 (C-C motif ligand 2) non mostrano un'aumentata espressione durante l'adolescenza o nella vita adulta di modelli murini KO per PDGFR β , riservando questi fenomeni al solo periodo dell'invecchiamento (Bell et al., 2010).

Anche la tendenza mostrata dai topi figli di madri trattate con POLY I:C a GD9 a possedere un albero cerebrovascolare più esteso del normale (FIGURA 35) può facilmente essere addebitata a modificazioni del numero di periciti. Alterazioni nei periciti sono infatti in grado di portare ad una regressione o iper-proliferazione del letto vascolare in ragione della loro quantità, ovvero del loro depauperamento (Enge et al., 2002).

Pur essendo già dimostrata la necessità di CD284 in alcuni precursori cellulari, ad esempio: cellule murali, endoteliali, mesenchimali staminali (MSC) e fibroblasti (Tomkowicz et al., 2010), non vi sono al momento studi esaurienti sugli effetti di una sua mancata espressione *in vivo*. I pochi studi disponibili con modelli murini KO per CD248, si limitano infatti all'analisi del *wound healing*, ovvero della rimarginazione di una ferita e dell'angiogenesi in territori lontani dal cranio e dai tessuti cerebrali che, come è stato discusso sono i più impattati dalla presenza o assenza dei periciti.

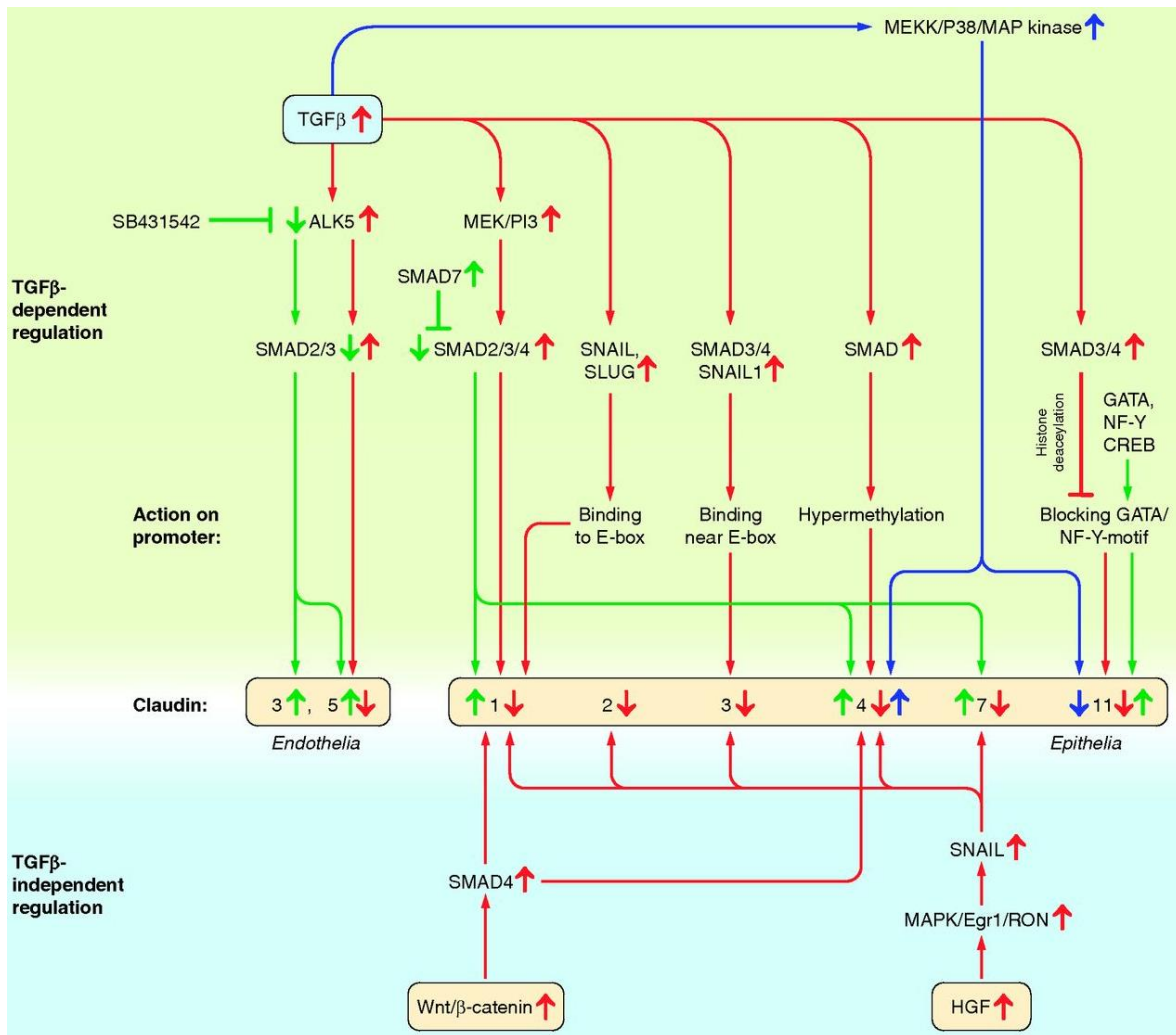


FIGURA 39 – SCHEMA DEI SIGNALING TGFβ-DIPENDENTI (SMAD2, SMAD3, SMAD4, SNAIL1 E/O SLUG) ED INDIPENDENTI (WNT, B-CATENIN ED HGF) CHE INFLUISCONO SULL'ESPRESSIONE DELLE CLAUDINE (GÜNZEL & YU, 2013)

Infine, l'albumina presente a livello del parenchima cerebrale di animali MIA POLY I:C, si localizza in maniera specifica nel citoplasma astrocitario (FIGURA 27). Questa condizione, nota per essere correlata ad eventi epilettici in roditori (van Vliet et al., 2007), sarebbe dovuta all'interazione tra albumina e TGFβ-R. L'ingresso di albumina negli astrociti porta al calo di espressione dei canali potassio (Kir 4.1) e quindi all'aumentata presenza di potassio extracellulare, posto alla base, dell'aumentata attività neuronale attraverso il meccanismo di facilitazione dei recettori NMDA (N-methyl-d-aspartate) (Friedman et al., 2009; Ivens et al., 2007). Tale "trasformazione astrocitaria", indotta dal calo di claudina 5 a livello dell'endotelio con conseguente aumento della permeabilità di membrana della BEE, potrebbe quindi essere all'origine dell'abbassamento della soglia di eccitabilità neuronale

della maggior suscettibilità a fenomeni epilettici degli animali MIA POLY I:C rispetto ai controlli.

Durante questo studio si sono inoltre prese in esame anche possibili alterazioni dalla placenta dovute al MIA. Sebbene molti dei parametri osservati, quali peso placentare, numero di embrioni, peso degli embrioni ad E17 ed l'incremento di peso dei topi gravidi tra il giorno GD9 e GD17, non fossero alterati nei topi sottoposti a MIA POLY I:C rispetto ai controlli ([FIGURA 36](#)), e non si sia osservata la produzione di citochine proinfiammatorie da parte di questo tessuto ad E17 (dati non mostrati), si sono evidenziate modificazioni a livello dei vasi ematici di origine embrionale ([FIGURA 37](#)). I villi coriali ed il plate corionico degli animali trattati con POLY I:C a GD9 sono meno rappresentati a livello placentare rispetto ai controlli. Anche la placenta, inoltre, presenta un calo di espressione di CD248 ad E17 ([FIGURA 37/D](#)), in stretta relazione con il dato osservabile a livello cerebrale ([FIGURA 35](#)).

Le differenze nella vascolarizzazione di questi due tessuti durante lo sviluppo embrionale ed il fattore tempo, ovvero l'azione prolungata che i mutamenti avvenuti *in utero* possono avere sul cervello ma non sulla placenta, possono essere all'origine dei differenti fenotipi riscontrati nelle modifiche dell'albero vascolare cerebrale e della placenta in animali MIA POLY I:C.

Molte delle patologie che i modelli MIA intendono riprodurre mostrano fenotipi difformi persino in gemelli omozigoti e penetranza variabile in componenti della medesima famiglia (Dempster et al., 2011; Scheffer et al., 2007; Wong, Gottesman, & Petronis, 2005). La schizofrenia ad esempio, pur presentando un'ereditarietà verticale (genitori-figli) dell'80% presenta una concordanza di appena il 50% tra gemelli monozigoti e del 10-15% tra gemelli dizigoti (Dempster et al., 2011; Wong et al., 2005). Anche in questo lavoro si è osservata una grande difformità nell'intensità del fenotipo tra topi della medesima cucciolata.

Le analisi qui presentate confermano a livello molecolare l'esistenza di un difetto nei processi di neovascolarizzazione delle strutture encefaliche e della placenta di embrioni MIA POLY I:C. In questo ambito è molto interessante osservare come il calo di CD248 sia osservabile, precocemente, sia nel tessuto cerebrale, sia in placenta. CD248 potrebbe quindi

non solo rappresentare nel contesto MIA POLY I:C un'importante chiave di lettura per il *signaling* ed i *pathway* coinvolti, ma porsi inoltre come *biomarker* utile all'individuazione di eventi avversi durante la gravidanza nell'uomo. L'analisi dei villi coriali o villocentesi è una procedura utilizzata in caso di necessità per *test* diagnostici, solitamente genetici, sul nascituro (Brambati & Simoni, 1983; Redline, 2015) e potrebbe rappresentare la procedura, attraverso l'analisi del CD248, per l'accertamento del buono stato di salute del feto.

Avendo numerosi autori posto l'infiammazione quale principale mediatore degli effetti del MIA sullo sviluppo cerebrale del nascituro, diversi studi si sono quindi posti l'obiettivo di impedire questa risposta. IL6 si è quindi dimostrata fondamentale nell'indurre i cambiamenti comportamentali tipici del MIA con POLY I:C (Smith, Li, Garbett, Mirnics, & Patterson, 2007). La somministrazione di anticorpi anti-IL6 durante la gravidanza o l'applicazione di protocolli MIA POLY I:C in animali IL6 knockout, non produce deficit nella PPI, nell'inibizione latente, nel comportamento esplorativo e di interazione sociale della prole (Samuelsson, Jennische, Hansson, & Holmäng, 2006). IL1 è invece legata ad alterazioni dello stato di attivazione della glia e ad alterazioni della sostanza bianca prevenuti dall'utilizzo di IL1ra nei modelli murini utilizzati (Girard, Tremblay, Lepage, & Sébire, 2010). Pineda e colleghi hanno invece mostrato come il fenotipo di maggior suscettibilità all'epilessia in topi MIA POLY I:C sia la conseguenza del contemporaneo squilibrio delle citochine IL1 β ed IL6 nei roditori (Pineda et al., 2014).

Nei prossimi mesi si indagherà più nel dettaglio il ruolo di IL1 β , IL6 ed TGF β ovvero le rispettive alterazioni in conseguenza dello stimolo MIA applicato al paradigma sperimentale qui presentato. Il TGF β è stato qui ipotizzato quale attore (FIGURA 38) del paradigma MIA POLY I:C. Esso in grado di aumentare l'espressione di SNAIL1, e quindi inibire claudina 5 (Günzel & Yu, 2013), di interagire, attraverso il suo recettore, nell'*uptake* di albumina da parte degli astrociti (Friedman et al., 2009) e di inibire la trascrizione di CD248, per lo meno in colture di fibroblasti e cellule della muscolatura liscia in maniera concentrazione e tempo-dipendente attraverso il *pathway* Smad2/3 secondo un recente studio (Suresh Babu et al., 2014). Ulteriori studi saranno necessari per chiarire il ruolo di queste citochine nel modello presentato.

8 Conclusione

Un recentissimo studio ha analizzato per la prima volta lo stato proliferativo dei vasi sanguigni a livello cerebrale dei soggetti affetti da sindrome dello spettro autistico (ASD) (Azmitia et al., 2015). Lo studio, che ha analizzato sia *marker* di angiogenesi (CD34, nestina) che *marker* non legati all'angiogenesi (α SMA, vimentina, UEA1 e CD146), mostra come solo i primi risultino alterati, anche in età adulta, in soggetti ASD rispetto ai soggetti controllo. Si deduce che soggetti affetti da autismo possiedono una più elevata attività angiogenica.

Come mostrato in questo lavoro, un *hit* durante il periodo prenatale, potrebbe essere all'origine di uno squilibrio dei processi di angiogenesi e non solo, con i periciti quali principali attori nei processi che portano al calo di espressione di claudina 5 e ZO-1 e quindi all'aumentata permeabilità della BEE. È altresì noto che attività epilettiche possono incidere sul rimodellamento del tessuto cerebrale promuovendo i fenomeni di angiogenesi (Garbelli et al., 2015; Marchi & Lerner-Natoli, 2013; Morin-Brureau, Rigau, & Lerner-Natoli, 2012). I pazienti inclusi nello studio di Azmitia e colleghi erano affetti da sindromi dello spettro autistico, ed al tempo stesso, il 60% aveva sofferto di crisi epilettiche, evento non raro i pazienti autistici (Berkovic et al., 2006). Anche Azmitia e colleghi indicano però i periciti quali responsabili del fenotipo riscontrato a livello dei vasi, ciò perché, nel cervello post-natale, la riorganizzazione dei vasi sanguigni avviene con una minima proliferazione di cellule endoteliali tramite un processo definito *splitting* o intussuscezione, avviato proprio dalla proliferazione dei periciti (De Spiegelaere, Cornillie, Van den Broeck, Plendl, & Bahramsoltani, 2011).

I periciti, associati con alta espressione di CD248 nella regione del telencefalo (Virgintino et al., 2007), si sono dimostrati necessari per i processi di angiogenesi *spouting* PDGFrB-dipendenti ma non per quelli di angiogenesi *splitting in vivo* (Naylor et al., 2014). Azmitia e colleghi, che osservano solo una tendenza all'aumento nella densità dei vasi cerebrali in pazienti autistici (N=6 per ASD e CTR), ipotizzano che lo sbilanciamento tra i fenomeni angiogenetici di *spouting* e *splitting* non esiti in una alterata densità dei vasi ematici, ma piuttosto in un maggiore rimodellamento della rete vascolare.

Evidenze recenti hanno mostrato come l'angiogenesi possa rappresentare un target terapeutico valido per l'epilessia (Morin-Brureau et al., 2011). Una maggiore comprensione dei fenomeni che regolano i vasi cerebrali in patologie del neurosviluppo potrà quindi non solo contribuire all'individuazione di terapie efficaci in pazienti affetti, ma inoltre, auspicabilmente, intervenire in maniera precoce sui fenomeni *in utero* che ne sono i reali agenti eziologici.

9 Materiali e metodi

9.1 Animali impiegati

Per questo studio sono stati impiegati embrioni a differenti stadi di sviluppo ed animali adulti *wild type* appartenenti al ceppo C57Bl6 (Charles River). Gli animali all'interno dello stabulario sono mantenuti in condizioni di temperatura costante (22°C) e di umidità e con cicli di luce/buio di 12 ore. Acqua e cibo sono disponibili ad libitum. Tutte le procedure sperimentali sono state effettuate in accordo con le leggi italiane vigenti in materia.

9.2 Maternal Immune Activation

Dopo aver posto gli animali in accoppiamento per 24h, solitamente fino a tre femmine sono portate in accoppiamento con un maschio, il maschio viene separato dalla femmine; in tale occasione, considerato il giorno GDO – presenza del *plug* vaginale non ancora rilevabile, le femmine sono pesate e quindi riposte nelle rispettive gabbie. Il giorno GD9, ovvero 9 giorni dopo, gli animali sono nuovamente pesati. Gli animali che mostrano un guadagno di peso >1.5g, equivalente al 5% circa del peso dell'animale, o visibilmente gravidi sono trattati con POLY-I:C (acido poly-inosinico-poly-citidilico – Sigma – 2mg/ml in soluzione salina) a concentrazione 2 mg/kg tramite iniezione intraperitoneale o in alternativa con soluzione salina 0.9% NaCl come condizione di controllo. Gli animali non mostrano segni di stress fisico a seguito del trattamento.

9.3 ELISA per IL6

Gli *assay* ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) sono metodi utili alla rilevazione di sostanze in maniera quantitativa attraverso riconoscimento anticorpale. 12 femmine aventi 4 mesi di età sono state trattate con POLY-I:C o con soluzione fisiologica secondo le modalità indicate precedentemente. Dopo 3 ore gli animali sono stati sacrificati ed il sangue è stato prelevato e posto in una provetta contenente EDTA 4.1 mM per arrestare il processo di coagulazione. Dopo centrifugazione a 2'000g per 15 minuti il plasma così ottenuto è stato conservato a -80°C. L'analisi dei livelli di IL6 contenuti nel plasma è stata quindi effettuata tramite kit IL6 ELISA specifico (Thermo Scientific) con sensibilità 50-2000 pg/ml secondo le istruzioni riportate dal produttore. L'assorbanza è stata quindi misurata a 450 e 550 nm con Victor² (Wallac).

9.4 Immunofluorescenza su fettine

Fettine conservate in anticongelante o tagliate al criostato sono rilavate con PBS. Al fine di aumentare la permeabilità del tessuto senza intaccare l'integrità della membrana plasmatica cellulare, le fettine sono rilavate con un buffer composto da MeOH 3% in PBS 0.1% triton per 30 minuti. Viene quindi effettuato un passaggio per il blocco degli epitopi aspecifici (siti reattivi) con goat serum 10%, tryton 10% ed NaCl 0.9M in PBS è quindi effettuato al fine di limitare il segnale di *background*. Anticorpi primari e secondari specifici sono quindi utilizzati al fine di coniugare fluorofori agli epitopi desiderati. I vetrini sono quindi montati con Mowiol 4-88 Reagent e mantenuti ad una temperatura di meno 20°C.

9.5 Skeleton analysis

La *skeleton analysis* è un metodo quantitativo di analisi morfologica della microglia attraverso immagini di IF su fettina acquisite al confocale. Per l'analisi viene effettuata una proiezione della massima intensità del segnale iba1-positivo così da permettere la piena visualizzazione dei processi delle cellule microgliali. L'immagine risultante viene quindi convertita in un'immagine binaria e scheletrizzata prima di utilizzare il *plugin* contenuto nel *software* di ImageJ: AnalyzeSkeleton plugin (<http://imagejdocu.tudor.lu/>).

I dati raccolti da questa analisi sono quindi normalizzati sul numero di cellule presenti nell'immagine (Morrison & Filosa, 2013).

9.6 Analisi di colocalizzazione

Fettine di animali MIA POLY I:C a P90 e controlli non perfusi, colorate per IF per albumina, lectina e GFAP sono state acquisite al confocale. Le immagini sono quindi state processate con il *software* Bitplane – Imaris. A tutti i canali è stata impostata una *threshold*, al fine di rendere al meglio il rapporto segnale/rumore. La *threshold* per albumina è stata importata in modo che non vi fosse segnale nel parenchima cerebrale degli animali controllo, ovvero così assicurandosi di partire da un confronto ottimale secondo i dati disponibili in letteratura. La funzione Coloc di Imaris è stata quindi applicata alle immagini. Il segnale di colocalizzazione tra albumina e GFAP e tra albumina e lectina (controllo interno) è stato normalizzato sempre sul secondo termine. Solo i dati di percentuale del volume colocalizzante che abbiano superato la *threshold* con un indice di Pearson, ovvero di

significatività della correlazione, superiore a +0.1 sono stati presi in considerazione per l'analisi statistica.

9.7 Analisi di localizzazione nucleare

Fettine di animali MIA POLY I:C a P90 e controlli non perfusi, sono state colorate per IF per beta-catenina e DAPI e quindi acquisite al confocale. Le immagini sono quindi state processate con il *software* ImageJ. L'analisi ha previsto i seguenti passaggi: creazione di uno Z stack, conversione del segnale DAPI in un segnale binario, sottrazione del segnale ottenuto dal segnale di beta-catenina attraverso la funzione *image calculator*, applicazione del filtro "invert" al segnale DAPI binario, quindi si procede alla sottrazione del segnale ottenuto dall'immagine di beta-catenina ottenendo così il segnale beta-catenina positivo all'interno dei nuclei. Su questa immagine viene calcolata la media dei valori di grigio.

9.8 Analisi di coverage

Fettine di animali MIA POLY I:C a P90 e controlli non perfusi, sono state colorate per IF per NG2, lectina e PDGFrB e quindi acquisite al confocale. Le immagini sono quindi state processate con il *software* ImageJ. Le immagini sono quindi state processate con il *software* ImageJ. L'analisi ha previsto i seguenti passaggi: slittare i canali, apporre la maschera di visualizzazione HiLo, porre le threshold per i canali lectina e PDGFrB, selezionare il segnale desiderato e misurare l'area per ogni piano di fuoco.

Per ogni piano quindi l'area del segnale lectina è stata presa come 100%, permettendo così di calcolare la percentuale di copertura del segnale PDGFrB (periciti) rispetto al vaso (lectina) (Bell et al., 2010).

9.9 Western Blot analisi per tessuti

Omogenati di corteccia sono stati effettuati da tessuti prelevati ad animali delle età indicate nel lavoro. Le biopsie sono omogenate a 4°C mediante *potter* di teflon-vetro in 2 ml o 300 µl di una soluzione di saccarosio 290 mM, Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 10% ed inibitori delle proteasi 1:1000 Sigma Aldrich rispettivamente per corteccia o ippocampo. L'omogenato così ottenuto è centrifugato per 15 minuti a 3000 rpm 4°C con prelievo dei supernatanti e loro conservazione a -20°C. La concentrazione degli omogenati proteici è stata calcolata utilizzando il *kit* Protein Assay Reagent BCA (Pierce) secondo le istruzioni riportate dalla ditta produttrice. Dopo corsa elettroforetica con SDS-PAGE e trasferimento su membrana di

nitrocellulosa si è proceduto ad *immunoblotting* e le bande immunoreattive sono visualizzate con Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fischer Scientific Inc, Rockford, IL), acquisite con il densitometro Bio-rad GS-800tm ed analizzate con il software ImageJ. Per tutti le quantificazioni la densitometria è stata normalizzata sulla media dei controlli.

9.10 Real time PCR

Tessuti cerebrali ed embrioni a differenti stadi di sviluppo sono stati analizzati tramite real time PCR. L'RNA dei campioni, omogenati in 500ul di TRIzol Reagent (Invitrogen), è stato estratto per mezzo del kit di estrazione DirectZol RNA miniprep (Zymo Research) secondo la procedura riportata dal produttore. L'RNA è stato quindi eluito in 50µl di acqua DNAsi/RNAsi free e quantificato tramite spettrometria e densità ottica determinata come ratio 260/280 nm con NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). 2µg di mRNA dei campioni è stato quindi retrotrascritto con High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Le reazioni di qRT-PCR sono state eseguite con RT-PCR Vii7 (Applied Biosystems) in un volume finale di 10µl per la tecnologia Sybr Green e 20µl per la tecnologia TaqMan (Gene Expression Master Mix). Ogni gene è stato analizzato in duplicato con il metodo $\Delta\Delta C_t$. Tutti i livelli di mRNA sono stati normalizzati su GAPDH o ACTINA quando indicato.

9.11 Novel object recognition

Il *novel object recognition* è un test altamente validato per la valutazione della memoria di riconoscimento. Il test si è articolato in più parti: abituazione, familiarizzazione (T1) e test (T2). Nella prima fase gli animali sono esposti all'ambiente (arene) in cui si svolgerà il test. Nella seconda fase gli animali vengono esposti a due o più oggetti esplorabili per un tempo definito (T1); nella terza fase, dopo un periodo di latenza variabile, uno degli oggetti presentati è sostituito. In condizioni normali, gli animali spendono la maggior parte del tempo a loro disposizione nell'esplorazione del nuovo oggetto. Se ciò non si verifica, il test è indice di un *deficit* mnemonico. Ogni animale ha quindi ricevuto un punteggio definito *discrimination index* calcolato attraverso la formula $N-F/N+F$ in cui N=tempo di esplorazione del nuovo oggetto durante il T2 ed F=tempo di esplorazione del vecchio oggetto durante il T2.

9.12 Sociability test

L'animale in esame è stato inserito in una gabbia caratterizzata dalla presenza di tre camere comunicanti, secondo il classico paradigma del *Crawley's sociability and preference for social novelty protocol*. Durante l'esperimento la prima è stata allestita in modo da contenere conspecifici non familiari al soggetto in esame in contatto non diretto; la seconda camera, definita "di passaggio" è libera da ostacoli; la terza camera è invece identica alla prima tranne per l'assenza di animali al proprio interno (FIGURA 40). Alla fine del test ad ogni animale è stato assegnato un punteggio complessivo della quantità di tempo speso in ciascuna delle tre camere.



FIGURA 40 - SCHEMA DELLA GABBIA UTILIZZATA PER I TEST DI SOCIABILITY

9.13 Marble burying assay

Il *marble burying assay* è un test per comportamenti ripetitivi e compulsivi. Per condurre il test gli animali vengono introdotti in una gabbia contenente alcuni centimetri di sabbia per lettiera al di sopra della quale sono posizionate, con una matrice di posizioni predefinite, alcune biglie. Il test prende in considerazione il numero di biglie sepolte dai movimenti del roditore per più del 75% del suo volume; il numero può quindi variare da zero al numero di biglie presenti (Lazic, 2015).

9.14 Induzione di crisi epilettiche mediante acido kainico

Lo studio della suscettibilità a crisi epilettiche è stato effettuato su topi in età adulta (P90), mediante la somministrazione intraperitoneale *in vivo* di acido kainico 35 mg/kg; un potente agonista del terzo tipo del recettore del glutammato (Corradini et al., 2012). A seguito della somministrazione di acido kainico i topi sono stati osservati e valutati ogni 5 minuti per 3h, assegnandoli di volta in volta un punteggio da 0 a 7 in base alla scala di Racine (Racine, Gartner, & Burnham, 1972) modificata (Bozzi et al., 2000): 0 = comportamento normale; 1 = immobilità; 2 = postura rigida, estensione della coda e/o degli arti anteriori; 3 = movimenti stereotipati e scatti della testa (*head bobbing*); 4 = innalzamento del corpo e

caduta; 5 = innalzamenti del corpo e cadute continue nel tempo; 6 = convulsioni tonico-cloniche severe; 7 = morte. Al termine delle 3h di osservazione gli animali sono stati riportati nelle rispettive gabbie. L'osservatore è all'oscuro del trattamento, Poly-I:C o fisiologica prenatale, a cui gli animali sono stati sottoposti. Per ogni gruppo sono calcolate le medie dei punteggi ottenuti ogni 5 minuti, poste in grafico in funzione del tempo.

9.15 Evan's blue

Una soluzione di Evan's blue (Sigma-Aldrich, cat. no. E2129, dye content $\geq 75\%$) al 2% in acqua distillata è stata preparata, miscelata overnight e quindi filtrata. Questa soluzione è stata quindi utilizzata per iniezioni intraperitoneali 4ml/kg. Gli animali presentano un iniziale stato di malessere che si risolve in breve tempo. Dopo 24h gli animali, sotto anestesia profonda con ketamina-xilakina i.p., sono stati sottoposti a perfusione cardiaca con soluzione salina; al termine i cervelli sono stati rapidamente prelevati. Gli organi così ottenuti sono stati pesati e posti sotto cappa aspirante overnight al fine di essicarli. A procedura completa gli organi sono nuovamente pesati ed incubati a 24°C in agitazione con 70ul di formamide per 3 giorni al fine di porre in soluzione tutto il colorante presente nel tessuto. Dopo centrifugazione a 3'000 rpm per 10 minuti è stato prelevato il soprannatante e quindi posto in piastre 96-well flat bottom assay plates (Costar®, Corning Inc). L'assorbanza è quindi letta a 620 e 740 nm (Optimax Microplate Reader; Molecular Devices). I valori rilevati sono quindi espressi come μg di Evan's blue per grammi di organo fresco ovvero non disidratato.

La procedura è stata verificata tramite iniezione di Evan's blue per 24h in animali trattati 48h prima con radiazioni fino a 2 Gray distribuite *total body*, ovvero con tempi e dosi riportati in letteratura per avere effetti negativi sulla permeabilità della BEE (Ding et al., 2010; Fauquette, Amourette, Dehouck, & Diserbo, 2012). Dalla [FIGURA 41](#) è possibile percepire come i cervelli prelevati dai topi irradiati (2Gy) + EB siano più intensamente colorati rispetto al cervello prelevato dal topo controllo non irradiato (0Gy) + EB.

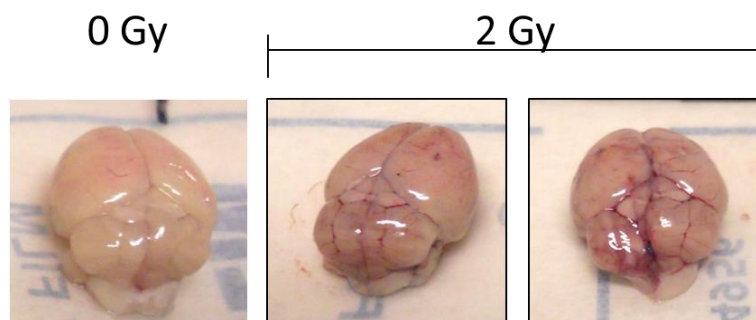


FIGURA 41 - CONTROLLO EFFETTUATO SU TOPI TRATTATI CON RADIAZIONI FINO A 2 GRAY (Gy) 48H PRIMA DEL TRATTAMENTO CON EB (24H)

9.16 Analisi istologica dei preparati di placenta

Il sacco placentare ed i rispettivi embrioni allo stadio di sviluppo E17 sono stati prelevati da modelli MIA e da madri controllo. Mentre la corteccia degli embrioni è stata solubilizzata per analisi biochimiche come già descritto, la placenta, accuratamente separata dall'utero e dal sacco vitellino, è stata rapidamente fissata per immersione in PFA (paraformaldeide) 4% fredda in PBS (Phosphate Buffered Saline, 0.1 M a pH 7.4) e quindi deidratata attraverso una scala di alcoli e xileni a concentrazione crescente; infine i campioni sono stati quindi inclusi in paraffina solida così da mantenere l'asse maggiore del disco placentare perpendicolare all'asse di taglio. Il taglio di sezioni, dello spessore di 4 μm , è stato effettuato tramite microtomo ed ha interessato solo alcuni millimetri di tessuto; sono state campionate 4 slide ogni 100 μm per una lunghezza complessiva di circa 1mm. Considerato il diametro maggiore dell'organo (0.5mm) ed restringimento (*shrinkage*) dovuto al processamento, è stato analizzato circa il 20% del campione.

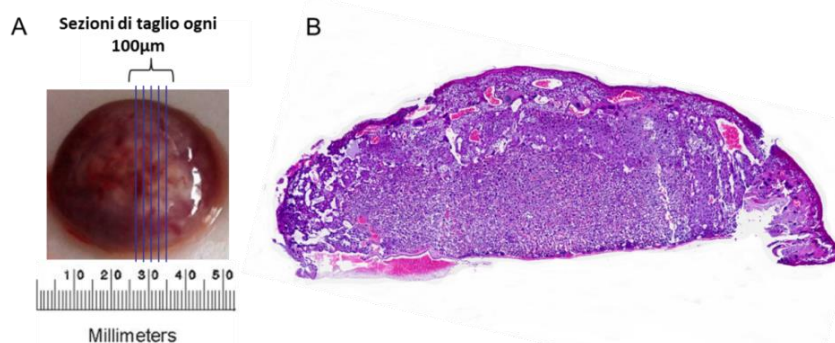


FIGURA 42 – A) PLACENTA DI TOPO WILD TYPE NON TRATTATA, MISURA ED INDICAZIONE DEI TAGLI SEQUENZIALI ANALIZZATI B) SLIDE DI TESSUTO PLACENTARE WILD TYPE NON TRATTATO COLORATO CON EMATOSSILINA-EOSINA

Successivamente a colorazione con ematossilina-eosina, le aree comprendenti vasi sono state selezionate su immagini acquisite con VS 120 DotSlide da due operatori indipendenti e quantificate con il software ImageJ.

9.17 Quantificazione dei SCFA

Prelevate le feci dalla regione del retto 30mg sono pesati su di una bilancia di precisione e risospese in 600µl di acido formico allo 0.001% in acqua milliQ. Al fine di posse in sospensione gli acidi grassi a corta catena i campioni sono prima vortexati per 1 minuto e quindi centrifugati a 1000g per 2 minuti a 4°C. Prelevato il surnatante la stessa procedura è effettuata/ripetuta sul *pellet* rimanente. I due sopranatanti sono quindi portati uniti e portati a 1.5ml con acido formico allo 0.001% in acqua milliQ, quindi filtrati con un filtro dai pori di diametro 0.22µm. I campioni così ottenuto sono quindi analizzati tramite HPLC (Waters Alliance 2695, Milan, Italy). L'analisi è effettuata isocraticamente a 0.6 mL/min, 50 °C, con una colonna Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm i.d., Bio-Rad Laboratories, Segrate, Italy) equipaggiata con una cartuccia Micro-Guard cation H+ (Bio-Rad). Acidi grassi a corta catena sono utilizzati come standard (Sigma- Aldrich, Milan, Italy). Si ringrazia il Prof. Guglielmetti dell'Università degli Studi di Milano per l'analisi dei campioni.

9.18 Osservazione dei campioni

La valutazione ed osservazione dei campioni in campo chiaro è stata eseguita con un microscopio VS120 DotSlide – Olympus ed il software dedicato OlyVIA. Mentre i campioni utilizzati per immunofluorescenza sono stati acquisiti con il microscopio confocale FV1000 – Olympus o LSM 510 META – Zeiss. Le immagini acquisite sono state successivamente elaborate mediante il software ImageJ dell'NIH, utilizzato anche per ogni tipo di analisi d'immagine effettuata.

9.19 Analisi statistica

I dati sono presentati come media ± SEM (standard error of the mean). Al fine di determinare la significatività statistica sono stati effettuati Student's t test per distribuzioni normali o il test ANOVA ad una coda ed il Mann-Whitney test per distribuzioni non-normali/non-gaussiana. Le differenze sono state considerate significative se aventi un P value ≤ 0.05; queste differenze sono state indicate con un asterisco (*), differenze con P value ≤ 0.01 sono indicati con due asterischi (**), differenze con P value ≤ 0.005 sono

indicati con tre asterischi (***) e se aventi un P value ≤ 0.0001 con quattro asterischi (****). Tutte le analisi statistiche sono state eseguite tramite il software Prism (GraphPad, San Diego, CA) o SigmaStat 3.5 (Jandel Scientific).

10 Sigle ed acronimi

ADHD - Attention-Deficit - Hyperactivity Disorder

AP1 - activator protein 1

ASD - Autism Spectrum Disorders

BEE - barriera emato-encefalica

BMEC - bone marrow microvascular endothelial cell

CCL2 - C-C motif ligand 2

CREB - cyclic AMP-responsive element-binding protein

CRF - corticotropin-releasing factor

DAMP - Damage Associated Molecular Pattern

DKK1 - Dickkopf-related protein 1

GD - gestational day

GFAP - glial fibrillary acidic protein

GI - gastrointestinal tract

GM-CSF - granulocyte/macrophage colony stimulating factor

HSP - Heat Shock Proteins

HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IL12 - interleuchina-12 (citochina proinfiammatoria)

IL1 β - interleuchina-1 β (citochina proinfiammatoria)

IL6 - interleuchina-6 (citochina proinfiammatoria)

IL8 - interleuchina-8 (fattore chemotattico per i neutrofili)

IRF - interferon-regulatory factors

JEV - Japanese encephelitis virus

KO - knock-out

LPS - lipopolisaccaride (componente essenziale della parete di molti batteri gram-negativi)

LTP - long-term potentiation

MIA - Maternal Inflammatory Stimulation (modello di infiammazione in gravidanza)

MyD88 - Myeloid Differentiation Response Gene 88

NF κ B - nuclear factor- κ B

NG2 - neural/glial antigen 2

NMDA - N-methyl-d-aspartate
ODP - onda di depolarizzazione parossistica
PBS - phosphate buffer solution
PDGF-BB - Platelet-Derived Growth Factor-BB
PFA - paraformaldeide
PGE2 - prostaglandina (mediatore flogistico)
PLVAP - plasmalemma vesicle-associated protein
POLY I:C - polyinosinic-polycytidylic acid
PPI - prepulse inhibition
PRR - Pattern Recognition Receptor
REST - RE1-Silencing Transcription factor
SCFA - Short-Chain Fatty Acids
SNARE - SNAP REceptor
SNC - sistema nervoso centrale
SPF - Specific Pathogen Free
TEM - Tumor Endothelial Markers
TLR - Toll-Like Receptor
TNF α - Tumor Necrosis Factor α (citochina proinfiammatoria di fase acuta)
VEGF - Vascular endothelial growth factor
WNT - West Nilo Virus

11 Bibliografia

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*, 6(237), 237ra265. doi:10.1126/scitranslmed.3008599
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37(1), 13-25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Aderem, A., & Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797), 782-787. doi:10.1038/35021228
- Anderson, K. V., Bokla, L., & Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42(3), 791-798. doi:0092-8674(85)90275-2 [pii]
- Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett*, 565, 23-29. doi:10.1016/j.neulet.2013.12.030
- Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97(6), 512-523. doi:10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7
- Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P., & Luheshi, G. N. (2006). The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 11(1), 47-55. doi:10.1038/sj.mp.4001748
- Avanzini, G. (2003). Musicogenic seizures. *Ann N Y Acad Sci*, 999, 95-102.
- Azmitia, E. C., Saccomano, Z. T., Alzobae, M. F., Boldrini, M., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2015). Persistent Angiogenesis in the Autism Brain: An Immunocytochemical Study of Postmortem Cortex, Brainstem and Cerebellum. *J Autism Dev Disord*. doi:10.1007/s10803-015-2672-6
- Bagley, R. G., Honma, N., Weber, W., Boutin, P., Rouleau, C., Shankara, S., . . . Teicher, B. A. (2008). Endosialin/TEM 1/CD248 is a pericyte marker of embryonic and tumor neovascularization. *Microvasc Res*, 76(3), 180-188. doi:10.1016/j.mvr.2008.07.008
- Bale, T. L. (2015). Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*, 16(6), 332-344. doi:10.1038/nrn3818
- Barzon, L., Pacenti, M., Sinigaglia, A., Berto, A., Trevisan, M., & Palù, G. (2015). West Nile virus infection in children. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 13(11), 1373-1386. doi:10.1586/14787210.2015.1083859
- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, 68(3), 409-427. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.043
- Berkovic, S. F., Mulley, J. C., Scheffer, I. E., & Petrou, S. (2006). Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends Neurosci*, 29(7), 391-397. doi:10.1016/j.tins.2006.05.009
- Beutler, B., & Poltorak, A. (2001). Toll we meet again.... *Nat Immunol*, 2(1), 9-10. doi:10.1038/83222
- Blas-Valdivia, V., Cano-Europa, E., Hernández-García, A., & Ortiz-Butrón, R. (2009). Neonatal bilateral lidocaine administration into the ventral hippocampus caused postpubertal behavioral changes: An animal model of neurodevelopmental psychopathological disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 5, 15-22.
- Boksa, P. (2010). Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun*, 24(6), 881-897. doi:10.1016/j.bbi.2010.03.005
- Bolwig, T. G., Hertz, M. M., & Westergaard, E. (1977). Acute hypertension causing blood-brain barrier breakdown during epileptic seizures. *Acta Neurol Scand*, 56(4), 335-342.

- Borre, Y. E., O'Keeffe, G. W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med*, *20*(9), 509-518. doi:10.1016/j.molmed.2014.05.002
- Bozzi, Y., Vallone, D., & Borrelli, E. (2000). Neuroprotective role of dopamine against hippocampal cell death. *J Neurosci*, *20*(22), 8643-8649.
- Brambati, B., & Simoni, G. (1983). Diagnosis of fetal trisomy 21 in first trimester. *Lancet*, *1*(8324), 586.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., . . . Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*, *6*(263), 263ra158. doi:10.1126/scitranslmed.3009759
- Brightman, M. W., & Reese, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*, *40*(3), 648-677.
- Brown, A. S., Begg, M. D., Gravenstein, S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Bresnahan, M., . . . Susser, E. S. (2004). Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, *61*(8), 774-780. doi:10.1001/archpsyc.61.8.774
- Brown, A. S., & Derkits, E. J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry*, *167*(3), 261-280. doi:10.1176/appi.ajp.2009.09030361
- Brown, A. S., & Susser, E. S. (2008). Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. *Schizophr Bull*, *34*(6), 1054-1063. doi:10.1093/schbul/sbn096
- Busceti, C. L., Biagioni, F., Aronica, E., Rizzo, B., Storto, M., Battaglia, G., . . . Bruno, V. (2007). Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, *48*(4), 694-705. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01055.x
- Cai, X., Lin, Y., Friedrich, C. C., Neville, C., Pomerantseva, I., Sundback, C. A., . . . Grottkau, B. E. (2009). Bone marrow derived pluripotent cells are pericytes which contribute to vascularization. *Stem Cell Rev*, *5*(4), 437-445. doi:10.1007/s12015-009-9097-6
- Cameron, J. S., Alexopoulou, L., Sloane, J. A., DiBernardo, A. B., Ma, Y., Kosaras, B., . . . Vartanian, T. (2007). Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals. *J Neurosci*, *27*(47), 13033-13041. doi:27/47/13033 [pii] 10.1523/JNEUROSCI.4290-06.2007
- Chen, C. J., Ou, Y. C., Li, J. R., Chang, C. Y., Pan, H. C., Lai, C. Y., . . . Chang, C. J. (2014). Infection of pericytes in vitro by Japanese encephalitis virus disrupts the integrity of the endothelial barrier. *J Virol*, *88*(2), 1150-1161. doi:10.1128/JVI.02738-13
- Chen, Y. H., Xu, D. X., Zhao, L., Wang, H., Wang, J. P., & Wei, W. (2006). Ascorbic acid protects against lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. *Toxicology*, *217*(1), 39-45. doi:10.1016/j.tox.2005.08.010
- Clancy, B., Darlington, R. B., & Finlay, B. L. (2001). Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, *105*(1), 7-17.
- Clarke, T. B., Francella, N., Huegel, A., & Weiser, J. N. (2011). Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium. *Cell Host Microbe*, *9*(5), 404-414. doi:10.1016/j.chom.2011.04.012
- Cook, F., & Oliver, C. (2011). A review of defining and measuring sociability in children with intellectual disabilities. *Res Dev Disabil*, *32*(1), 11-24. doi:10.1016/j.ridd.2010.09.021
- Cornford, E. M., & Oldendorf, W. H. (1986). Epilepsy and the blood-brain barrier. *Adv Neurol*, *44*, 787-812.
- Corradini, I., Donzelli, A., Antonucci, F., Welzl, H., Loos, M., Martucci, R., . . . Matteoli, M. (2012). Epileptiform Activity and Cognitive Deficits in SNAP-25+/- Mice are Normalized by Antiepileptic Drugs. *Cereb Cortex*. doi:10.1093/cercor/bhs316
- Coyle, P., Tran, N., Fung, J. N., Summers, B. L., & Rofe, A. M. (2009). Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring

- exposed to LPS in early pregnancy. *Behav Brain Res*, 197(1), 210-218. doi:10.1016/j.bbr.2008.08.022
- Crawley, J. N. (2007). Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol*, 17(4), 448-459. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00096.x
- Cunningham, C., Campion, S., Teeling, J., Felton, L., & Perry, V. H. (2007). The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun*, 21(4), 490-502. doi:10.1016/j.bbi.2006.12.007
- Dahlgren, J., Samuelsson, A. M., Jansson, T., & Holmäng, A. (2006). Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation. *Pediatr Res*, 60(2), 147-151. doi:10.1203/01.pdr.0000230026.74139.18
- Danchin, É., Charmantier, A., Champagne, F. A., Mesoudi, A., Pujol, B., & Blanchet, S. (2011). Beyond DNA: integrating inclusive inheritance into an extended theory of evolution. *Nat Rev Genet*, 12(7), 475-486. doi:10.1038/nrg3028
- Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C. J., & Barres, B. A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(2), 641-646. doi:10.1073/pnas.0805165106
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562-566. doi:10.1038/nature09513
- Daniels, B. P., & Klein, R. S. (2015). Viral sensing at the blood-brain barrier: new roles for innate immunity at the CNS vasculature. *Clin Pharmacol Ther*, 97(4), 372-379. doi:10.1002/cpt.75
- Dantzer, R., & Wollman, E. E. (2003). [Relationships between the brain and the immune system]. *J Soc Biol*, 197(2), 81-88.
- Davies, W. (2013). Using mouse models to investigate sex-linked genetic effects on brain, behaviour and vulnerability to neuropsychiatric disorders. *Brain Res Bull*, 92, 12-20. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.06.018
- De Ferrari, G. V., & Moon, R. T. (2006). The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene*, 25(57), 7545-7553. doi:10.1038/sj.onc.1210064
- De Simoni, M. G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., . . . Vezzani, A. (2000). Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*, 12(7), 2623-2633.
- De Spiegelaere, W., Cornillie, P., Van den Broeck, W., Plendl, J., & Bahramsoltani, M. (2011). Angiopoietins differentially influence in vitro angiogenesis by endothelial cells of different origin. *Clin Hemorheol Microcirc*, 48(1), 15-27. doi:10.3233/CH-2011-1393
- de Theije, C. G., Wopereis, H., Ramadan, M., van Eijndthoven, T., Lambert, J., Knol, J., . . . Oozeer, R. (2014). Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*, 37, 197-206. doi:10.1016/j.bbi.2013.12.005
- Demoulin, J. B. (2010). No PDGF receptor signal in pericytes without endosialin? *Cancer Biol Ther*, 9(11), 916-918.
- Dempster, E. L., Pidsley, R., Schalkwyk, L. C., Owens, S., Georgiades, A., Kane, F., . . . Mill, J. (2011). Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet*, 20(24), 4786-4796. doi:10.1093/hmg/ddr416
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry*, 19(2), 146-148. doi:10.1038/mp.2013.65
- Dias, B. G., & Ressler, K. J. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci*, 17(1), 89-96. doi:10.1038/nn.3594
- Ding, G. R., Qiu, L. B., Wang, X. W., Li, K. C., Zhou, Y. C., Zhou, Y., . . . Guo, G. Z. (2010). EMP-induced alterations of tight junction protein expression and disruption of the blood-brain barrier. *Toxicol Lett*, 196(3), 154-160. doi:10.1016/j.toxlet.2010.04.011

- Dore-Duffy, P., Owen, C., Balabanov, R., Murphy, S., Beaumont, T., & Rafols, J. A. (2000). Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvasc Res*, *60*(1), 55-69. doi:10.1006/mvre.2000.2244
- Durdiakova, J., Ostatnikova, D., & Celec, P. (2011). Testosterone and its metabolites--modulators of brain functions. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *71*(4), 434-454.
- Edelman, D. A., Jiang, Y., Tyburski, J. G., Wilson, R. F., & Steffes, C. P. (2007). Lipopolysaccharide activation of pericyte's Toll-like receptor-4 regulates co-culture permeability. *Am J Surg*, *193*(6), 730-735. doi:10.1016/j.amjsurg.2006.08.086
- El-Radhi, A. S. (2015). Management of common behaviour and mental health problems. *Br J Nurs*, *24*(11), 586, 588-590. doi:10.12968/bjon.2015.24.11.586
- ElAli, A., Thériault, P., & Rivest, S. (2014). The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders. *Int J Mol Sci*, *15*(4), 6453-6474. doi:10.3390/ijms15046453
- Enge, M., Bjarnegård, M., Gerhardt, H., Gustafsson, E., Kalén, M., Asker, N., . . . Betsholtz, C. (2002). Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J*, *21*(16), 4307-4316.
- Fauquette, W., Amourette, C., Dehouck, M. P., & Diserbo, M. (2012). Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study. *Brain Res*, *1433*, 114-126. doi:10.1016/j.brainres.2011.11.022
- Fessler, E. B., Chibane, F. L., Wang, Z., & Chuang, D. M. (2013). Potential roles of HDAC inhibitors in mitigating ischemia-induced brain damage and facilitating endogenous regeneration and recovery. *Curr Pharm Des*, *19*(28), 5105-5120.
- Flores, G., Silva-Gómez, A. B., Ibáñez, O., Quirion, R., & Srivastava, L. K. (2005). Comparative behavioral changes in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus and the prefrontal cortex. *Synapse*, *56*(3), 147-153. doi:10.1002/syn.20140
- Fortier, M. E., Luheshi, G. N., & Boksa, P. (2007). Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav Brain Res*, *181*(2), 270-277. doi:10.1016/j.bbr.2007.04.016
- Fridley, J., Thomas, J. G., Navarro, J. C., & Yoshor, D. (2012). Brain stimulation for the treatment of epilepsy. *Neurosurg Focus*, *32*(3), E13. doi:10.3171/2012.1.FOCUS11334
- Friedman, A., Kaufer, D., & Heinemann, U. (2009). Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy Res*, *85*(2-3), 142-149. doi:10.1016/j.eplepsyres.2009.03.005
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, *141*(7), 1539-1550.
- Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., & Betsholtz, C. (2009). Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(5), 630-638. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161521
- Gaensbauer, J. T., Lindsey, N. P., Messacar, K., Staples, J. E., & Fischer, M. (2014). Neuroinvasive arboviral disease in the United States: 2003 to 2012. *Pediatrics*, *134*(3), e642-650. doi:10.1542/peds.2014-0498
- Garbelli, R., de Bock, F., Medici, V., Rousset, M. C., Villani, F., Boussadia, B., . . . Marchi, N. (2015). PDGFR β (+) cells in human and experimental neuro-vascular dysplasia and seizures. *Neuroscience*, *306*, 18-27. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.090
- Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2008). VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat Cell Biol*, *10*(8), 883-885. doi:10.1038/ncb0808-883
- Gayle, D. A., Beloosesky, R., Desai, M., Amidi, F., Nuñez, S. E., & Ross, M. G. (2004). Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *286*(6), R1024-1029. doi:10.1152/ajpregu.00664.2003

- Girard, S., Tremblay, L., Lepage, M., & Sébire, G. (2010). IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J Immunol*, *184*(7), 3997-4005. doi:10.4049/jimmunol.0903349
- Golan, H. M., Lev, V., Hallak, M., Sorokin, Y., & Huleihel, M. (2005). Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology*, *48*(6), 903-917. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.12.023
- Grayson, B., Leger, M., Piercy, C., Adamson, L., Harte, M., & Neill, J. C. (2015). Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. *Behav Brain Res*, *285*, 176-193. doi:10.1016/j.bbr.2014.10.025
- Gustafson, B., & Smith, U. (2006). Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, *281*(14), 9507-9516. doi:10.1074/jbc.M512077200
- Günzel, D., & Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, *93*(2), 525-569. doi:10.1152/physrev.00019.2012
- Han, K. S., Mannaioni, G., Hamill, C. E., Lee, J., Junge, C. E., Lee, C. J., & Traynelis, S. F. (2011). Activation of protease activated receptor 1 increases the excitability of the dentate granule neurons of hippocampus. *Mol Brain*, *4*, 32. doi:10.1186/1756-6606-4-32
- Hashioka, S. (2011). Antidepressants and neuroinflammation: Can antidepressants calm glial rage down? *Mini Rev Med Chem*, *11*(7), 555-564.
- Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., & Betsholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*, *153*(3), 543-553.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., . . . Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, *155*(7), 1451-1463. doi:10.1016/j.cell.2013.11.024
- Huang, C., Fu, X. H., Zhou, D., & Li, J. M. (2015). The Role of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Disrupted Hippocampal Neurogenesis of Temporal Lobe Epilepsy: A Potential Therapeutic Target? *Neurochem Res*, *40*(7), 1319-1332. doi:10.1007/s11064-015-1614-1
- Hur, E. M., & Zhou, F. Q. (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci*, *11*(8), 539-551. doi:10.1038/nrn2870
- Ibi, D., & Yamada, K. (2015). Therapeutic Targets for Neurodevelopmental Disorders Emerging from Animal Models with Perinatal Immune Activation. *Int J Mol Sci*, *16*(12), 28218-28229. doi:10.3390/ijms161226092
- Ivens, S., Gabriel, S., Greenberg, G., Friedman, A., & Shelef, I. (2010). Blood-brain barrier breakdown as a novel mechanism underlying cerebral hyperperfusion syndrome. *J Neurol*, *257*(4), 615-620. doi:10.1007/s00415-009-5384-z
- Ivens, S., Kaufer, D., Flores, L. P., Bechmann, I., Zumsteg, D., Tomkins, O., . . . Friedman, A. (2007). TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain*, *130*(Pt 2), 535-547. doi:10.1093/brain/awl317
- Jamieson, D. J., Rasmussen, S. A., Uyeki, T. M., & Weinbaum, C. (2011). Pandemic influenza and pregnancy revisited: lessons learned from 2009 pandemic influenza A (H1N1). *Am J Obstet Gynecol*, *204*(6 Suppl 1), S1-3. doi:10.1016/j.ajog.2011.04.010
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *54 Pt 1*, 1-13.
- Jankowsky, J. L., & Patterson, P. H. (2001). The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol*, *63*(2), 125-149.
- Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., . . . Rodríguez, J. M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*, *159*(3), 187-193. doi:10.1016/j.resmic.2007.12.007
- Jin, M. S., & Lee, J. O. (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, *29*(2), 182-191. doi:10.1016/j.imm.2008.08.003 [pii]

10.1016/j.immuni.2008.07.007

- Johnson, G. B., Brunn, G. J., Tang, A. H., & Platt, J. L. (2003). Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors. *Trends Immunol*, *24*(1), 19-24. doi:S1471490602000145 [pii]
- Kang, J. Y., & Lee, J. O. (2011). Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem*, *80*, 917-941. doi:10.1146/annurev-biochem-052909-141507
- Kazdoba, T. M., Leach, P. T., & Crawley, J. N. (2015). Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. *Genes Brain Behav*. doi:10.1111/gbb.12256
- Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S. A., Bodmer, M., Hellings, J. A., . . . Prinszen, E. P. (2014). Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol*, *10*(11), 643-660. doi:10.1038/nrneurol.2014.187
- Koga, K., Aldo, P. B., & Mor, G. (2009). Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J Obstet Gynaecol Res*, *35*(2), 191-202. doi:10.1111/j.1447-0756.2008.00963.x
- Koga, K., Cardenas, I., Aldo, P., Abrahams, V. M., Peng, B., Fill, S., . . . Mor, G. (2009). Activation of TLR3 in the trophoblast is associated with preterm delivery. *Am J Reprod Immunol*, *61*(3), 196-212. doi:10.1111/j.1600-0897.2008.00682.x
- Korecka, A., de Wouters, T., Cultrone, A., Lapaque, N., Pettersson, S., Doré, J., . . . Arulampalam, V. (2013). ANGPTL4 expression induced by butyrate and rosiglitazone in human intestinal epithelial cells utilizes independent pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *304*(11), G1025-1037. doi:10.1152/ajpgi.00293.2012
- Korzhevskiy, D. E., & Kirik, O. V. (2015). [CEREBRAL MICROGLIA AND MICROGLIAL MARKERS]. *Morfologiya*, *147*(3), 37-44.
- Kovac, A., Erickson, M. A., & Banks, W. A. (2011). Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation*, *8*, 139. doi:10.1186/1742-2094-8-139
- Krishnan, L., Nguyen, T., & McComb, S. (2013). From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy. *J Reprod Immunol*, *97*(1), 62-73. doi:10.1016/j.jri.2012.10.015
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, *388*(4), 621-625. doi:S0006-291X(09)01631-3 [pii]
- 10.1016/j.bbrc.2009.08.062
- Lavialle, C., Cornelis, G., Dupressoir, A., Esnault, C., Heidmann, O., Vernochet, C., & Heidmann, T. (2013). Paleovirology of 'syncytins', retroviral env genes exapted for a role in placentation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *368*(1626), 20120507. doi:10.1098/rstb.2012.0507
- Lazic, S. E. (2015). Analytical strategies for the marble burying test: avoiding impossible predictions and invalid p-values. *BMC Res Notes*, *8*, 141. doi:10.1186/s13104-015-1062-7
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, *86*(6), 973-983. doi:S0092-8674(00)80172-5 [pii]
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C. J., . . . Dejana, E. (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*, *183*(3), 409-417. doi:10.1083/jcb.200806024
- Liebner, S., & Plate, K. H. (2010). Differentiation of the brain vasculature: the answer came blowing by the Wnt. *J Angiogenesis Res*, *2*, 1. doi:10.1186/2040-2384-2-1
- Liverman, C. S., Kaftan, H. A., Cui, L., Hersperger, S. G., Taboada, E., Klein, R. M., & Berman, N. E. (2006). Altered expression of pro-inflammatory and developmental genes in the fetal brain in a mouse model of maternal infection. *Neurosci Lett*, *399*(3), 220-225. doi:10.1016/j.neulet.2006.01.064
- Louis, P., Hold, G. L., & Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*, *12*(10), 661-672. doi:10.1038/nrmicro3344

- Machon, O., Backman, M., Machonova, O., Kozmik, Z., Vacik, T., Andersen, L., & Krauss, S. (2007). A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus. *Dev Biol*, *311*(1), 223-237. doi:10.1016/j.ydbio.2007.08.038
- Maggio, N., Shavit, E., Chapman, J., & Segal, M. (2008). Thrombin induces long-term potentiation of reactivity to afferent stimulation and facilitates epileptic seizures in rat hippocampal slices: toward understanding the functional consequences of cerebrovascular insults. *J Neurosci*, *28*(3), 732-736. doi:10.1523/JNEUROSCI.3665-07.2008
- Mandal, M., Donnelly, R., Elkabes, S., Zhang, P., Davini, D., David, B. T., & Ponzio, N. M. (2013). Maternal immune stimulation during pregnancy shapes the immunological phenotype of offspring. *Brain Behav Immun*, *33*, 33-45. doi:10.1016/j.bbi.2013.04.012
- Marchi, N., & Lerner-Natoli, M. (2013). Cerebrovascular remodeling and epilepsy. *Neuroscientist*, *19*(3), 304-312. doi:10.1177/1073858412462747
- Meyer, U. (2013). Developmental neuroinflammation and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *42*, 20-34. doi:10.1016/j.pnpbp.2011.11.003
- Meyer, U., & Feldon, J. (2012). To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology*, *62*(3), 1308-1321. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.01.009
- Meyer, U., Feldon, J., Schedlowski, M., & Yee, B. K. (2005). Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(6), 913-947. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.10.012
- Meyer, U., Murray, P. J., Urwyler, A., Yee, B. K., Schedlowski, M., & Feldon, J. (2008). Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol Psychiatry*, *13*(2), 208-221. doi:10.1038/sj.mp.4002042
- Meyer, U., Nyffeler, M., Engler, A., Urwyler, A., Schedlowski, M., Knuesel, I., . . . Feldon, J. (2006). The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J Neurosci*, *26*(18), 4752-4762. doi:10.1523/JNEUROSCI.0099-06.2006
- Miller, B. J., Culpepper, N., Rapaport, M. H., & Buckley, P. (2013). Prenatal inflammation and neurodevelopment in schizophrenia: a review of human studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *42*, 92-100. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.03.010
- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2015). Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood-brain barrier. *Curr Opin Immunol*, *38*, 18-23. doi:10.1016/j.coi.2015.10.008
- Moffett, A., & Loke, C. (2006). Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol*, *6*(8), 584-594. doi:10.1038/nri1897
- Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V., & Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, *5*(9), 691-701. doi:10.1038/nrg1427
- Morin-Brureau, M., Lebrun, A., Rousset, M. C., Fagni, L., Bockaert, J., de Bock, F., & Lerner-Natoli, M. (2011). Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways. *J Neurosci*, *31*(29), 10677-10688. doi:10.1523/JNEUROSCI.5692-10.2011
- Morin-Brureau, M., Rigau, V., & Lerner-Natoli, M. (2012). Why and how to target angiogenesis in focal epilepsies. *Epilepsia*, *53 Suppl 6*, 64-68. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03705.x
- Morrison, H. W., & Filosa, J. A. (2013). A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation*, *10*, 4. doi:10.1186/1742-2094-10-4
- Naylor, A. J., McGettrick, H. M., Maynard, W. D., May, P., Barone, F., Croft, A. P., . . . Buckley, C. D. (2014). A differential role for CD248 (Endosialin) in PDGF-mediated skeletal muscle angiogenesis. *PLoS One*, *9*(9), e107146. doi:10.1371/journal.pone.0107146

- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., . . . Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, *161*(3), 653-660. doi:10.1083/jcb.200302070
- Noebels, J. L. (2003). How a Sodium Channel Mutation Causes Epilepsy. *Epilepsy Curr*, *3*(2), 70-71. doi:10.1046/j.1535-7597.2003.03214.x
- Nørgaard, M., Ehrenstein, V., Nielsen, R. B., Bakketeig, L. S., & Sørensen, H. T. (2012). Maternal use of antibiotics, hospitalisation for infection during pregnancy, and risk of childhood epilepsy: a population-based cohort study. *PLoS One*, *7*(1), e30850. doi:10.1371/journal.pone.0030850
- O'Dell, C. M., Das, A., Wallace, G., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2012). Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. *J Neurosci Res*, *90*(5), 913-924. doi:10.1002/jnr.22829
- O'Grady, K. A., McHugh, L., Nolan, T., Richmond, P., Wood, N., Marshall, H. S., . . . Andrews, R. M. (2014). FluMum: a prospective cohort study of mother-infant pairs assessing the effectiveness of maternal influenza vaccination in prevention of influenza in early infancy. *BMJ Open*, *4*(6), e005676. doi:10.1136/bmjopen-2014-005676
- O'Neill, L. A., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, *13*(6), 453-460. doi:10.1038/nri3446
- Ohtsuki, S., Yamaguchi, H., Katsukura, Y., Asashima, T., & Terasaki, T. (2008). mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem*, *104*(1), 147-154. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05008.x
- Okun, E., Griffioen, K. J., & Mattson, M. P. (2011). Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci*, *34*(5), 269-281. doi:S0166-2236(11)00021-X [pii] 10.1016/j.tins.2011.02.005
- Orellana, A. M., Vasconcelos, A. R., Leite, J. A., de Sá Lima, L., Andreotti, D. Z., Munhoz, C. D., . . . Scavone, C. (2015). Age-related neuroinflammation and changes in AKT-GSK-3 β and WNT/ β -CATENIN signaling in rat hippocampus. *Aging (Albany NY)*.
- Owen, R. D. (1945). IMMUNOGENETIC CONSEQUENCES OF VASCULAR ANASTOMOSES BETWEEN BOVINE TWINS. *Science*, *102*(2651), 400-401. doi:10.1126/science.102.2651.400
- Paintlia, M. K., Paintlia, A. S., Barbosa, E., Singh, I., & Singh, A. K. (2004). N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. *J Neurosci Res*, *78*(3), 347-361. doi:10.1002/jnr.20261
- Pardridge, W. M. (2003a). Blood-brain barrier genomics and the use of endogenous transporters to cause drug penetration into the brain. *Curr Opin Drug Discov Devel*, *6*(5), 683-691.
- Pardridge, W. M. (2003b). Molecular biology of the blood-brain barrier. *Methods Mol Med*, *89*, 385-399. doi:10.1385/1-59259-419-0:385
- Patan, S. (2004). Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*, *117*, 3-32.
- Patterson, P. H. (2007). Neuroscience. Maternal effects on schizophrenia risk. *Science*, *318*(5850), 576-577. doi:10.1126/science.1150196
- Patterson, P. H. (2009). Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res*, *204*(2), 313-321. doi:10.1016/j.bbr.2008.12.016
- Pazos, M., Sperling, R. S., Moran, T. M., & Kraus, T. A. (2012). The influence of pregnancy on systemic immunity. *Immunol Res*, *54*(1-3), 254-261. doi:10.1007/s12026-012-8303-9
- Pekny, M., & Pekna, M. (2015). Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbadis.2015.11.014
- Peng, L., He, Z., Chen, W., Holzman, I. R., & Lin, J. (2007). Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr Res*, *61*(1), 37-41. doi:10.1203/01.pdr.0000250014.92242.f3
- Penner, J. D., & Brown, A. S. (2007). Prenatal infectious and nutritional factors and risk of adult schizophrenia. *Expert Rev Neurother*, *7*(7), 797-805. doi:10.1586/14737175.7.7.797

- Petito, C. K., Schaefer, J. A., & Plum, F. (1977). Ultrastructural characteristics of the brain and blood-brain barrier in experimental seizures. *Brain Res*, *127*(2), 251-267.
- Pineda, E., Jentsch, J. D., Shin, D., Griesbach, G., Sankar, R., & Mazarati, A. (2014). Behavioral impairments in rats with chronic epilepsy suggest comorbidity between epilepsy and attention deficit/hyperactivity disorder. *Epilepsy Behav*, *31*, 267-275. doi:10.1016/j.yebeh.2013.10.004
- Pitkänen, A., & Sutula, T. P. (2002). Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*, *1*(3), 173-181.
- Quaegebeur, A., Lange, C., & Carmeliet, P. (2011). The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron*, *71*(3), 406-424. doi:10.1016/j.neuron.2011.07.013
- Racine, R. J., Gartner, J. G., & Burnham, W. M. (1972). Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. *Brain Res*, *47*(1), 262-268.
- Ravizza, T., Gagliardi, B., Noé, F., Boer, K., Aronica, E., & Vezzani, A. (2008). Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, *29*(1), 142-160. doi:10.1016/j.nbd.2007.08.012
- Redline, R. W. (2015). Classification of placental lesions. *Am J Obstet Gynecol*, *213*(4 Suppl), S21-28. doi:10.1016/j.ajog.2015.05.056
- Reis, M., Czupalla, C. J., Ziegler, N., Devraj, K., Zinke, J., Seidel, S., . . . Liebner, S. (2012). Endothelial Wnt/ β -catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression. *J Exp Med*, *209*(9), 1611-1627. doi:10.1084/jem.20111580
- Reisinger, S., Khan, D., Kong, E., Berger, A., Pollak, A., & Pollak, D. D. (2015). The Poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacol Ther*, *149*, 213-226. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.01.001
- Ritzenthaler, S., & Chiba, A. (2003). Myopodia (postsynaptic filopodia) participate in synaptic target recognition. *J Neurobiol*, *55*(1), 31-40. doi:10.1002/neu.10180
- Rodgers, A. B., Morgan, C. P., Leu, N. A., & Bale, T. L. (2015). Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(44), 13699-13704. doi:10.1073/pnas.1508347112
- Roe, K., Orillo, B., & Verma, S. (2014). West Nile virus-induced cell adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells regulate leukocyte adhesion and modulate permeability of the in vitro blood-brain barrier model. *PLoS One*, *9*(7), e102598. doi:10.1371/journal.pone.0102598
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., & Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol*, *9*(9), 1081-1088. doi:ncb1629 [pii] 10.1038/ncb1629
- Rose, D., Zhu, X., Kose, H., Hoang, B., Cho, J., & Chiba, A. (1997). Toll, a muscle cell surface molecule, locally inhibits synaptic initiation of the RP3 motoneuron growth cone in *Drosophila*. *Development*, *124*(8), 1561-1571.
- Rupp, C., Dolznig, H., Puri, C., Sommergruber, W., Kerjaschki, D., Rettig, W. J., & Garin-Chesa, P. (2006). Mouse endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor: expression during embryonic development and induction in experimental cancer neoangiogenesis. *Cancer Immun*, *6*, 10.
- Sabin, A. B., & Olitsky, P. K. (1937). INFLUENCE OF HOST FACTORS ON NEUROINVASIVENESS OF VESICULAR STOMATITIS VIRUS : I. EFFECT OF AGE ON THE INVASION OF THE BRAIN BY VIRUS INSTILLED IN THE NOSE. *J Exp Med*, *66*(1), 15-34.
- Samuelsson, A. M., Jennische, E., Hansson, H. A., & Holmäng, A. (2006). Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with

- NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *290*(5), R1345-1356. doi:10.1152/ajpregu.00268.2005
- Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., & Isolauri, E. (2009). Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Lett Appl Microbiol*, *48*(1), 8-12. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02475.x
- Saunders, N. R., Dreifuss, J. J., Dziegielewska, K. M., Johansson, P. A., Habgood, M. D., Møllgård, K., & Bauer, H. C. (2014). The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci*, *8*, 404. doi:10.3389/fnins.2014.00404
- Saunders, N. R., Liddelow, S. A., & Dziegielewska, K. M. (2012). Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol*, *3*, 46. doi:10.3389/fphar.2012.00046
- Scheffer, I. E., Harkin, L. A., Grinton, B. E., Dibbens, L. M., Turner, S. J., Zielinski, M. A., . . . Berkovic, S. F. (2007). Temporal lobe epilepsy and GEF5+ phenotypes associated with SCN1B mutations. *Brain*, *130*(Pt 1), 100-109. doi:10.1093/brain/awl272
- Seiffert, E., Dreier, J. P., Ivens, S., Bechmann, I., Tomkins, O., Heinemann, U., & Friedman, A. (2004). Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci*, *24*(36), 7829-7836. doi:10.1523/JNEUROSCI.1751-04.2004
- Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W., & Patterson, P. H. (2003). Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci*, *23*(1), 297-302.
- Shi, L., Tu, N., & Patterson, P. H. (2005). Maternal influenza infection is likely to alter fetal brain development indirectly: the virus is not detected in the fetus. *Int J Dev Neurosci*, *23*(2-3), 299-305. doi:10.1016/j.ijdevneu.2004.05.005
- Simons, M., & Mlodzik, M. (2008). Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet*, *42*, 517-540. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091432
- Smith, S. E., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*, *27*(40), 10695-10702. doi:10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007
- Stamatovic, S. M., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2008). Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol*, *6*(3), 179-192. doi:10.2174/157015908785777210
- Stein, A. D., & Lumey, L. H. (2000). The relationship between maternal and offspring birth weights after maternal prenatal famine exposure: the Dutch Famine Birth Cohort Study. *Hum Biol*, *72*(4), 641-654.
- Stolp, H. B., & Dziegielewska, K. M. (2009). Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *35*(2), 132-146. doi:10.1111/j.1365-2990.2008.01005.x
- Sun, Y., Vestergaard, M., Christensen, J., Nahmias, A. J., & Olsen, J. (2008). Prenatal exposure to maternal infections and epilepsy in childhood: a population-based cohort study. *Pediatrics*, *121*(5), e1100-1107. doi:10.1542/peds.2007-2316
- Sun, Y., Vestergaard, M., Christensen, J., & Olsen, J. (2011). Prenatal exposure to elevated maternal body temperature and risk of epilepsy in childhood: a population-based pregnancy cohort study. *Paediatr Perinat Epidemiol*, *25*(1), 53-59. doi:10.1111/j.1365-3016.2010.01143.x
- Suresh Babu, S., Valdez, Y., Xu, A., O'Byrne, A. M., Calvo, F., Lei, V., & Conway, E. M. (2014). TGFβ-mediated suppression of CD248 in non-cancer cells via canonical Smad-dependent signaling pathways is uncoupled in cancer cells. *BMC Cancer*, *14*, 113. doi:10.1186/1471-2407-14-113
- Sørensen, H. J., Mortensen, E. L., Reinisch, J. M., & Mednick, S. A. (2009). Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia. *Schizophr Bull*, *35*(3), 631-637. doi:10.1093/schbul/sbn121
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., . . . Beutler, B. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol*, *7*(2), 156-164. doi:ni1297 [pii]

10.1038/ni1297

- Tomkowicz, B., Rybinski, K., Sebeck, D., Sass, P., Nicolaidis, N. C., Grasso, L., & Zhou, Y. (2010). Endosialin/TEM-1/CD248 regulates pericyte proliferation through PDGF receptor signaling. *Cancer Biol Ther*, *9*(11), 908-915.
- Toro, R., Konyukh, M., Delorme, R., Leblond, C., Chaste, P., Fauchereau, F., . . . Bourgeron, T. (2010). Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Genet*, *26*(8), 363-372. doi:10.1016/j.tig.2010.05.007
- Tscheik, C., Blasig, I. E., & Winkler, L. (2013). Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers*, *1*(2), e24565. doi:10.4161/tisb.24565
- Turrin, N. P., & Rivest, S. (2004). Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis*, *16*(2), 321-334. doi:10.1016/j.nbd.2004.03.010
- Urakubo, A., Jarskog, L. F., Lieberman, J. A., & Gilmore, J. H. (2001). Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res*, *47*(1), 27-36.
- van Vliet, E. A., da Costa Araújo, S., Redeker, S., van Schaik, R., Aronica, E., & Gorter, J. A. (2007). Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*, *130*(Pt 2), 521-534. doi:10.1093/brain/awl318
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*, *7*(1), 31-40. doi:10.1038/nrneurol.2010.178
- Vezzani, A., & Granata, T. (2005). Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, *46*(11), 1724-1743. doi:10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x
- Virgintino, D., Errede, M., Robertson, D., Capobianco, C., Girolamo, F., Vimercati, A., . . . Roncali, L. (2004). Immunolocalization of tight junction proteins in the adult and developing human brain. *Histochem Cell Biol*, *122*(1), 51-59. doi:10.1007/s00418-004-0665-1
- Virgintino, D., Girolamo, F., Errede, M., Capobianco, C., Robertson, D., Stallcup, W. B., . . . Roncali, L. (2007). An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis. *Angiogenesis*, *10*(1), 35-45. doi:10.1007/s10456-006-9061-x
- Watson, E. D., & Cross, J. C. (2005). Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)*, *20*, 180-193. doi:10.1152/physiol.00001.2005
- Winkler, E. A., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci*, *14*(11), 1398-1405. doi:10.1038/nn.2946
- Wolf, J., Rose-John, S., & Garbers, C. (2014). Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*, *70*(1), 11-20. doi:10.1016/j.cyto.2014.05.024
- Wong, A. H., Gottesman, I. I., & Petronis, A. (2005). Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Hum Mol Genet*, *14 Spec No 1*, R11-18. doi:10.1093/hmg/ddi116
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., . . . Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, *301*(5633), 640-643. doi:10.1126/science.1087262
- Yamamoto, M., & Takeda, K. (2010). Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract*, *2010*, 240365. doi:10.1155/2010/240365
- Yuan, S., Wu, K., Yang, M., Xu, L., Huang, L., Liu, H., . . . Xu, A. (2010). Amphioxus SARM involved in neural development may function as a suppressor of TLR signaling. *J Immunol*, *184*(12), 6874-6881. doi:jimmunol.0903675 [pii] 10.4049/jimmunol.0903675
- Zaretsky, M. V., Alexander, J. M., Byrd, W., & Bawdon, R. E. (2004). Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstet Gynecol*, *103*(3), 546-550. doi:10.1097/01.AOG.0000114980.40445.83
- Zhang, Y., Yuan, X., Wang, Z., & Li, R. (2014). The canonical Wnt signaling pathway in autism. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *13*(5), 765-770.

- Zhao, B., & Schwartz, J. P. (1998). Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J Neurosci Res*, *52*(1), 7-16.
- Zuckerman, L., & Weiner, I. (2005). Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. *J Psychiatr Res*, *39*(3), 311-323. doi:10.1016/j.jpsychires.2004.08.008