

**Corso di Dottorato in
Life Science and Technology**

CICLO XXXVI

**Aspetti neurocomportamentali e possibili approcci
terapeutici del Disturbo dello Spettro Autistico nel
modello roditore BTBR T+Itpr3tf/J (BTBR)**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/06

Coordinatore: Prof. Tommaso Angelone

Firma



Tommaso Angelone
11.04.2024 11:58:49
GMT+01:00

Supervisore/Tutor:

Prof.ssa Rosa Maria Facciolo

Firma



ROSA MARIA
FACCIOLO
04.04.2024
08:35:56
GMT+00:00

Dott.ssa Loredana De Bartolo

Firma



Loredana De
Bartolo
04.04.2024
09:30:53
GMT+01:00

Firma oscurata in base alle linee
guida del Garante della privacy

| Olivito Ilaria

Dedico questo lavoro al Prof. Marcello Canonaco, un mentore straordinario che ha costantemente creduto nel mio potenziale.

Il suo spirito instancabile e la sua dedizione alla conoscenza mi hanno insegnato a cercare sempre l'eccellenza.

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	4
GRAPHICAL ABSTRACT	7
INTRODUZIONE	8
STATO DELL'ARTE	13
IL DISTURBO DELLO SPETTRO AUTISTICO (ASD)	14
1. CARATTERISTICHE CLINICHE	14
2. EPIDEMIOLOGIA	16
2.1 DIFFERENZE DI GENERE NELL'AUTISMO: IMPLICAZIONI PER LA PREVALENZA E LA DIAGNOSI	17
3. EZIOLOGIA	19
3.1 FATTORI GENETICI	20
3.1.1 Geni candidati	22
3.1.1.1 Molecole di Adesione Cellulare Sinaptiche	23
3.1.1.2 Proteine scaffold	24
3.1.1.3 Canali ionici	26
3.1.1.4 Geni candidati: oltre le sinapsi	26
3.1.2 Polimorfismi a singolo nucleotide	27
3.1.3 Variazioni del numero di copie	29
3.2 FATTORI AMBIENTALI	30
3.2.1. Età parentale	31
3.2.2 Influenza degli steroidi sessuali	31
3.2.3 Impatto dello stato fisico e mentale materno	32
3.2.4 Stato nutrizionale	33
3.2.4.1 Zinco	34
3.2.4.2 Folato	35
3.2.4.3 Vitamina D	36
3.2.5 Inquinanti ambientali	37
3.2.6 Medicinali e droghe	38
3.2.7 Vaccini e autismo: un falso mito!	39
3.3 FATTORI EPIGENETICI	40
4. FISIOPATOLOGIA DELL'ASD	43
4.1 ALTERAZIONI NEUROCHIMICHE	44
4.1.1 Il sistema GABAergico e Glutammatergico	44
4.1.2 Ossitocina	47
4.2 INFIAMMAZIONE	49
4.3 STRESS OSSIDATIVO	51
4.4 AUTOFAGIA	53
4.5 MIELINA E OLIGODENDROCITI	55
4.6 L'ASSE INTESTINO-CERVELLO	57

5. DIETA CHETOGENICA	63
5.1 METABOLISMO CEREBRALE DEI CORPI CHETONICI	64
5.2 Effetti neuroprotettivi della dieta chetogenica	65
MATERIALI & METODI	69
1. MODELLO SPERIMENTALE: BTBR T+ITPR3TF/J (BTBR)	70
2. PARTE I-A	72
2.1 PROCEDURA SPERIMENTALE	72
2.2 ANALISI COMPORTAMENTALE	73
2.2.1 Light Dark Test	74
2.2.2 Three Chamber test	75
2.2.3 Self Grooming Test	77
2.2.4 Novel Object Recognition Test	78
2.3 ANALISI CITOCHINE PRO-Infiammatorie	79
2.4 ANALISI MARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO	80
2.4.1 Dosaggio delle Sostanze Reattive all'Acido Tiobarbiturico	80
2.4.2 Dosaggio della superossido dismutasi	81
2.5 ANALISI DEL MICROBIOTA	81
2.6 ANALISI STATISTICA	83
3. PARTE I-B	84
3.1 PROCEDURA SPERIMENTALE	84
3.2 TRATTAMENTO	84
3.2.1 Coltura batterica	85
3.3 ANALISI COMPORTAMENTALE	86
3.3.1 Three Chamber test	86
3.3.2 Open Field Test	87
3.3.3 Elevated Plus Maze test	88
3.4 ANALISI MOLECOLARI	88
3.4.1 Analisi delle immunoglobuline reattive per l'ossitocina	88
3.4.2 Dosaggio ossitocina plasmatica	90
3.5 ANALISI STATISTICA	91
4. PARTE II	92
4.1 PROCEDURA SPERIMENTALE	92
4.2 ALLESTIMENTO DELLE COLTURE NEURONALI	93
4.2.1 Supporti a membrana	94
4.3 SIMULAZIONE DELLA CHETOSI IN VITRO	94
4.4 ANALISI IMMUNOCOLORIMETRICA PER LA MICROSCOPIA CONFOCALE A SCANSIONE LASER	95
4.5 ATTIVITÀ METABOLICA DELLE CELLULE	95
4.6 ANALISI STATISTICA	96
RISULTATI	97
RISULTATI RELATIVI ALLA PARTE I-A	98
1.1 EFFETTO DELLA KD SULLE PERFORMANCE COMPORTAMENTALI	98
1.2 EFFETTO DELLA KD SULLE CITOCHINE PRO-Infiammatorie	102
1.3 EFFETTI DELLA KD SULLO STRESS OSSIDATIVO	106

1.4 EFFETTI DELLA KD SUL MICROBIOTA INTESTINALE	107
RISULTATI RELATIVI ALLA PARTE I-B	112
1.5 EFFETTI DEI CEPI DI LACTOBACILLUS SULLE ATTIVITÀ COMPORTAMENTALI	112
1.6 EFFETTI DEI CEPI DI LACTOBACILLUS SU OSSITOCINA E IMMUNOGLOBULINE REATTIVE ALL'OSSITOCINA	119
RISULTATI RELATIVI ALLA PARTE II	121
1.7 ANALISI IMMUNOCOLORIMETRICA AL CONFOCALE	121
1.8 ANALISI METABOLICA	125
DISCUSSIONE	128
<hr/>	
CONCLUSIONI	137
BIBLIOGRAFIA	139
<hr/>	

RIASSUNTO

Il Disturbo dello Spettro Autistico (ASD) è una sindrome del neurosviluppo caratterizzata da un'ampia gamma di sintomi clinici che si manifestano attraverso deficit sociali e comportamenti ripetitivi e stereotipati. Questi sintomi spesso si associano a comorbidità psichiatriche e mediche che aggiungono complessità al quadro patologico del disturbo. La sua pervasiva diffusione e persistenza per l'intero corso della vita conferiscono all'ASD una rilevanza significativa nell'ambito della salute pubblica. Tuttavia, i meccanismi fisiopatologici sottostanti risultano ancora parzialmente compresi e attualmente mancano farmaci specifici mirati.

Dato l'alto grado di complessità e di eterogeneità della sintomatologia associata a questa sindrome, l'adozione di un approccio multifunzionale emerge come un valido strumento per approfondire la comprensione della sua fisiopatologia e per sviluppare terapie più efficaci. Nel quadro di queste strategie, l'induzione dello stato metabolico di chetosi risulta un approccio promettente, in grado di ridurre comportamenti anomali e migliorare contemporaneamente l'aspetto psicologico e sociologico in diverse malattie neurologiche, attraverso vari percorsi molecolari e la modulazione del microbiota intestinale, identificato come un importante centro di regolazione cerebrale.

In questo contesto, il presente progetto di dottorato mira a contribuire significativamente alla comprensione della fisiopatologia dell'ASD, esaminando approfonditamente gli aspetti comportamentali, le dinamiche molecolari, la correlazione con il microbiota intestinale e le potenziali strategie terapeutiche. In particolare, l'analisi degli impatti della chetosi sulle performance comportamentali e su meccanismi molecolari-chiave, integrata alla valutazione del microbiota intestinale, rappresenta l'approccio metodologico adottato nel corso di questa ricerca utilizzando il modello murino di autismo BTBR, sia in vivo che in vitro.

Da un primo studio in vivo, l'uso di una dieta chetogenica (KD) ha ridotto i deficit sociali ($p=0.002$), i comportamenti ripetitivi ($p<0.001$) e i disturbi di memoria ($p=0.001$) nei topi BTBR. Questi cambiamenti comportamentali si sono associati a livelli ridotti di espressione del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), interleuchina (IL)-1 β e IL-6 nel plasma ($p = 0.007$; $p < 0.001$ e $p = 0.023$, rispettivamente), nella corteccia prefrontale (PFC; $p = 0.006$; $p = 0.04$ e $p = 0.03$) e nell'ippocampo (HIP; $p = 0.02$; $p = 0.09$ e $p = 0.03$). Inoltre, la KD ha contribuito a ridurre lo stress ossidativo modificando i livelli di perossidazione lipidica (TBARS) e l'attività della superossido dismutasi (SOD) nelle suddette aree cerebrali. È stato interessante notare che la KD ha aumentato i microbi potenzialmente benefici (*Akkermansia* e *Blautia*) e normalizzato i livelli aberranti di

Lactobacillus, sottolineando così il suo impatto neurofisiologico anche attraverso la modulazione del microbiota intestinale.

La correlazione tra la modulazione del microbiota intestinale e i cambiamenti comportamentali è supportata dall'analisi dettagliata dell'effetto di cinque ceppi di *Lactobacilli* nei topi BTBR in uno studio condotto durante il periodo all'estero previsto all'interno del progetto di dottorato. Questo studio specifico ha rivelato un impatto differenziale dei ceppi *L. salivarius* - LS7892, *L. gasseri* - LG6410, *L. plantarum* - LP14D, *L. reuteri* -LR92 e *L. camelliae* - LC LMG 24277 sul comportamento sociale, attività motoria e ansia nei topi BTBR. Tra i ceppi oggetto di studio, LS7892 si è configurato come un potenziale probiotico per il trattamento dell'ASD.

In seguito, lo studio in vitro ha evidenziato alterazioni nell'organizzazione citoscheletrica e sinaptica nei neuroni PFC e HIP dei BTBR, in associazione a variazioni nei livelli di espressione del Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). L'induzione di uno stato di chetosi ha modulato positivamente la rete neuronale, stabilizzando le connessioni compromesse e aumentando significativamente i livelli del BDNF ($p < 0.001$).

In sintesi, i risultati di questo progetto di dottorato evidenziano la significativa rilevanza dell'approccio chetogenico e delle modulazioni del microbiota nel contesto dell'ASD, contribuendo a una comprensione più approfondita delle basi fisiopatologiche e aprendo prospettive innovative per lo sviluppo di terapie personalizzate e mirate.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental syndrome characterized by a diverse range of clinical manifestations, encompassing social deficits and repetitive stereotypical behaviors. These symptoms often coexist with psychiatric and medical comorbidities, adding intricacy to the pathological profile of the disorder. The pervasive prevalence and enduring symptoms across the lifespan underscore the significant public health impact of ASD. However, the underlying pathophysiological mechanisms remain poorly understood, and there is a current lack of specific targeted medications.

Given the intricate and heterogeneous nature of the symptomatology associated with this syndrome, the adoption of a multifaceted approach emerges as a valuable strategy to deepen the comprehension of its pathophysiology and advance more effective therapeutic interventions. Within these strategic considerations, inducing a ketogenic metabolic state presents a promising avenue, capable of mitigating abnormal behaviors while concurrently ameliorating psychological and sociological aspects across various neurological conditions. This approach operates through diverse molecular pathways, including the modulation of the gut microbiota, identified as a pivotal center for brain regulation.

In the context of addressing these challenges, the current doctoral project aims to significantly contribute to the comprehension of ASD's pathophysiology. This is achieved through a comprehensive exploration of behavioral aspects, molecular dynamics, the association with the gut microbiota, and potential therapeutic strategies. Noteworthy is the adopted methodological approach, which involves analyzing the effects of ketosis in the BTBR rodent model of autism, encompassing both *in vivo* and *in vitro* assessments. This analysis includes evaluations of behavioral performance, key molecular mechanisms, and integration with the assessment of the gut microbiota.

Results from an initial *in vivo* study demonstrated that the adoption of a ketogenic diet (KD) notably mitigated ($p=0.002$), repetitive behaviors ($p<0.001$), and memory impairments ($p=0.001$) in BTBR mice. These behavioral enhancements were associated with reduced levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and interleukin-6 in the plasma ($p=0.007$; $p<0.001$, and $p=0.023$, respectively), prefrontal cortex (PFC; $p=0.006$; $p=0.04$, and $p=0.03$), and hippocampus (HIP; $p=0.02$; $p=0.09$, and $p=0.03$). Furthermore, the KD mitigated oxidative stress, evidenced by modifications in lipid peroxidation levels (TBARS) and superoxide dismutase (SOD) activity in the brain areas of BTBR mice. Of particular interest, the KD positively influenced beneficial

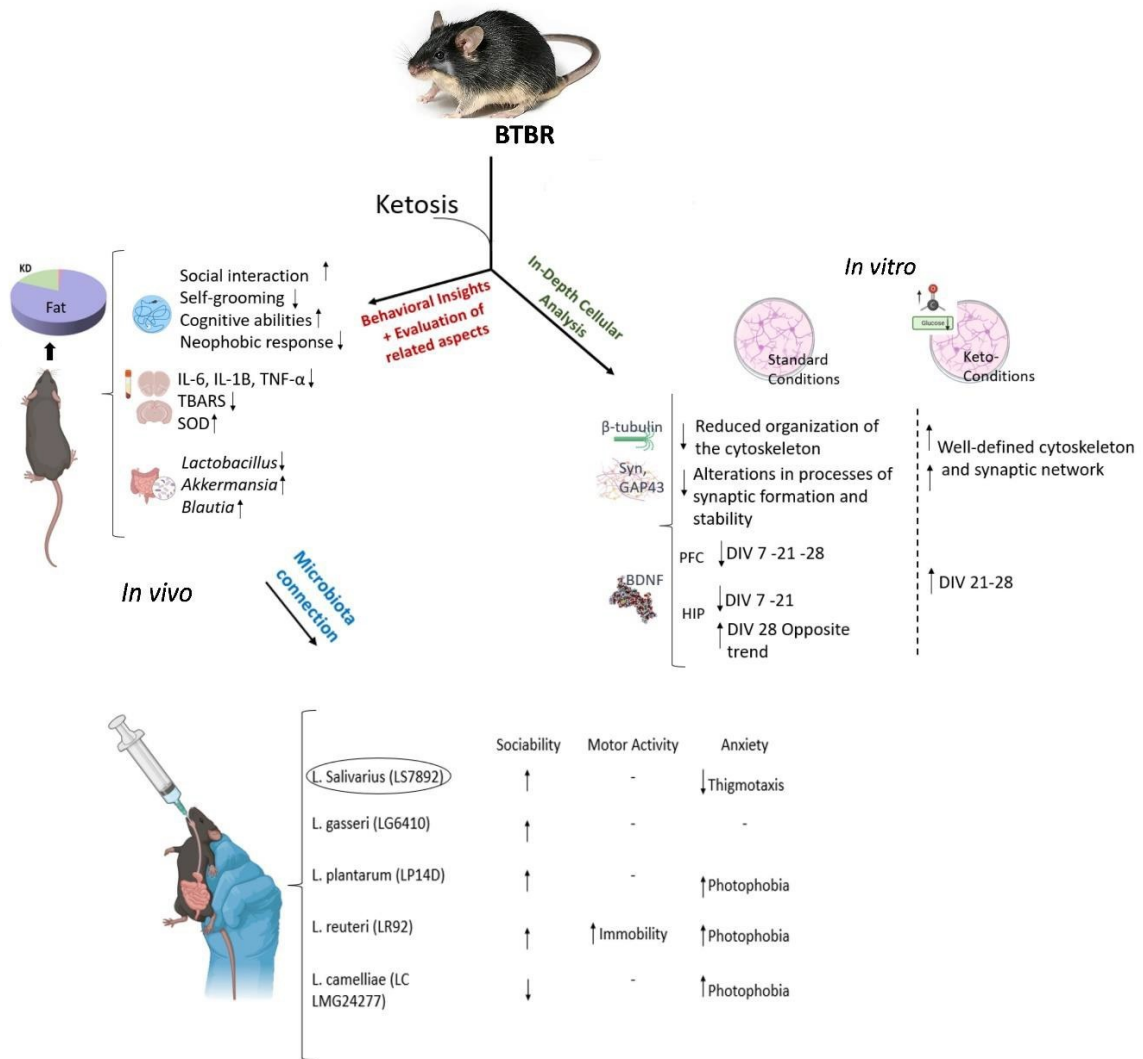
microbiota (*Akkermansia* and *Blautia*) and normalized aberrant levels of *Lactobacillus* in the feces of BTBR mice, underlining its neurophysiological impact through the modulation of the gut microbiota.

The correlation between gut microbiota modulation and behavioral changes is substantiated by a meticulous analysis of the effects of five *Lactobacillus* strains in a study conducted during the planned abroad period within the doctoral project. This specific investigation unveiled a differential impact of the strains *L. salivarius* - LS7892, *L. gasseri* - LG6410, *L. plantarum* - LP14D, *L. reuteri* - LR92, and *L. camelliae* - LC LMG 24277 on social behavior, motor activity, and anxiety in BTBR mice. Particularly noteworthy, LS7892 emerged as a potential probiotic for ASD treatment among the examined strains.

Following in vitro investigations revealed alterations in the cytoskeletal and synaptic organization in PFC and HIP neurons of BTBR, linked to fluctuations in Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) expression levels. The induction of a ketogenic state exhibited a beneficial modulation of the neural network, stabilizing compromised connections, and significantly increasing BDNF levels ($p < 0.001$).

In conclusion, the outcomes of this doctoral project underscore the significant relevance of the ketogenic approach and the modulation of the gut microbiota in the context of ASD. This research contributes to a more profound understanding of the pathophysiological foundations, offering innovative perspectives for the development of personalized and targeted therapeutic approaches.

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUZIONE

L'autismo è un complesso disturbo dello sviluppo neurologico che si distingue per la sua diffusione significativa, la complessità delle sue manifestazioni, il peso emotivo ed economico che impone alle famiglie coinvolte, e per il suo impatto sulla comunità in termini di questioni sociali, economiche ed educative (Lyall et al., 2017). Le caratteristiche diagnostiche che definiscono tale disturbo includono un'interazione sociale e una capacità di comunicazione compromessa, unite a modelli di comportamento ristretti e ripetitivi (Kodak e Bergmann, 2020). Poiché l'intensità con cui si manifestano questi sintomi differisce tra i soggetti e può subire una modulazione nel tempo, tale sindrome va considerata all'interno di uno "spettro" ed è identificata come Disturbo dello Spettro Autistico (acronimo inglese di "Autism Spectrum Disorder", ASD; Ousley e Cermak, 2014). In aggiunta, comorbidità psichiatriche e mediche quali ansia, deficit mnemonici e disturbi gastrointestinali sono comuni tra i soggetti affetti da tale disturbo. Perciò esse, sovrapponendosi e mascherando le caratteristiche principali dell'ASD, introducono ulteriori complessità nella gestione di questa condizione (Alò et al., 2021; Shu et al., 2022).

Ad oggi, i processi patologici e l'eziologia molecolare di questo disturbo non sono stati ancora completamente definiti a causa dell'interazione complessa tra una componente genetica altamente eterogenea e una molteplicità di fattori ambientali che possono influenzarne la manifestazione fenotipica (Cheroni et al., 2020). Di conseguenza, gli approcci terapeutici utilizzati per il trattamento di questa sindrome sono spesso limitati e agiscono principalmente sulle comorbidità piuttosto che sui sintomi diagnostici. Ciononostante, meccanismi fisiopatologici chiave emergono come promettenti linee di ricerca per aumentare la nostra comprensione sull'autismo e per cercare percorsi comuni che potrebbero essere utili per lo sviluppo di terapie più mirate.

Evidenze in letteratura indicano che gli eventi infiammatori svolgono un ruolo cruciale nella patogenesi dell'ASD, influenzando in particolar modo la manifestazione dei suoi sintomi comportamentali (Lee et al., 2016; Abruzzo et al., 2019; Tzanoulinou et al., 2022). I pazienti affetti da ASD presentano stati infiammatori alterati e irregolarità nel sistema immunitario, con livelli significativamente elevati di citochine pro-infiammatorie, quali interleuchine (IL) e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α ; Ahmad et al., 2019). L'infiammazione in un certo range fisiologico svolge una funzione protettiva modulando la plasticità cerebrale e mantenendo l'equilibrio neuronale. Tuttavia, una sua deviazione da questo range può portare a deficit neuronali e contribuire allo sviluppo di aberrazioni comportamentali (Golia et al., 2019; Xie et al., 2021).

In parallelo, condizioni significative di stress ossidativo sono state documentate nell'ASD e correlate alla sua patogenesi (Pangrazzi et al., 2020). Così come l'infiammazione, anche lo stress ossidativo a concentrazioni fisiologiche nell'organismo, regola diverse funzioni neuronali quali la plasticità sinaptica, la segnalazione cellulare, l'orientamento degli assoni e l'apoptosi (Jomova et al., 2023). In uno stato cronico, però, le specie reattive possono diventare dannose e compromettere le funzioni neuronali anche a seguito dell'induzione/alimentazione di disfunzioni neuro-infiammatorie (Teleanu et al., 2022). Inoltre, evidenze crescenti suggeriscono che la comunicazione tra il microbiota intestinale e il sistema nervoso centrale, nota come asse intestino-cervello, può essere coinvolta nelle anomalie comportamentali tipiche dell'ASD (Avolio et al., 2022). Oltre al suo coinvolgimento nello sviluppo cerebrale, il microbiota intestinale è in grado di influenzare la funzionalità neuronale in ogni fase di vita attraverso vari meccanismi (Chen et al., 2021). La popolazione microbica dell'intestino può, infatti, attraverso metaboliti, neurotrasmettitori e altri componenti neuroattivi influenzare la trasmissione di segnali neuronali e/o innescare processi infiammatori (Morais et al., 2021). Inoltre, la mimica molecolare derivante dai microrganismi, che si manifesta attraverso l'omologia tra gli antigeni derivati dai microrganismi e quelli derivati dall'uomo, è stata riconosciuta come un'altra modalità attraverso cui il microbiota intestinale può modulare le funzioni neuronali (Elsayed et al., 2022). A tal proposito, recentemente è stato dimostrato che un lisato di *Lactobacillus reuteri* è in grado di aumentare sia i livelli plasmatici di ossitocina che il numero di neuroni immunopositivi all'ossitocina nella parte caudale del nucleo paraventricolare dei roditori (Varian et al., 2017). Questo suggerisce la capacità del lisato di produrre molecole segnalatrici che favoriscono il rilascio di ossitocina, un ormone coinvolto nel comportamento sociale e considerato un potenziale obiettivo terapeutico nell'autismo (Huang et al., 2021).

Gli studi epidemiologici indicano che un approccio dietetico adeguato, agendo in multilivello attraverso diverse dimensioni fisiologiche e sistemi biologici, possa contribuire al miglioramento di vari disturbi, inclusi quelli neurologici, e fornire così una prospettiva utile per comprendere più approfonditamente i meccanismi patologici correlati (Mao et al., 2021; Haro et al., 2019; Feng et al., 2022; Ramírez-Salazar et al., 2021). In tale contesto, la dieta chetogenica (KD), regime dietetico responsabile dell'induzione dello stato metabolico definito "chetosi", emerge come un elemento rilevante. La KD riducendo in modo drastico i carboidrati e aumentando di contro i grassi, costringe il corpo ad utilizzare questi ultimi come fonte energetica attraverso processi di

degradazione e di formazione di corpi chetonici come il 3- β -idrossibutirrato (BHB), l'acetoacetato e l'acetone. A seguito dei numerosi effetti dei corpi chetonici sulla neurofisiologia, l'interesse nella comunità scientifica per la KD è cresciuto. Infatti, diversi studi, sia clinici che preclinici, hanno dimostrato che la KD è in grado di svolgere un ruolo prezioso nel trattamento di diverse patologie, tra cui epilessia, depressione, emicrania, Alzheimer e morbo di Parkinson (Pietrzak et al., 2022). Inoltre, studi clinici hanno indicato che la somministrazione di KD in bambini autistici riduce le aberrazioni comportamentali, migliorando le abilità cognitive e sociali (Evangelidou et al. 2003; Herbert and Buckley 2013, Żarnowska et al., 2018). In aggiunta, la KD è in grado di modulare il microbiota intestinale (Kaviyarasan et al., 2022), le cui alterazioni della composizione sono state riscontrate nei soggetti affetti da ASD (Vuong and Hsiao, 2017). Alla luce di quanto appena riportato, questo progetto di dottorato nasce con lo scopo di approfondire la comprensione dei meccanismi fisiopatologici dell'ASD e di fornire una solida base per lo sviluppo di interventi terapeutici mirati ed efficaci. In tale contesto, l'analisi dell'impatto della KD sulla fisiologia neuronale in un modello murino di autismo idiopatico, il ceppo di topo BTBR T+ Itpr3tf/J, è stata impiegata come approccio analitico per conseguire tale scopo. Comprendere come i corpi chetonici lavorano nel contesto dell'ASD può contribuire significativamente all'identificazione di percorsi comuni che potrebbero essere individuati per lo sviluppo di terapie più mirate che, possano portare benefici simili a quelli ottenuti con la KD, superandone però le limitazioni cruciali legate non solo ai suoi possibili effetti collaterali, ma anche alla poca tollerabilità se somministrata a lungo termine.

La strategia adottata per raggiungere il suddetto scopo è stata articolata in fasi distintive, ovvero parte I-A e I-B (in vivo) e parte II (in vitro):

- Parte I-A: Nella fase iniziale di questo studio sono stati indagati gli effetti della KD sui comportamenti tipici associati all' ASD, ovvero deficit sociali e cognitivi, comportamenti ripetitivi e ansia. In particolare, i risultati comportamentali sono stati correlati con l'espressione cerebrale e plasmatica di TNF- α , IL-1 β e IL-6, identificati come i principali mediatori dell'infiammazione e del percorso bidirezionale tra intestino e cervello (Zhao et al., 2021; Avolio et al., 2022). Inoltre, sono stati rilevati livelli di stress ossidativo (sostanze reattive all'acido tiobarbiturico, TBARS; superossido dismutasi, SOD) nella corteccia prefrontale (PFC) e nell'ippocampo (HIP). Contestualmente è stato valutato anche l'effetto della KD sul microbiota intestinale.

- Parte I-B: Questa sezione include uno studio condotto in collaborazione con il Professore Sergueï Fetissov presso l'Università di Rouen (Francia), che ha consentito di approfondire la relazione tra il microbiota intestinale e l'ASD. Nello specifico, è stata valutata la capacità di 5 diversi ceppi di *Lactobacillus* di influenzare l'interazione sociale, i livelli di ansia e l'attività motoria. In aggiunta è stata analizzata la capacità dei ceppi di *Lactobacillus* di modulare l'ossitocina plasmatica, saggiando al contempo la loro capacità di sintetizzare proteine con un'immunoreattività simile a questo peptide.
- Parte II-B: Successivamente, è stato condotto uno studio in vitro per investigare gli effetti della chetosi su cellula. In dettaglio, colture di neuroni fronto-corticali e ippocampali, ottenute da topi BTBR, sono state esposte a condizioni chetogeniche. Successivamente, sono state sottoposte ad analisi morfologica e di valutazione dei livelli proteici del Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), marcatore cruciale per la funzione neuronale.

In sintesi, è stato esaminato l'impatto della KD nell'autismo utilizzando un metodo olistico che ha integrato analisi comportamentali e valutazioni di aspetti correlati, tra cui infiammazione, stress ossidativo e microbiota intestinale. Inoltre, la collaborazione internazionale con l'Università di Rouen ha arricchito il nostro approccio, aggiungendo una dimensione significativa all'indagine, soprattutto nel contesto dell'asse intestino-cervello. L'impiego di tecniche in vitro ha ulteriormente approfondito la comprensione dell'autismo offrendo insights a livello cellulare e un'analisi dettagliata della risposta neuronale alla condizione di chetosi.

STATO DELL'ARTE

IL DISTURBO DELLO SPETTRO AUTISTICO (ASD)

Negli ultimi anni, c'è stato un passaggio significativo nel modo in cui l'autismo, termine ombrello di disturbo dello spettro autistico (ASD), viene riconosciuto e compreso. Da un disturbo raro e rigidamente definito, l'autismo è stato identificato come un gruppo eterogeneo di disturbi mentali ad esordio nell'età infantile, caratterizzato da deficit nelle interazioni sociali e nella comunicazione (Hirota e King, 2023). Prima dell'adozione del concetto di spettro, l'autismo era considerato come un insieme di disturbi separati, ognuno aventi criteri diagnostici specifici (manuale diagnostico dei disturbi mentali quarta edizione, DSM-IV). Tuttavia, questa classificazione non teneva conto della diversità e della varietà di manifestazioni di questa sindrome. Attualmente il termine comprende diverse condizioni come forme idiopatiche, tra cui autismo, sindrome di Asperger e disturbo pervasivo dello sviluppo non altrimenti specificato, e forme sindromiche quale la sindrome di Rett e dell'X fragile, nelle quali i sintomi autistici sono presenti in associazione ad una data condizione genetica e come parte di un quadro clinico più ampio. L'unificazione di queste condizioni precedentemente separate sotto la categoria di ASD è stata introdotta con il DSM-V che ha permesso così di riconoscere che le differenze individuali di questa sindrome esistono su un continuum.

1. CARATTERISTICHE CLINICHE

Nonostante i criteri diagnostici si siano evoluti nel corso dei decenni, l'ASD rimane un complesso disturbo dello sviluppo neurologico, caratterizzato da compromissioni nella sfera sociale e da comportamenti ristretti e ripetitivi che ne costituiscono i sintomi diagnostici (Kim et al., 2018). Questi sintomi che si manifestano in tenera età, solitamente entro i primi tre anni di vita, provocano gravi compromissioni in ambito sociale, professionale e funzionale (DSM-V):

- I deficit nella sfera sociale e comunicativa sono una caratteristica chiave dell' ASD. Questi deficit possono includere ritardi nel linguaggio, discorsi monotoni, inversione pronominale, scarsa comprensione o addirittura totale assenza di linguaggio verbale. Anche la comunicazione non verbale è spesso compromessa a seguito di difficoltà nell'utilizzo di espressioni facciali e gesti, oltre che assenza

di contatto visivo. Un'altra importante caratteristica delle persone con ASD è la difficoltà nella reciprocità socio-emotiva; i pazienti autistici sono meno inclini ad avviare una conversazione, mostrano scarso interesse nelle interazioni con i coetanei e in generale trovano difficile adattare il loro comportamento alle diverse situazioni sociali.

- I comportamenti ristretti e ripetitivi sono un'altra componente significativa dell'ASD. Questi comportamenti possono includere movimenti motori stereotipati (ad esempio, sbattere le mani o muovere le dita), l'uso ripetitivo di oggetti (come l'allineamento dei giocattoli) o il linguaggio ripetitivo (ecolalia). I comportamenti ristretti possono manifestarsi anche come resistenza al cambiamento o interessi fissati altamente restrittivi, che si distinguono per l'intensità o la focalizzazione. Inoltre, alcuni bambini con ASD possono presentare iper o iposensibilità a vari stimoli sensoriali mostrando una reazione estrema a suoni, luci o odori, oppure una ridotta reattività al dolore.

Data la natura a spettro dell'ASD, le manifestazioni comportamentali variano in base alle abilità linguistiche, alle capacità intellettive e all'età degli individui (Pandina et al., 2020). Sebbene siano stati condotti pochi studi sull'evoluzione della sindrome autistica nel corso della vita, si osserva una tendenza generale alla riduzione nel tempo dell'intensità dei sintomi principali con una stabilizzazione in età adulta (Siebes et al., 2018; Bal et al., 2019). Inoltre, poiché i sintomi dell'autismo possono variare per diversi motivi, tra cui lo sviluppo e la maturazione, l'adattamento e la compensazione, la variabilità individuale e il contesto specifico, è plausibile osservarne la comparsa di nuovi lungo tutto il corso della vita (Pandina et al., 2020).

Nel quadro clinico dell'autismo è comune la presenza di comorbidità psichiatriche e mediche che ne complicano ulteriormente la gestione (Bougeard et al., 2021). Più del 70% delle persone con autismo manifesta oltre ai sintomi diagnostici, condizioni mediche quali disturbi gastrointestinali, o psichiatriche come ansia, deficit cognitivi e depressione, in una percentuale maggiore rispetto alla popolazione generale (Fig.1.1; Bougeard et al., 2021; De Filippis, 2018). Le comorbidità che si manifestano durante l'infanzia tendono a persistere anche nell'adolescenza, mentre altre, come l'epilessia e la depressione, possono svilupparsi successivamente durante l'adolescenza o l'età adulta (Liu et al., 2022; Rai et al., 2018). In generale, più numerose sono le condizioni concomitanti, maggiore è la

disabilità dell'individuo. L'elevata frequenza di comorbidità potrebbe essere il risultato di varianti genetiche e fattori di rischio ambientali “condivisi”, ovvero, correlati sia al rischio di sviluppare l'ASD che altre condizioni (Hawks e Constantino, 2020; Khachadourian et al., 2023).

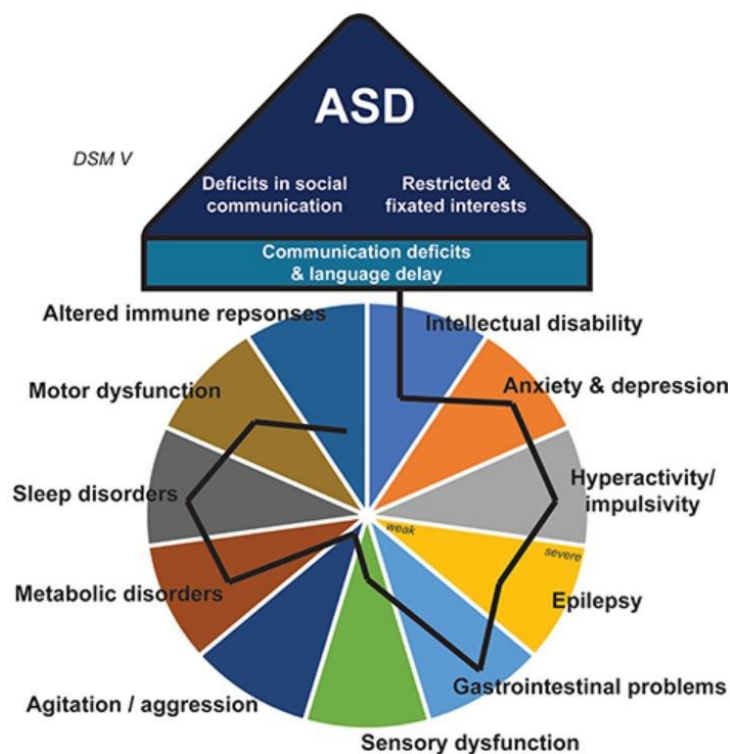


Fig. 1.1 Caratteristiche cliniche dell'autismo. Deficit nella comunicazione e nell'interazione sociale nonché comportamenti e interessi ristretti e ripetitivi costituiscono i criteri diagnostici dell'ASD. In aggiunta, comorbidità psichiatriche e mediche sono spesso presenti nei pazienti autistici, complicandone ulteriormente il quadro clinico (modificato da Sauer et al., 2021).

2. EPIDEMIOLOGIA

Determinare con precisione la prevalenza dell'ASD è una sfida complessa a causa di diversi fattori quali cambiamenti nei criteri diagnostici, diversità dei fenotipi della malattia e dell'eziologia e per la mancanza di una standardizzazione globale nella raccolta dei dati (Nevison et al., 2018). Nonostante queste limitazioni, sono stati compiuti sforzi

per stimare la prevalenza dell'ASD mediante studi epidemiologici che hanno così permesso di ottenere delle stime approssimative (Fig.1.2)

Secondo le stime riportate dal Centro di Controllo delle Malattie, la prevalenza dell'ASD è di circa 185 su 10.000 negli Stati Uniti, 152 su 10.000 in Canada, 161 su 10.000 in Giappone e 100 su 10.000 in Francia. L'Olanda e la Germania mostrano il più basso grado di prevalenza (Chiarotti e Veronesi, 2020), mentre in India, con una popolazione di circa 1,3 miliardi di persone, si stima che più di 2 milioni di bambini siano affetti da ASD (Chauhan et al., 2019). Per quanto riguarda l'Italia, le informazioni sulla prevalenza di questo disturbo sono limitate e si basano principalmente su registri di individui la cui diagnosi è avvenuta nell'età compresa tra 0 e 17 anni. La percentuale dei casi di autismo varia dallo 0,05% nella città di Catania, in Sicilia (Ferrante et al., 2015), allo 0,38% in Piemonte (dati ottenuti dal sistema informativo NPI.net, 2016) e allo 0,39% in Emilia-Romagna (dati dal sistema informativo ELEA, 2016). Tuttavia, è importante notare che questi dati rappresentano solo una parte della popolazione e potrebbero non riflettere completamente la prevalenza nell'intero paese, il che potrebbe spiegare i livelli più bassi registrati nella città di Catania. Ciononostante, la ricerca sull'autismo in Italia è in corso e gli sforzi sono rivolti a migliorare la raccolta dati e la comprensione della prevalenza di questo disturbo nel paese.

Variazioni nella prevalenza dell'autismo sono state registrate anche tra diverse etnie in tutto il mondo, presumibilmente per l'utilizzo di strumenti per lo screening e valutazione che potrebbero non mostrare le stesse proprietà psicometriche tra diversi gruppi sociodemografici (Donohue et al., 2019; Durkin et al., 2017). Nonostante le differenze osservate nell'identificazione dell'autismo tra minoranze e bambini di origine caucasica, con i primi che vengono identificati in età più avanzate (Valicenti-McDermott et al., 2012; Montiel-Nava et al., 2017), studi recenti indicano che queste disparità potrebbero essere in diminuzione (Pham et al., 2022). È importante, quindi, considerare questi fattori per garantire un'identificazione precoce e una corretta diagnosi dell'autismo in tutti i gruppi.

2.1 Differenze di genere nell'autismo: Implicazioni per la prevalenza e la diagnosi

Il sesso è un fattore importante che influenza la prevalenza dell'ASD. Studi epidemiologici hanno indicato che il rapporto tra maschi e femmine nei bambini con ASD è di quattro a uno, suggerendo una maggiore prevalenza di questo disturbo nei maschi

(Zhang et al., 2020). Nonostante non sia stato possibile chiarirne le cause, diverse teorie, come quella del "Cervello Estremamente Maschile" e dell'"Effetto Protettivo Femminile", sono state formulate per cercare di spiegare questa discrepanza. La "Teoria

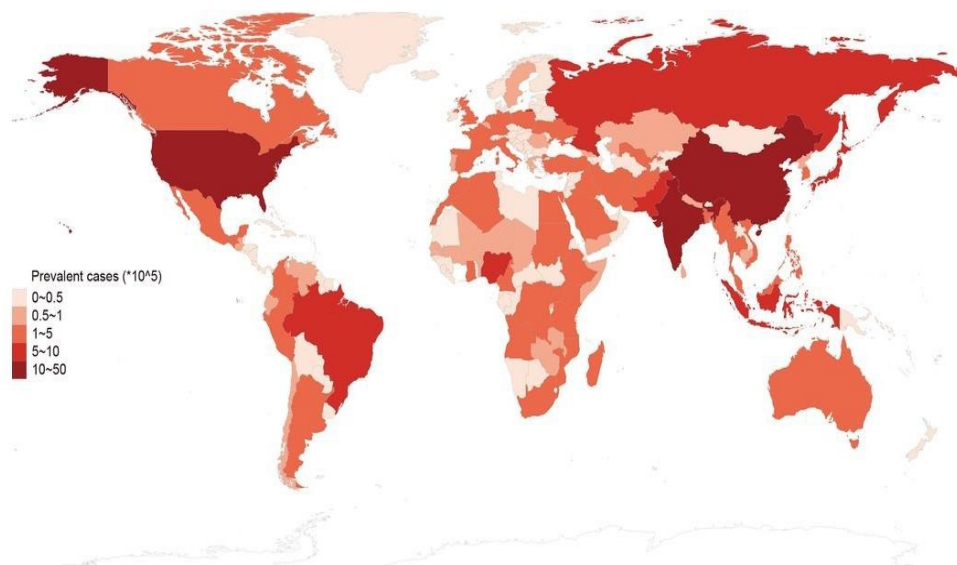


Fig.1.2 Incidenza globale dello spettro autistico nel 2019 (modificato da Li et al., 2022).

del Cervello Estremamente Maschile” suggerisce che le due dimensioni per comprendere le differenze di genere umane siano "empatizzare" e "sistematizzare" (Baron-Cohen, 2002). Secondo questa teoria, il cervello maschile è definito come quello in cui la sistematizzazione si adatta meglio rispetto all'empatia, mentre il cervello femminile ha un profilo cognitivo opposto. Utilizzando queste definizioni, l'ASD può essere considerato un'estremizzazione del normale profilo maschile (van Eijk e Zietsch, 2021). La teoria dell'"Effetto Protettivo Femminile" invece assume che il rischio per l'ASD sia quantitativo, che segua una certa distribuzione nella popolazione generale e che le femmine siano protette dagli effetti dell'autismo. Di fronte ai fattori di rischio, le femmine sembrano essere protette dallo sviluppo dell'autismo in quanto la soglia di carico che devono sopportare (ad esempio, varianti genetiche) o sperimentare (ad esempio, esposizioni ambientali) prima che l'autismo diventi evidente è maggiore rispetto ai maschi (Wigdor et al., 2022). Non è, però, da escludere che la prevalenza dell'autismo nelle femmine possa essere sottostimata a causa di differenze nel riconoscimento dei

sintomi. In generale, le ragazze affette da autismo mostrano meno comportamenti insoliti e sono meno propense a ricevere una diagnosi. Diversi studi basati su osservazioni cliniche hanno evidenziato che le ragazze e le donne autistiche dimostrano una maggiore competenza nelle interazioni sociali e manifestano attività ripetitive e stereotipate diverse rispetto ai ragazzi e agli uomini con ASD (Van Wijngaarden-Cremers et al., 2014; Kaat et al., 2021; Wood-Downie et al., 2021). Queste migliori capacità sociali e di comunicazione, che sono correlate a una caratteristica fenotipica femminile, potrebbero aiutare le donne ad adattarsi più facilmente alle situazioni sociali, mascherando alcuni dei sintomi “core” della sindrome autistica e conseguentemente portare a una diagnosi errata o tardiva e giustificare i rapporti di prevalenza simili riportati in alcuni studi (Harrop et al., 2015; Sutherland et al., 2017). Alla luce di queste informazioni ulteriori ricerche sono necessarie al fine di chiarire le possibili differenze di genere in termini di diagnosi e prevalenza nell' ASD.

3. EZIOLOGIA

Il neurosviluppo dei vertebrati è un processo straordinariamente complesso che comprende diverse fasi distinte e che richiede una precisa e coordinata regolazione di numerosi e specifici geni, la cui espressione è controllata da fattori di trascrizione spesso associati a complessi proteici (D'Mello, 2019). Le fasi chiave dello sviluppo cerebrale includono la produzione di neuroni, la loro migrazione, la morte programmata di una significativa quantità di neuroni, la formazione di assoni e dendriti, la sinaptogenesi, l'eliminazione e la stabilità selettiva delle sinapsi (con un ruolo centrale delle cellule microgliali), la formazione di astrociti e oligodendrociti, la mielinizzazione e l'angiogenesi (Fig. 1.3; Fleiss et al., 2024). La coordinazione di queste fasi dà origine a circuiti neuronali che mediano una vasta gamma di comportamenti estremamente complessi, i quali continuano a svilupparsi e a modellarsi durante il neurosviluppo infantile. L'alterazione della corretta regolazione di questi processi altamente coordinati, con conseguente modifica dei circuiti neuronali responsabili delle anomalie comportamentali che si riscontrano nell' ASD è alla base dell'eziologia di questa condizione (Damianidou et al., 2022). Ad oggi, non è stato ancora possibile identificare i circuiti chiave e chiarire i meccanismi che sottendono all'eziologia dell'ASD, nonostante molteplici fattori di rischio siano stati individuati e associati al suo sviluppo.

L'eziopatogenesi dell'ASD è complessa e poco chiara. Studi epidemiologici hanno evidenziato che questa patologia ha una forte componente genetica, che però, coerentemente con il fenotipo clinico, è altamente eterogenea in quanto ogni individuo affetto può avere un profilo genetico unico con diversi sottogruppi di geni candidati coinvolti (Havdahl et al., 2021; Oron et al., 2017). Nonostante i fattori genetici possano essere in gran parte responsabili dell'insorgenza dell'autismo non consentono di spiegare completamente tutti i casi, per cui, è probabile che specifici fattori ambientali possano anch'essi contribuire allo sviluppo di questa condizione (Karimi et al., 2017). I fattori ambientali potrebbero interagire con il patrimonio genetico di un individuo, sia scatenando che modulando l'espressione fenotipica dei fattori di rischio genetico attraverso meccanismi epigenetici o esercitando effetti additivi/sinergici, contribuendo così a creare uno spettro variabile di suscettibilità (Persico e Merelli, 2014).

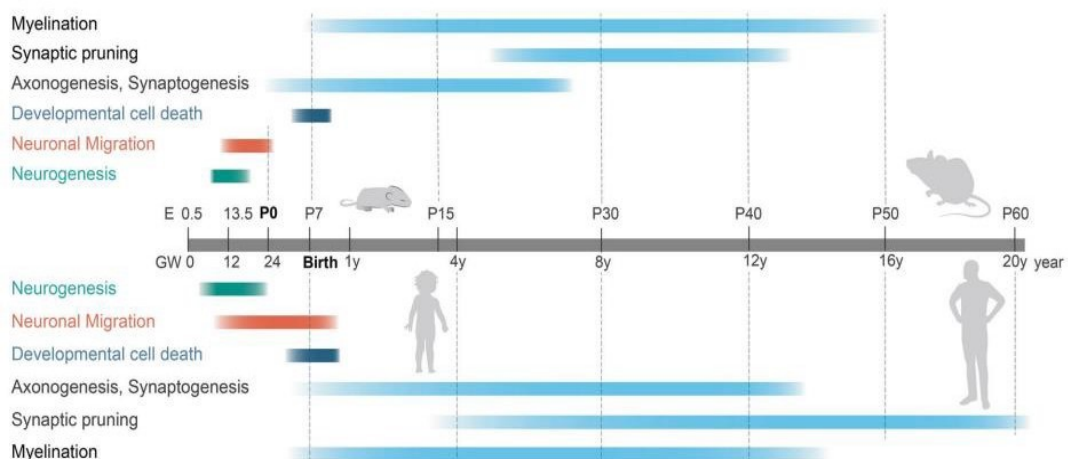


Fig.1.3 Fasi dei principali processi di sviluppo durante lo sviluppo cerebrale nei topi e negli esseri umani. L'immagine mostra la linea temporale (inizio approssimativo e durata) dei principali processi del neurosviluppo per ciascun modello (modificato da Khodosevich e Sellgren, 2023)

3.1 Fattori genetici

Il contributo genetico all'autismo è stato riconosciuto fin dagli anni '70, quando l'osservazione di due gemelli identici con la stessa condizione ha aperto la strada a una

nuova comprensione della patologia (Treffert, 1970). Studi successivi hanno ulteriormente indagato le basi genetiche dell'ASD, stabilendo che il suo tasso ereditabile è approssimativamente dell'80% nei gemelli omozigoti e del 40% nei gemelli dizigoti (Styles et al., 2020). Allo stesso modo, gli studi su famiglie mostrano un'elevata concordanza tra fratelli e parenti di primo grado, confermando l'ipotesi di un'alta ereditabilità dell'ASD (Yip et al., 2017).

La radice genetica dell'autismo si presenta come un intricato rebus, poiché le alterazioni genetiche e genomiche identificate finora mostrano un'elevata eterogeneità. Queste includono diverse categorie di aberrazioni, tra cui: anomalie citogenetiche, come aneuploidie cromosomiche o riarrangiamenti strutturali che possono essere individuate tramite cariotipo convenzionale (meno del 5%); mutazioni genetiche singole, non sindromiche, tra cui rare mutazioni geniche (variazioni a singolo nucleotide) e varianti genetiche comuni (polimorfismi a singolo nucleotide) che sono generalmente associabili a disturbi causati da un singolo gene e identificabili attraverso il sequenziamento (meno del 5%); variazioni del numero di copie e variazioni strutturali, entrambe solitamente legate a disturbi genomici, individuabili tramite analisi genomiche avanzate, come microarray e sequenziamento di nuova generazione (circa dal 10% al 35%); varianti genetiche/genomiche sindromiche che costituiscono circa il 10% dei casi (Yu e Wu, 2015).

Le aberrazioni genetiche identificate singolarmente non sono sufficienti a conferire un rischio significativo per l'autismo e diversi modelli sono stati proposti per comprendere come questa molteplicità di fattori genetici possa contribuire alla manifestazione di questa condizione (Klei et al., 2021):

- *Modello di eterogeneità*: suggerisce che l'ASD sia caratterizzato da una diversità di cause genetiche. Secondo questo modello, mutazioni gravi in una vasta gamma di geni possono essere sufficienti a causare il disturbo, indicando la presenza di molteplici vie genetiche che conducono all'autismo.
- *Modello infinitesimale*: sottolinea il ruolo delle varianti genetiche comuni nel contribuire all'ereditabilità dell'ASD. Questo modello suggerisce che tutti noi portiamo delle varianti genetiche comuni che, se presenti in determinate combinazioni o quantità, possono influenzare la suscettibilità all'autismo. Per cui, sebbene le variazioni genetiche comuni possano avere effetti modesti, la loro

diffusione nella popolazione potrebbe svolgere un ruolo importante nella manifestazione di questa condizione.

- *Modello ibrido*: suggerisce che le variazioni genetiche comuni e rare si combinino in qualche modo, forse in maniera additiva, per conferire suscettibilità all'autismo. Ciò implica che le variazioni genetiche comuni e rare potrebbero interagire tra loro per influenzare la manifestazione del disturbo. Nella popolazione, una mutazione comune potrebbe avere un ruolo dominante nella suscettibilità generale all' ASD, mentre una mutazione rara potrebbe avere un impatto maggiore sulla suscettibilità di un individuo che la porta.

3.1.1 Geni candidati

Diversi studi condotti su grandi gruppi di pazienti hanno consentito di identificare geni candidati che mostrano mutazioni più frequenti nei soggetti affetti da autismo rispetto ai gruppi di controllo (Mpoulimari et al., 2022). Attualmente, la Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI; <https://gene.sfari.org/>) ha segnalato 888 geni candidati per l'ASD. Tra questi, 57 geni sono associati a forme sindromiche di autismo, mentre i restanti sono classificati in diverse categorie in base al grado di associazione con la condizione. È interessante notare che molti dei geni fortemente associati alle forme di autismo idiopatico e sindromico codificano per proteine sinaptiche (Fig.1.4 Trobiano et al., 2020). Questo potrebbe indicare l'esistenza di una via di segnalazione sinaptica comune che risulta alterata in questa condizione, suggerendo una possibile sinaptopatia alla base dell'eziologia. La grande eterogeneità dei geni candidati ne contraddice però il modello di disfunzione sinaptica e rappresenta una sfida per identificare una via eziologica condivisa.

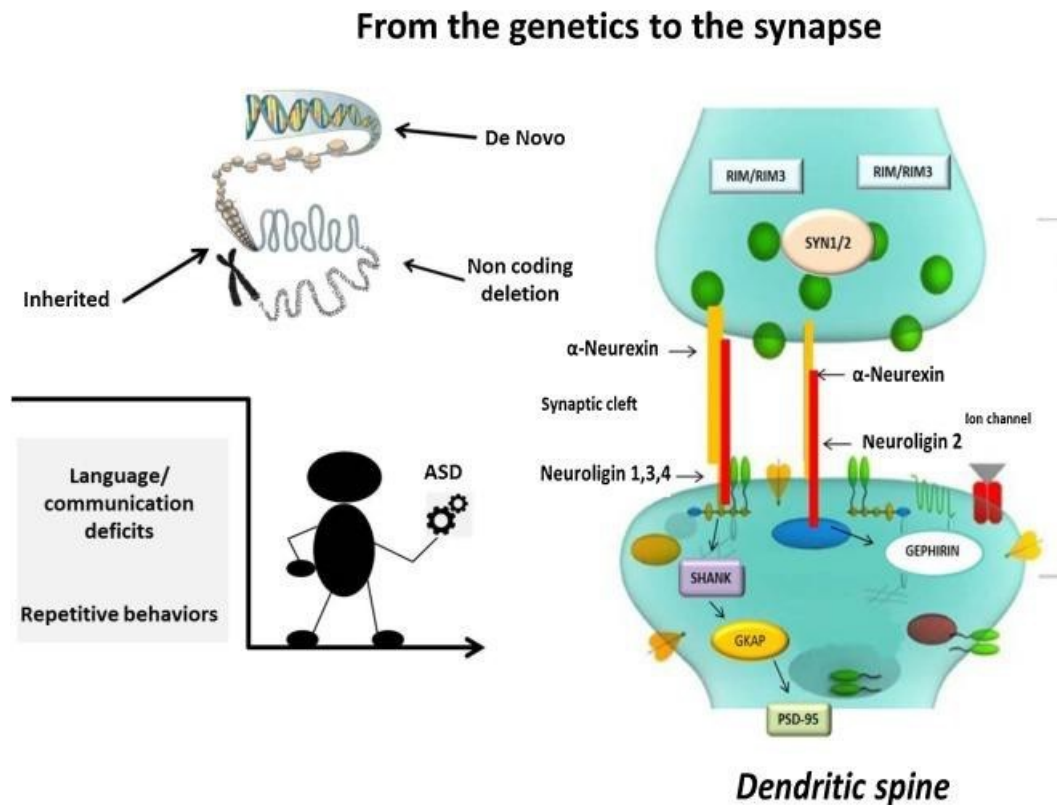


Fig.1.4 Sinaptopatia nell'autismo. Sono state riportate diverse mutazioni de novo ed ereditate nei geni che codificano proteine coinvolte nella funzione sinaptica appartenenti alla via di segnalazione NLGN-NRXN, come le proteine NLGN, NRXN e SHANK (modificato da Trobiani et al., 2020).

3.1.1.1 Molecole di Adesione Cellulare Sinaptiche

Le sinapsi chimiche sono giunzioni intercellulari asimmetriche che svolgono un ruolo cruciale nella trasmissione sinaptica. Queste giunzioni sono organizzate da molecole di adesione cellulare trans-sinaptiche che fungono da ponti attraverso la fessura sinaptica facilitando il riconoscimento e i processi di segnalazione tra cellule attraverso di essa. Questi processi sono fondamentali per stabilire e modulare la plasticità sinaptica (Missler et al., 2012). Le mutazioni nei geni che codificano per queste molecole sono state collegate all'insorgenza dell'ASD, emergendo come geni candidati di rilievo.

Le Neuroligine (NLGNs) sono proteine localizzate sulla membrana postsinaptica delle sinapsi glutammatergiche e GABAergiche, giocando un ruolo attivo nella loro formazione. Durante lo sviluppo cerebrale, i geni NLGN1-4, seguono un percorso graduale di espressione, aumentando dall'embrione ai primi giorni dopo la nascita prima di stabilizzarsi attorno alla terza settimana (Jamain et al., 2008). Alterazioni di questi geni

durante questa fase critica potrebbero essere determinanti nel contribuire allo sviluppo di condizioni patologiche. Inoltre, mutazioni specifiche quali quelle missenso nelle NLGN3,4 sono state identificate in pazienti affetti da autismo (Asami et al., 2017). Oltre a ciò, la ricerca su modelli animali, quali il topo portatore della mutazione umana R451C (NLGN3^{R451C}), ha evidenziato alterazioni comportamentali e vocalizzazioni simili a quelle osservate nei pazienti con autismo, fornendo ulteriori conferme del legame tra le proteine NLGN e l'insorgenza dell'autismo (Jaramillo et al., 2014).

Analogamente, le Neurexine (NRXNs) rappresentano un altro gruppo di molecole chiave nelle sinapsi, le cui mutazioni sono state identificate in pazienti affetti da ASD (Tromp et al., 2020). Ricerche su modelli animali sono state condotte per valutare l'effetto funzionale di alcuni di questi geni sul comportamento. In particolare, uno studio recente ha rivelato che la perdita completa di *Nrxn1 α* comporta un aumento dell'aggressività nei maschi, una riduzione dei comportamenti sociali nelle femmine e alterazioni del ritmo circadiano in entrambi i sessi. Mentre, la riduzione parziale influisce sulla preferenza per la novità sociale e migliora le abilità motorie in entrambi i sessi (Xu et al., 2023). Similmente, gli studi sperimentali sul gene NRXN2 hanno dimostrato che i topi privi della proteina codificata da questo gene (*Nrxn2 α*) sviluppano deficit nell'interazione sociale, ansia e alterazioni nella memoria di riconoscimento (Dachtler et al., 2014). Tutti questi risultati sottolineano l'importanza del giusto dosaggio genico delle NRXNs nella regolazione delle funzioni sociali, cognitive e motorie e confermano l'associazione tra le variazioni genetiche delle NRXNs e l'ASD.

Infine, il gruppo delle molecole Contactine (CNTN) ha un impatto rilevante sulla formazione e sulla plasticità delle reti neuronali. L'espressione predominante di queste molecole nel cervello le rende fondamentali per lo sviluppo e il funzionamento del sistema nervoso. Studi recenti hanno messo in luce il coinvolgimento di specifici geni CNTN, come contactina-4,5,6 (CNTN4-6) nei disturbi neurosviluppo, in particolare nel ASD (Oguro-Ando et al., 2017).

3.1.1.2 Proteine scaffold

Mutazioni nei geni che codificano per proteine strutturali possono essere responsabili dello sviluppo del fenotipo autistico. Le proteine scaffold svolgono un ruolo essenziale come proteine impalcatura, costituendo lo scheletro della densità postsinaptica. Queste

proteine facilitano le interazioni proteina-proteina, fondamentali per il reclutamento e l'aggregazione di componenti bersaglio nella densità postsinaptica. Esistono diverse tipologie di proteine scaffold e, fra queste, le Shank emergono come importanti candidate per i disturbi del neurosviluppo (Alò et al., 2021).

Nel corso dell'ultimo decennio, le proteine Shank hanno catturato l'attenzione per il loro coinvolgimento nell'autismo. Nel Human Gene Mutation Database (HGMD), sono segnalate oltre cento mutazioni responsabili di malattie all'interno di questa famiglia di proteine.

In particolare, Shank3 è un membro cruciale della famiglia Shank che interagendo con le proteine codificate dai geni NLGNs forma complessi proteici che giocano un ruolo essenziale nella generazione di assoni e nella plasticità sinaptica. La proteina Shank3 è in grado di stabilizzare i recettori del glutammato (Glu), tra cui i recettori metabotropici mGlu, NMDAR e AMPAR, sulla membrana postsinaptica (Moutin et al., 2021). Le variazioni nel gene SHANK3 influenzano processi cruciali come la formazione delle sinapsi e la loro plasticità e rappresentano le prime e meglio caratterizzate mutazioni legate all' ASD (Jiang e Ehlers, 2013). Sperimentazioni su topi knockout per questo gene hanno evidenziato la presenza di comportamenti simil-autistici quali compromissioni nell'interazione sociale, comportamenti ripetitivi, riduzione delle vocalizzazioni ultrasoniche e deficit nella memoria di riconoscimento (Quin et al., 2021; Jiang e Ehlers, 2013).

Risultati interessanti sono stati ottenuti anche nei modelli knockout per Shank2. In particolare, in topi femmine adulte prive della proteina Shank2, è stato osservato un aumento del comportamento di "grooming", ovvero la pulizia del proprio corpo, mentre il comportamento di "scavo", ossia l'attività di scavare o muovere il substrato circostante, è risultato notevolmente ridotto. Al contrario, nei topi maschi adulti con la stessa mutazione di Shank2, il comportamento di "grooming" non ha subito alterazioni significative, ma il comportamento di "scavo" è stato notevolmente ridotto (Vicidomini et al., 2016; Barth e Bishop, 2014).

Una significativa riduzione dei comportamenti ripetitivi di scavo e dell'interazione sociale reciproca, insieme a un miglioramento nell'apprendimento e nella memoria spaziale, è stata riscontrata anche nei topi Shank1+/- (Silverman et al., 2011). D'altra parte, una mutazione frequente di Shank1, associata all' ASD nei topi (Shank1 R882H-KI), ha portato allo sviluppo dei sintomi chiave dell'autismo, ma non ha causato la comparsa di comorbilità psichiatriche tipiche di questa sindrome (Qin et al., 2022).

3.1.1.3 Canali ionici

I canali ionici possono assumere ruoli di fondamentale importanza nella modulazione delle risposte sensoriali e cognitive. Le disfunzioni di tali canali potrebbero essere strettamente connesse a disturbi del neurosviluppo come l' ASD (da Silva et al., 2022). Le mutazioni nei geni implicati nella segnalazione del calcio (Ca^{2+}) sembrano essere fortemente associate al rischio di insorgenza dell'autismo. Tra le varianti identificate nell' ASD sono di particolare rilievo quelle situate nei loci che codificano le subunità alfa dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, come CACNA1I, CACNA1E, CACNA1C, CACNA1D, CACNA1G e CACNA1H fondamentali per la regolazione di questo ione nei neuroni (Nguyen et al., 2018). Inoltre, in modelli sindromici di autismo, quali la sindrome dell'X Fragile e la sclerosi tuberosa TSC1,2 è stato osservato un deficit nel rilascio di Ca^{2+} attraverso i recettori dell'inositolo trifosfato (IP3R; Schmunk et al., 2015). In aggiunta, sono state individuate varianti nei geni dei canali del Na^+ voltaggio-dipendenti, come SCN1A, SCN2A e SCN8A che interagiscono funzionalmente con i canali del Ca^{2+} nei meccanismi di trasmissione neuronale (Gandal et al., 2018). Per cui, le alterazioni nella segnalazione del Ca^{2+} potrebbero costituire un punto di convergenza cruciale nella patogenesi dell'ASD (Gandal et al., 2018; Wang et al., 2021).

3.1.1.4 Geni candidati: oltre le sinapsi

La ricerca sui geni candidati è un'indagine cruciale per comprendere le radici molecolari dell'autismo e nonostante una grande attenzione sia stata dedicata agli aspetti sinaptici, è evidente che i potenziali geni coinvolti nell'autismo vadano oltre questa specifica categoria.

Un'importante considerazione riguarda il ruolo cruciale del ritmo sonno-veglia nello sviluppo cerebrale (Lorsung et al., 2021). Si è osservato che nel 44% - 83% dei pazienti con ASD siano presenti disturbi del sonno, percentuali notevolmente più elevate rispetto a quelle riscontrate nei bambini neurotipici (~ 10%; Schwichtenberg et al., 2022). L'attuazione del ciclo sonno-veglia avviene attraverso un meccanismo che è regolato da diversi geni e alcuni di questi, quali Basic Helix-Loop-Helix ARNT Like 1-2 (ARNTL-L2), Basic Helix-Loop-Helix Family Member E40 (BHLHE40), Cryptochrome 2 (CRY2), Casein kinase I epsilon (CSNK1E), D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor (DBP), Melatonin receptor 1A-B (MTNR1A-MTNR1B), nuclear receptor

subfamily 1 group D member 1 (NR1D1) e Period Circadian Regulator 2-3 (PER2-PER3), sono localizzati in loci associati a variazioni del numero di copie nei pazienti con ASD (Bragin et al., 2014). Inoltre, in pazienti autistici sono state riscontrate mutazioni in specifici geni implicati nel ritmo circadiano come PER1, NPAS2, MTNR1A e MTNR1B (Yang et al., 2016). Alla luce di ciò, è plausibile ipotizzare che alterazioni nei geni collegati ai ritmi sonno-veglia possano contribuire all'insorgenza di deficit sociali e comorbidità che comunemente si riscontrano nell'autismo (Dell'Osso et al., 2022).

Altri geni candidati sono stati identificati nelle linee cellulari linfoide di individui autistici, come in quello che codifica per l'arginino-succinato sintetasi, una molecola segnalatrice cruciale nel cervello coinvolta nel controllo della produzione di ossido nitrico e dell'Integrin Subunit Alpha 2b (ITGA2B) codificante per la glicoproteina $\alpha II\beta$, con possibili effetti sulla morfologia cellulare (Hu et al., 2006; Kuwano et al., 2011). Altro importante gene candidato è il RELN che codifica per una serina proteasi glicosilata, proteina coinvolta nella maturazione e nello sviluppo del sistema nervoso centrale, nella neurotrasmissione e nella migrazione delle cellule neurali e gliali durante l'embriogenesi (Vignoli et al., 2015). Le mutazioni di RELN sono quelle maggiormente studiate e correlate alle anomalie anatomiche presenti nell' ASD e si riscontrano in circa l'1% dei pazienti affetti da tale sindrome (Vignoli et al., 2015; Wang et al., 2014). Infine, sono state individuate mutazioni nei geni forkhead box P2 (FOXP2) e CNTNAP2, associati a disturbi del linguaggio e della comunicazione, così come in pazienti autistici con disabilità intellettive sono state identificate mutazioni in geni coinvolti nei processi di sintesi proteica, metabolismo energetico e amminoacidico, come CACNA1A, ALG9 e PALM2 (Toma et al., 2013; Chen et al., 2022).

I geni che sono stati citati finora rappresentano soltanto una parte dei numerosi geni candidati implicati nell'autismo. Pertanto, la complessità di questa sindrome si riflette nell'eterogeneità dei geni coinvolti, spaziando su molteplici vie molecolari che vanno oltre le sinapsi.

3.1.2 Polimorfismi a singolo nucleotide

I Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNP) hanno acquisito notevole interesse nell'ambito delle ricerche sull'autismo. Questi polimorfismi rappresentano variazioni genetiche da

mutazioni puntiformi che producono differenti alleli contenenti basi alternative in una posizione specifica del nucleotide all'interno di un dato locus.

Attraverso progetti di sequenziamento su larga scala, è stato osservato che gli individui colpiti da ASD presentano una maggiore incidenza di SNP rari, sia di origine ereditaria che de novo, rispetto ai loro fratelli neurotipici (Yuen et al., 2017). Inoltre, è stato calcolato che la proporzione dell'incidenza della sindrome autistica spiegata da questi SNP varia dal 17% al 60% (Gaugler et al., 2014).

Gli SNP che sono associati all' ASD possono trovarsi sia nelle regioni codificanti che non codificanti del genoma (van Arensbergen et al., 2019). Le varianti genetiche nelle regioni non codificanti, come promotori o elementi regolatori, possono modulare l'espressione genica, portando a possibili alterazioni nello sviluppo cerebrale e nella funzione neuronale. Alcuni SNP possono anche influenzare l'interazione tra geni o la struttura tridimensionale del genoma, contribuendo così alla complessità eziologica dell'autismo (Schmitt et al., 2019). Questi SNP possono modulare ad esempio geni quali Dual specificity tyrosine phosphorylation Regulated Kinase 1A (YRK1A), Pogo Transposable Element Derived With ZNF Domain (POGZ), Chromodomain helicase DNA binding protein 8 (CHD8), Netrin G1 (NTNG1), Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B (GRIN2B), Katanin Catalytic Subunit A1 Like 2 (KATNAL2), T-box brain transcription factor 1 (TBR1), Phosphatase and tensin homolog (PTEN), TBL1X/Y Related 1 (TBL1XR1), Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Gamma3 (GABRG3) e RELN che sono coinvolti nello sviluppo cerebrale e nelle sinapsi ma anche altri implicati in processi neurobiologici rilevanti quali vie immunitarie, metabolismo degli acidi grassi e biogenesi dei ribosomi (Iossifov et al., 2012; Ali et al., 2022; Golovina et al., 2021).

Al fine di identificare cause genetiche comuni associate ai diversi sottotipi dell'ASD, gli studiosi hanno individuato regioni del DNA (loci) che sono collegate in modo significativo all'emergere di sintomi o caratteristiche cliniche specifiche. Ad esempio, SNP localizzati nella regione 3p12.3 del DNA sono stati associati a un maggiore rischio di sviluppare ritardo nel linguaggio (St Pourcain et al., 2014), mentre SNP nel locus 3q29, come rs789859, sono spesso riscontrati in individui ASD con difficoltà di apprendimento (Baron-Cohen et al., 2015).

3.1.3 Variazioni del numero di copie

Le Variazioni del Numero di Copie (CNV) sono alterazioni strutturali sub-microscopiche all'interno dei cromosomi, che includono duplicazioni, delezioni, traslocazioni e inversioni di segmenti di DNA che possono estendersi per molte migliaia di basi (Marshall et al., 2008). Negli ultimi anni, ricerche approfondite hanno rivelato un'interessante connessione tra le CNV e l'autismo, poiché le persone autistiche mostrano una maggiore incidenza di queste varianti genetiche rare. È stato, inoltre, notato che la probabilità di sviluppare l'ASD è significativamente più alta in presenza di specifiche CNV (Manoli e State, 2021).

Diversi studi hanno dimostrato che le anomalie nello sviluppo neurologico possono essere strettamente correlate a CNV di specifici geni, quali NLGN3, NLGN4X, SHANK3, Astrotactin 2 (ASTN2), Patched Domain Containing 1 (PTCHD1), DEAD-Box Helicase 53 (DDX53), NRX1N, CNTN4, CNTNAP2, Patched Domain Containing 1 (PTCHD1), NLGN1 e SHANK1 (Liu e Takumi, 2014; Woodbury-Smith e Scherer, 2018; Pinto et al., 2010).

Nelle anomalie autosomiche associate all'autismo, il cromosoma 15 emerge come quello più frequentemente coinvolto, con particolare attenzione alla duplicazione di 15q11-q13, che rappresenta la variazione più comunemente descritta (Urraca et al., 2013). Le duplicazioni di 15q11-q13, nota come sindrome di Dup15q, si riscontrano in circa l'1-3% di tutti i casi di ASD e comprende almeno 30 geni, di cui diversi sono stati associati all'ASD e ad altre anomalie, tra cui disturbi neurocomportamentali, deficit cognitivi, ipotonia, ritardo del linguaggio e crisi epilettiche (Urraca et al., 2013). In particolare, geni come GABRA5 e GABRB3 (recettori GABA), UBE3A e HERC2 (componenti del complesso proteasoma) e SNRPN (peptide ribonucleoproteico N), insieme a CYFIP1 (la proteina interagente con FMRP), sono implicati in funzioni cerebrali essenziali e potrebbero avere un ruolo cruciale nello sviluppo dei sintomi dell'autismo.

Una delle prime CNV associate all'ASD è stata individuata sul locus 16p11.2, particolarmente importante in quanto sede di geni che svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo del sistema nervoso (Marshall et al., 2008; Manoli e State, 2021). Le perdite nei geni candidati nel locus 16p11.2, tra cui Aldolasi A (ALDOA), Double C2 Domain Alpha (DOC2A), HIRA Interacting Protein 3 (HIRIP3), Mitogen-Activated Protein Kinase 3 (MAPK3), MYC Associated Zinc Finger Protein (MAZ), Protein Phosphatase 4 Catalytic Subunit (PPP4C), Seizure Related 6 Homolog Like 2 (SEZ6L2) e TAO Kinase 2

(TAOK2), sembrano contribuire al fenotipo dell'autismo. D'altra parte, le duplicazioni della stessa regione portano a diversi fenotipi, come malformazioni cerebrali, schizofrenia o disturbi da deficit di attenzione e iperattività (ADHD), suggerendo che variazioni genetiche in questo locus possono influenzare l'ASD e le condizioni che spesso si verificano insieme a questo.

Altri loci di rischio associati all'autismo sono 1q21.1, 3q29, 7q11.23 e 22q11.2, nei quali è stato osservato che le piccole mutazioni de novo si sovrappongono ad altre varianti genetiche associate all'insorgenza dell'ASD (Yoon et al., 2021; Biamino et al., 2016; Cupaioli et al., 2021; Clements et al., 2017).

3.2 Fattori ambientali

La ricerca su famiglie è fondamentale per valutare sia l'influenza dei fattori genetici, che quella dei fattori ambientali, sul rischio di sviluppare disturbi del neurosviluppo quali l'ASD. Studi iniziali condotti su gemelli hanno riportato elevati livelli di ereditabilità suggerendo che un ruolo centrale nell'insorgenza dell'autismo era dovuto prevalentemente a fattori genetici (Ritvo et al., 1985). Successivamente è stato però dimostrato che anche i fattori ambientali assumono un ruolo di rilievo nello sviluppo dell'ASD. Uno studio più recente, ad esempio, ha indicato che il 37% del rischio di sviluppare l'ASD è attribuibile a fattori ereditari, mentre il 55% è legato a fattori ambientali (Hallmayer et al., 2011). Questi risultati sono stati ulteriormente confermati in uno studio su larga scala che ha coinvolto oltre due milioni di fratelli, compresi sia gemelli dizigoti che monozigoti, indicando che il 50% del rischio di sviluppare l'ASD è attribuibile a fattori ereditari, mentre il restante 50% è dovuto a fattori ambientali (Sandin et al., 2014). Inoltre, la presenza di sottotipi autistici diversi in alcuni gemelli monozigoti ha suggerito che i fattori ambientali non solo contribuiscono alla suscettibilità di questa sindrome, ma influenzano anche l'espressione delle caratteristiche correlate a questa condizione (Sandin et al., 2017). Per cui fattori genetici e ambientali svolgono entrambi un ruolo significativo nell'insorgenza della sindrome autistica.

I fattori di rischio ambientale dell'ASD non si limitano a sostanze chimiche e farmaci, ma includono l'età parentale, gli steroidi sessuali, la nutrizione, nonché le condizioni psico-fisiche materne che agendo in una fase sensibile del neurosviluppo determinano alterazioni tali da indurre anomalie comportamentali e varianti cliniche tipiche di questa

sindrome (Bölte et al., 2019). Inoltre, vista l'importanza, anche per i fattori ambientali sarebbe opportuno creare un database simile a quello genetico SFARI per consentirne la catalogazione e la consultazione, fornendo così uno strumento prezioso per la ricerca scientifica, la prevenzione e la gestione di questa complessa sindrome.

3.2.1. Età parentale

Numerose evidenze dimostrano l'associazione tra età avanzata dei genitori al momento del concepimento e disturbi neuropsichiatrici nella prole (Janecka et al., 2017). Un'età maggiore o uguale a 35 anni in entrambi i genitori, al momento della nascita, è stata correlata con un aumento del rischio di autismo (Al-Mamari et al., 2021). Inoltre, quando entrambi i genitori hanno un'età avanzata, l'effetto dell'età sulla probabilità di avere una prole autistica è più forte (Sandin et al., 2016). Quest'associazione tra età avanzata e autismo potrebbe essere dovuta al fatto che nei padri anziani i tassi di mutazione sono più elevati (Taylor et al., 2019). Nelle madri, invece, si è ipotizzato che gli effetti siano legati non solo a modificazioni genetiche e cromosomiche, ma anche a condizioni di salute croniche e a un ambiente uterino meno favorevole che può portare a complicazioni ostetriche e a esiti avversi alla nascita (Modabbernia et al., 2017).

3.2.2 Influenza degli steroidi sessuali

L'esposizione fetale agli steroidi sessuali rappresenta un potenziale fattore di rischio per l'autismo. Uno studio sulle differenze neuroanatomiche tra cervelli autistici e neurotipici ha rivelato che le femmine autistiche hanno una struttura atipica in regioni che sostanzialmente si sovrappongono a quelle sessualmente dimorfiche dei controlli neurotipici. Ciò suggerisce che l'autismo colpisce il cervello femminile nelle regioni legate alla differenziazione sessuale che è, a sua volta, regolata dagli ormoni steroidei sessuali in epoca prenatale (Lai et al., 2013). Anche il testosterone sembra influenzare lo sviluppo cerebrale, durante la fase di differenziazione sessuale prenatale, nei maschi e a supporto di ciò è emerso che i campioni di liquido amniotico prelevati da pazienti autistici presentano livelli più alti di steroidi sessuali e cortisolo rispetto a controlli con sviluppo tipico (Baron-Cohen et al., 2015). Altre prove dell'influenza degli ormoni sessuali nell'ASD derivano dall'osservazione di livelli ridotti di recettori beta, aromatasi e co-attivatori

degli estrogeni in cervelli post-mortem (Crider et al., 2014; Baron-Cohen et al., 2020). Infine, vari SNP presenti nei geni responsabili della sintesi e del trasporto degli steroidi sessuali sono stati associati ai tratti fenotipici dell'autismo (Tsompanidis et al., 2023).

3.2.3 Impatto dello stato fisico e mentale materno

Le condizioni fisiche materne sono considerate importanti fattori di rischio prenatali nell'ASD in quanto in grado di alterare il normale neurosviluppo. Per esempio, complicanze quali sanguinamento materno durante la gravidanza, il diabete, l'ipertensione e altri disturbi metabolici come l'obesità, possono causare una condizione di ipossia embrionale che può portare ad alterazioni del normale sviluppo cerebrale a seguito di cambiamenti nella mielinizzazione e a deficit di neuroni in aree cerebrali coinvolte in attività sociali e cognitive (Bolte et al., 2019; Orzeł et al., 2023). Anche le infezioni virali nel primo trimestre di gravidanza, quali rosolia, morbillo, parotite, varicella, influenza, herpes e citomegalovirus, nonché infezioni batteriche nel secondo trimestre, si associano ad un forte rischio di autismo nella prole (Kaminski et al., 2023). Tale relazione di per sé non è associata alla presenza di virus e batteri ma ad un'anomala attivazione immunitaria materna con conseguente produzione di elevati livelli di citochine pro-infiammatorie quali IL-6 e TNF- α . Le citochine materne possono attraversare la barriera placentare ed entrare nella circolazione fetale e/o attivare le cellule immunitarie con conseguente aumento della produzione di citochine nel feto. In seguito all'attivazione della microglia, si avvia una cascata neuro-infiammatoria che, a sua volta, porta a disfunzione mitocondriale e a stress ossidativo, causando alterazioni nei normali processi dello sviluppo cerebrale (Fig.1.5; Zawadzka et al., 2021).

Lo stato mentale materno, analogamente a quello fisico, è in grado di incidere profondamente sul neurosviluppo fetale. Ad esempio, schizofrenia, depressione, ansia e disturbi della personalità sono associati a un aumento del rischio di autismo nella prole (Xie et al., 2019). Allo stesso modo, uno stress notevole e di lunga durata durante la gravidanza può esporre il feto a livelli elevati di cortisolo. Il cortisolo interrompe il normale funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene della madre e aumenta la produzione di ormoni surrenali, come il cortisolo stesso. Questi ormoni possono attraversare la placenta che diventa più permeabile, a causa dello stress stesso, e influenzare così lo sviluppo fetale. Questa influenza può avere un impatto significativo

sulla programmazione dello sviluppo fetale e aumentare il rischio di diverse disabilità fisiche e mentali, tra cui l'autismo (Andreasen et al., 2023).

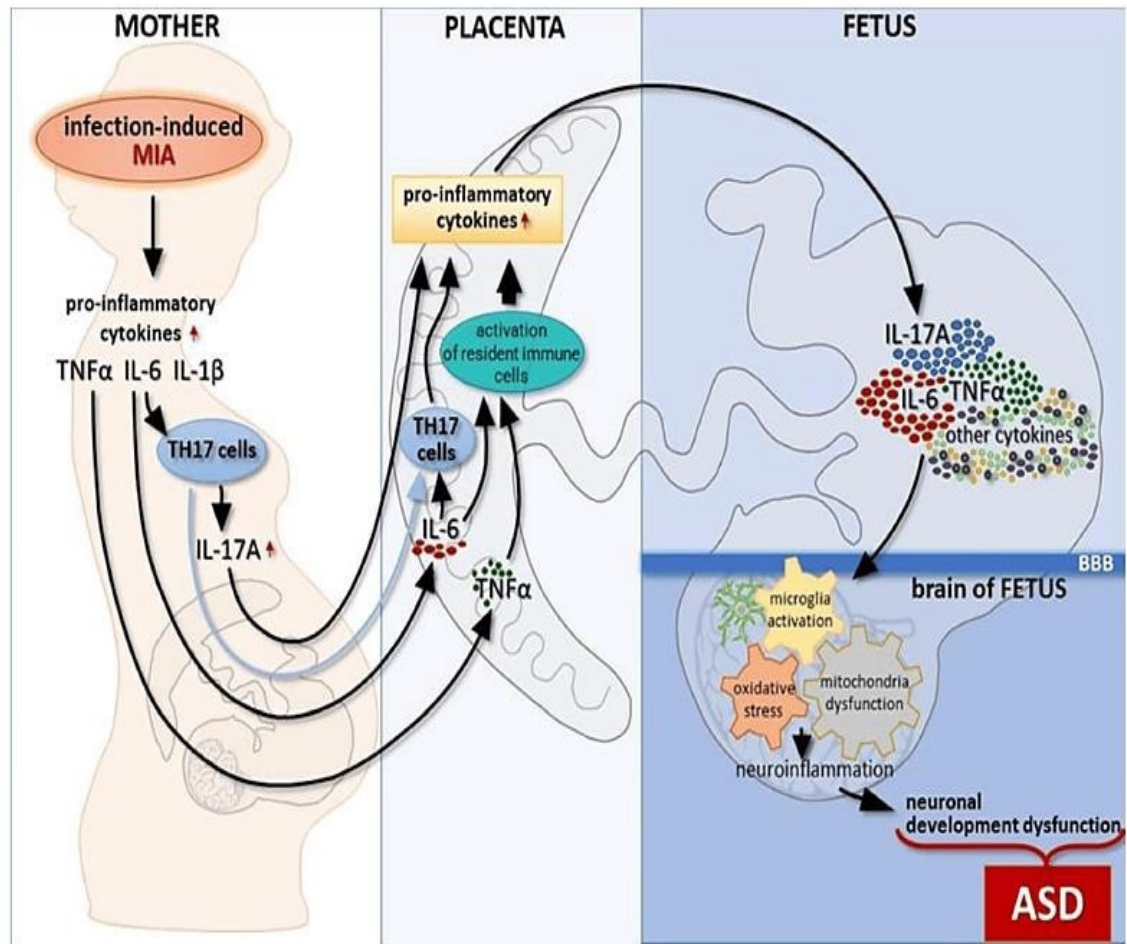


Fig.1.5 Cambiamenti immunologici nella placenta e nel cervello fetale in risposta all'infiammazione sistemica durante la gravidanza. Le citochine materne possono attraversare la barriera placentare ed entrare nella circolazione fetale e/o attivare le cellule immunitarie fetali con conseguente aumento della produzione di citochine. Quindi, le citochine proinfiammatorie attraversano la barriera ematoencefalica e avviano una cascata neuroinfiammatoria che alterano il normale neurosviluppo (modificato da Zawadzka et al., 2021).

3.2.4 Stato nutrizionale

Lo stato nutrizionale materno influisce in modo significativo sulla traiettoria dello sviluppo fetale in quanto responsabile in gran parte dei nutrienti disponibili per sostenere i tessuti del feto e della placenta. La carenza alimentare o l'assunzione di determinati allergeni in associazione a fattori genetici, biochimici o reazioni immunologiche possono

essere trasmessi dalla madre al feto e provocare in quest'ultimo effetti avversi (Jain et al., 2022). È stato stimato che carenze nutrizionali di minerali e vitamine come quella di zinco, acido folico (vitamina B9) e colecalciferolo (vitamina D), siano potenzialmente associati al rischio di autismo.

3.2.4.1 Zinco

Lo zinco (Zn) è il secondo elemento metallico in traccia più abbondante nel corpo umano ed è essenziale per la regolazione del sistema immunitario, dell'apoptosi, della proliferazione e della differenziazione cellulare (Li et al., 2019; Yang et al., 2020; Kim e Lee; 2021). La biodisponibilità dello zinco può essere influenzata da diversi fattori come farmaci, integratori e altri componenti alimentari. Ad esempio, in una dieta mista occidentale, la biodisponibilità dello zinco è di circa il 20–30% che però può essere ridotta a seguito di elevati livelli di fitati come inositolo esafosfati e pentafosfati e dall'assunzione di integratori a base di Ca^{2+} , Fe^{2+} e acido folico, comunemente prescritti e somministrati durante la gravidanza e a seguito di infezioni, stress, abuso di sostanze alcoliche e diabete (Hill-Yardin et al., 2017; Maares e Haase, 2020). Livelli ridotti di Zn sono stati rinvenuti sia nei capelli che nel siero di bambini autistici (Faber et al., 2009). Studi su roditori hanno evidenziato anche che la carenza prenatale di questo oligoelemento induce comportamenti e sintomi simili a quelli osservati nell' ASD, tra cui disturbi gastrointestinali e processi infiammatori (Fig.1.6; Hill-Yardin et al., 2017; Vyas et al., 2020). Inoltre, l'integrazione di zinco durante la gravidanza ma anche in epoca post-natale è in grado di migliorare le anomalie comportamentali in diversi modelli roditori di autismo (Shih et al., 2020; Zhang et al., 2023). Si potrebbe quindi ipotizzare che la carenza prenatale di Zn possa essere fortemente implicata nell'eziologia dell' ASD.

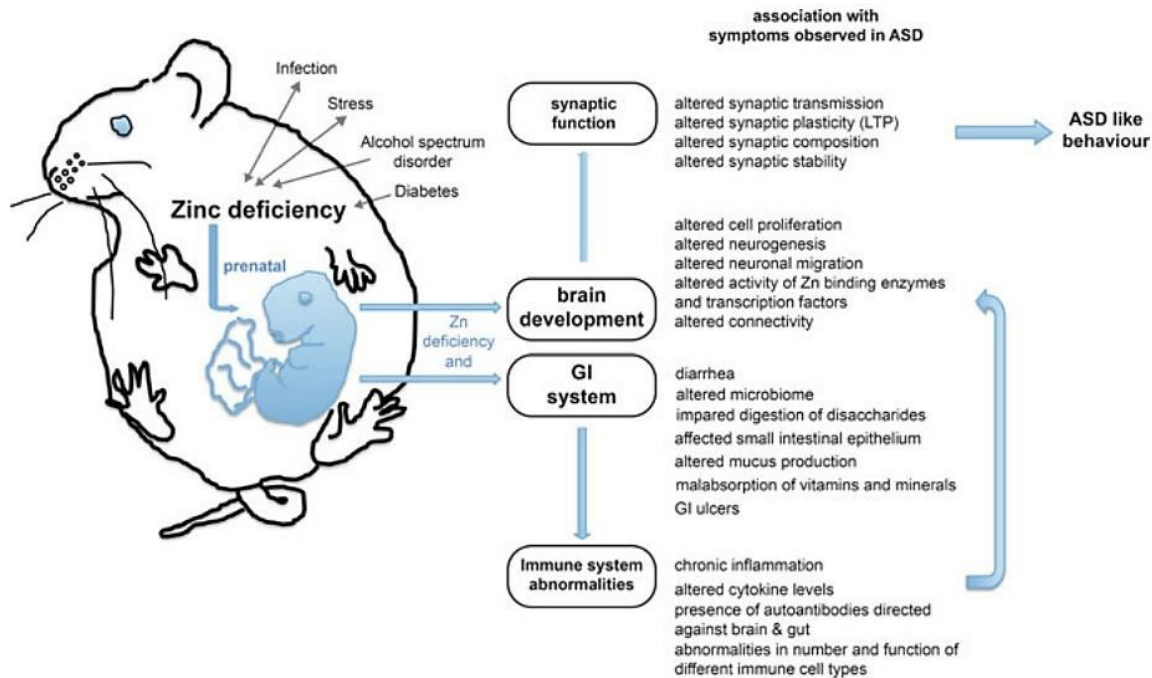


Fig. 1.6 Associazione tra carenza prenatale di Zn e ASD. La carenza materna di Zn è stata associata non solo alla malnutrizione ma anche a infezioni, stress, consumo di alcol e diabete. Questa carenza può avere un impatto negativo sia nel tratto gastrointestinale, causando problemi come diarrea, microbioma alterato e malassorbimento, sia nel cervello in via di sviluppo, compromettendo la connettività cerebrale, la neurogenesi e la funzione sinaptica. Questi effetti possono contribuire ai sintomi dell'autismo, inclusi disturbi comportamentali e reazioni immunitarie che portano a infiammazione cronica, rilascio di citochine e presenza di autoanticorpi (Modificato da Hill-Yardin et al., 2017).

3.2.4.2 Folato

Come donatore di gruppi metilici, il folato è necessario per i normali processi di metabolismo, riproduzione e sviluppo. Il folato aiuta anche ad evitare l'accumulo di livelli eccessivi di omocisteina sierica che sono associati a infiammazione, danni vascolari e a malformazioni teratogene (Bobrowski-Khoury et al., 2021). Vista l'importanza nello sviluppo, è consenso generale che le donne incinte dovrebbero assumere multivitaminici che includono acido folico al fine di prevenire i difetti del tubo neurale (Liu et al., 2020). Un tasso significativamente più alto di ASD è stato riscontrato in bambini nati da madri che non hanno assunto acido folico durante la gravidanza, rispetto a quelli nati da madri che lo hanno integrato. Tuttavia, altri studi hanno ottenuto risultati opposti, collegando un aumento del rischio di ASD e danni neuro-cognitivi all'assunzione in gravidanza di integratori a base di acido folico (Beard et al., 2011; Brucato et al., 2018). Questa discrepanza potrebbe essere dovuta alle differenze tra acido folico presente negli

integratori e quello proveniente da fonti naturali. Quello proveniente da fonti naturali è infatti la forma attiva dell'acido folico, definita anche folato attivo, mentre quello sintetizzato chimicamente è la forma ossidata, definita anche come acido monopteroilglutammico che ad alti livelli potrebbe indurre cambiamenti nella trasmissione sinaptica e alterazioni nell'espressione di molti geni associati all'autismo (Giroto et al., 2013; Barua et al 2014). Un'altra spiegazione potrebbe essere correlata al fatto che l'acido folico interferisce con la biodisponibilità dello Zn alterando, quindi, i processi in cui è implicato con effetti sul neurosviluppo (si veda paragrafo Zinco).

3.2.4.3 Vitamina D

La vitamina D è una vitamina liposolubile che viene principalmente sintetizzata nella pelle attraverso la reazione del 7-deidrocolesterolo tramite radiazione UVB (Bivona et al., 2019). La vitamina D è nota principalmente per il suo ruolo nella regolazione del metabolismo del Ca^{2+} e del fosforo, influenzando così la crescita e lo sviluppo osseo (García-Serna e Morales, 2020). Ricerche recenti hanno determinato un ruolo cruciale di questa vitamina anche nello sviluppo cerebrale in quanto in grado di guidare processi fondamentali quali, differenziazione neuronale, proliferazione, apoptosi, plasticità sinaptica, sistema dopaminergico e riduzione del carico ossidativo (Karras et al., 2018). Il deficit di vitamina D è un fenomeno globale e, negli ultimi anni, diverse evidenze scientifiche hanno fornito prove a sostegno dell'ipotesi che sia un fattore favorevole all'insorgenza dell'ASD (Eissa et al., 2018; Wang et al., 2022). Studi clinici in bambini autistici di diverse nazioni e gruppi etnici, hanno rilevato livelli ridotti di vitamina D che sono stati correlati negativamente con la gravità dei sintomi (Wang et al., 2020). Durante la gestazione bassi livelli sono stati associati non solo a un rischio maggiore di autismo ma anche ad anomalie comportamentali più severe (García-Serna e Morales, 2020). Questi dati sono stati supportati da studi preclinici nei quali è stato dimostrato che il deficit di vitamina D in roditori causa alterazioni cerebrali strutturali e funzionali, oltre a variazioni del microbiota, simili a quelle riscontrate nei pazienti con ASD (Ahn et al., 2014; Principi ed Esposito, 2019; Ali et al 2019; Tamang et al., 2023). Infine, ulteriori prove a sostegno del possibile ruolo eziologico della vitamina D nell'autismo derivano dalla sua azione antinfiammatoria e dalla sua capacità di influenzare direttamente ben 223 degli 888 geni candidati (Mazahery et al., 2016; Trifonova et al., 2019).

3.2.5 Inquinanti ambientali

Oramai, sia i bambini che le madri sono esposti costantemente a elevate quantità di sostanze chimiche di cui circa 200 sono risultate neurotossiche negli esseri umani e più di 1000 sono state identificate come nocive per il sistema nervoso. Ciò implica che una vasta gamma di inquinanti ambientali, tra cui pesticidi, insetticidi e metalli pesanti, può interferire severamente con il normale sviluppo cerebrale e provocare l'ASD (Landrigan, 2010).

L'esposizione a bassi livelli di pesticidi durante la gravidanza o l'allattamento è considerato un fattore di rischio biologicamente plausibile per l'insorgenza di disturbi del neurosviluppo nei bambini; infatti, diversi studi epidemiologici hanno trovato una forte associazione tra questi e l'autismo (Domingues et al., 2016; Sagiv et al., 2018; von Ehrenstein et al., 2019; Wang et al., 2021; Xu et al., 2013). Ad esempio, il glifosato, l'erbicida più utilizzato al mondo, in epoca prenatale e neonatale nei roditori ha dimostrato indurre anomalie sociali e cognitive persistenti, similmente a quanto osservato nell'ASD (Ait-Bali et al., 2020). Le indagini sui meccanismi patogenetici sottostanti alle anomalie comportamentali indotte dall'esposizione a questo erbicida in fasi sensibili del neurosviluppo hanno riportato attivazione astrocitaria e microgliale, anomalie nei geni antiossidanti e infiammatori nel cervelletto e nella corteccia cerebrale, diminuzione della via di segnalazione Wnt/Ca⁺² e stress ossidativo, similmente a quanto osservato nell'ASD (He et al., 2022). Alle anomalie comportamentali causate dal glifosato potrebbero contribuire anche la composizione alterata degli acidi grassi a catena corta nelle feci, il microbiota intestinale perturbato e i livelli diminuiti di acidi grassi epossidici nel sangue e in tessuti cerebrali quali ippocampo, corteccia prefrontale e striato (Pu et al., 2020). Per giunta, le anomalie nel microbiota intestinale, la morfologia dendritica e assonica, la neurotrasmissione e l'attivazione eccessiva di microglia e astrociti sono meccanismi patogenetici che si riscontrano comunemente anche a seguito dell'esposizione ad altri pesticidi. Perciò, questi processi fisiopatologici potrebbero potenzialmente collegare i pesticidi allo sviluppo dell'ASD (He et al., 2022; Fig.1.7).

Con il termine di metalli pesanti ci si riferisce a metalli e metalloidi con densità relativamente elevate (superiori a 5 g/cm³), alta capacità bioaccumulativa lungo la catena alimentare e significativa tossicità per gli organismi viventi. Questo gruppo di xenobiotici può avere sia un'origine naturale che antropica e ne fanno parte, ad esempio, cadmio (Cd²⁺), piombo (Pb²⁺), nichel (Ni²⁺), cromo (Cr³⁺), mercurio (Hg²⁺), e metalloidi come

l'arsenico (As^{3+} ; Pourret et al., 2019). E' stato suggerito che i metalli pesanti, essendo capaci di interferire con il normale sviluppo cerebrale mediante meccanismi epigenetici come la metilazione del DNA, le modifiche istoniche e l'espressione di microRNA (miRNA), e con alterazioni della segnalazione intestino-cervello attraverso la modifica della composizione del microbiota, possano portare a stress ossidativo, neuro-infiammazione, gliosi e demielinizzazione degli assoni parallelamente a quanto si osserva nella fisiopatologia dell'ASD (Błażewicz A, Grabrucker et al., 2022). Inoltre, i bambini con autismo tendono a mostrare una carenza generale nei sistemi di difesa contro le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e un'omeostasi redox compromessa con una maggiore suscettibilità allo stress ossidativo, comparabilmente a quanto si osserva nei casi di tossicità da metalli pesanti (Zaky, 2017), il che potrebbe essere dovuto a una sintesi alterata del glutatione (GSH) e a un sistema di difesa antiossidante compromesso (Cekici e Sanlier, 2019).

3.2.6 Medicinali e droghe

La comprensione degli effetti dei farmaci sul feto rappresenta, ad oggi, un argomento di grande interesse. Tuttavia, poiché solitamente le donne incinte sono escluse dai trial clinici, gli effetti dell'esposizione prenatale ai farmaci maggiormente commercializzati rimangono, ad oggi, non del tutto chiari (McKiever et al., 2020). Ciononostante, diversi studi epidemiologici hanno evidenziato un'associazione significativa tra determinati tipi di farmaci e alterazioni del neurosviluppo. Ad esempio, l'uso di farmaci antiepilettici, come l'acido valproico, è un fattore di rischio ormai ben consolidato nell' ASD, tanto che il suo utilizzo in epoca prenatale nei roditori consente la generazione di un importante "environmental-based model" di autismo idiopatico (Chen et al., 2020). Parallelamente, una connessione positiva esiste anche tra l'uso di antidepressivi durante la gravidanza/allattamento e l'autismo in quanto probabilmente, agendo generalmente come inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, sono in grado di alterare la disponibilità di questo neurotrasmettitore nelle sinapsi e portare così ad anomalie comportamentali tipiche dell'ASD (Maloney et al., 2020). Studi su modelli animali hanno infatti riportato che alterazioni del sistema serotoninergico, in epoca prenatale o durante l'allattamento, sono responsabili di vocalizzazioni alterate e deficit sociali (Maloney et al., 2018; Lan et al., 2023).

È ormai noto che il fumo materno è associato a diversi pericoli e al rischio che il bambino sviluppi disturbi cognitivi, emotivi e sociali (Tiesler e Heinrich, 2014). Il fumo è una miscela complessa di gas e particolato, sia quando viene fumato direttamente che, quando viene inalato come fumo passivo. I principali componenti del fumo includono la nicotina, i composti organici volatili, metalli come Cd^{2+} , Cr^{3+} , As^{3+} , Pb^{2+} e vari inquinanti gassosi. Alcuni studi hanno dimostrato come la nicotina entrando nel flusso sanguigno si distribuisce in tutti gli organi principali del corpo, compresi i polmoni, il cervello e il fegato, e può facilmente entrare nel corpo fetale attraverso la barriera placentare materna (Centers for Disease Control and Prevention, 2010). Ulteriori ricerche hanno, inoltre, indicato che la nicotina può interagire direttamente con i recettori dell'acetilcolina nel cervello fetale e influenzare il rilascio di altri neurotrasmettitori, tra cui dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina, GABA, Glu e β -endorfina (Yong et al., 2021). Oltre alla nicotina, il fumo di sigaretta contiene metalli pesanti che, come spiegato precedentemente (si veda paragrafo “Inquinanti ambientali”), sono importanti fattori di rischio per l'ASD.

3.2.7 Vaccini e autismo: un falso mito!

I vaccini rappresentano una conquista importante per l'umanità, in quanto capaci di prevenire malattie gravi ed epidemie, migliorando la qualità della vita. Tuttavia, nel 1998, è emerso un rapporto che ha suscitato preoccupazioni riguardo ai vaccini contro morbillo, parotite e rosolia, suggerendo la possibilità che potessero aumentare il rischio di autismo nei bambini che li ricevevano (Wakefield et al., 1998). Così, da quel momento, in molti genitori si è radicata un'idea pericolosa che li ha spinti a non effettuare le vaccinazioni per i propri figli. È importante sottolineare che il rapporto è stato successivamente ritrattato e che diversi studi epidemiologici non hanno trovato alcuna associazione tra vaccino e autismo (Taylor et al., 2014; Hviid et al., 2019; Gabis et al., 2022). Per cui, ad oggi, non è stata trovata alcuna prova scientifica che supporti l'idea che i vaccini contribuiscano allo sviluppo dell'ASD, che al contrario ne dimostrano il ruolo fondamentale nella prevenzione della sofferenza, della disabilità e della morte.

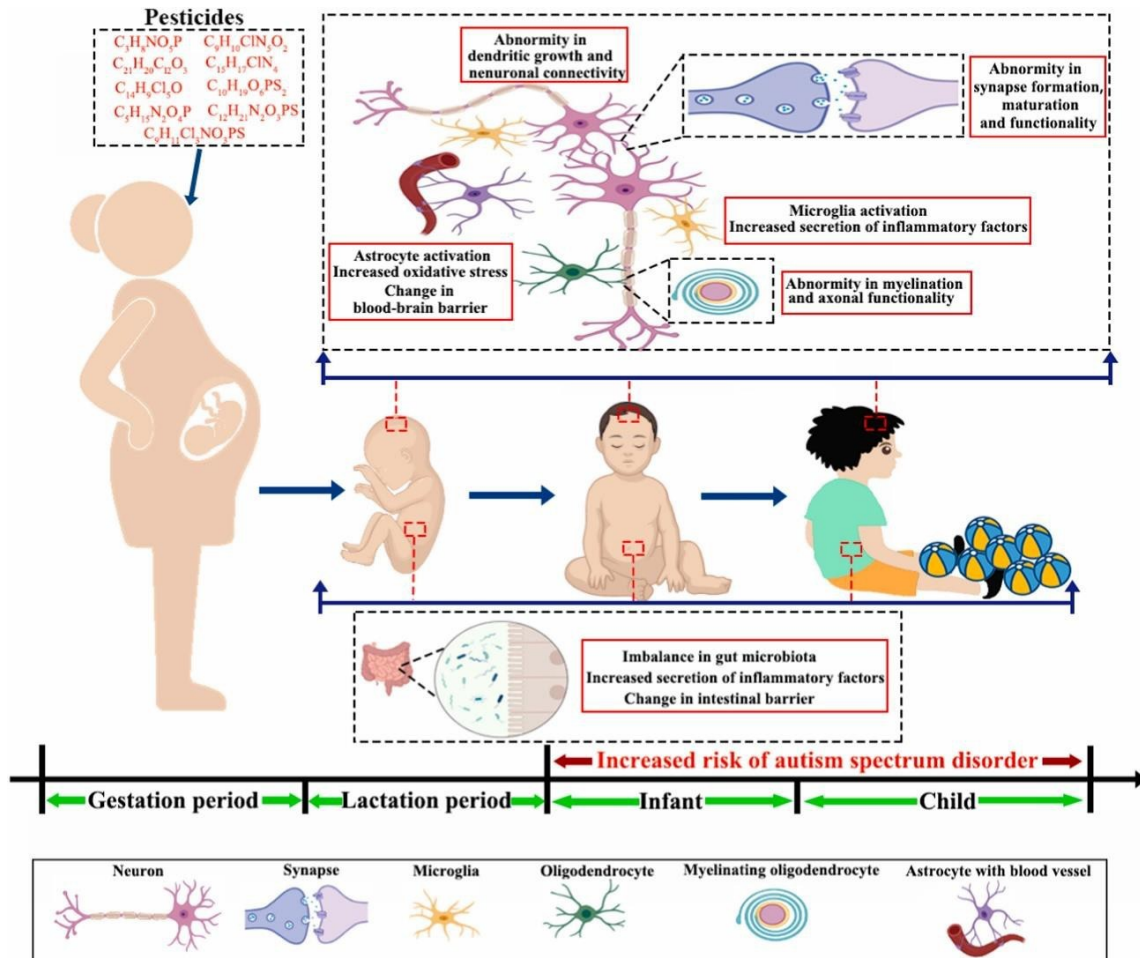


Fig. 1.7 Esposizione prenatale ai pesticidi e vulnerabilità allo sviluppo dell'autismo. L'esposizione ai pesticidi durante la gestazione e l'allattamento può causare una serie di anomalie nei sistemi fisiologici dei discendenti, aumentando il rischio di ASD. Nota: $C_3H_8NO_5P$, glifosato; $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$, permetrina; $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, clorpirifos; $C_{14}H_9Cl_5O$, diclorodifeniltricloroetano; $C_9H_{10}ClN_5O_2$, imidacloprid; $C_{15}H_{17}ClN_4$, miclobutanil; $C_{10}H_{19}O_6PS_2$, malathion; $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$, diazinon; $C_5H_{15}N_2O_4P$, glufosinato-ammonio (modificato da He et al., 2022).

3.3 Fattori epigenetici

L'epigenetica è lo studio delle modifiche ereditabili e stabili dell'espressione genica che avvengono attraverso modificazioni cromosomiche, piuttosto che nella sequenza del DNA. Nonostante non alterino direttamente la sequenza del DNA, i meccanismi epigenetici svolgono un ruolo cruciale nella regolazione dell'espressione genica coinvolgendo essenzialmente aspetti come la modifica chimica delle basi del DNA e le alterazioni nella struttura tridimensionale dei cromosomi (Simpson et al., 2023).

I geni coinvolti nelle vie epigenetiche rappresentano una parte significativa dei geni candidati associati all'ASD. Queste evidenze insieme ad altre prove scientifiche confermano il ruolo cruciale di specifici effettori epigenetici quali metilazione del DNA, modifiche istoniche e RNA non codificanti (microRNA) nell'eziologia dell'ASD (Bhandari et al., 2020; Perini et al., 2023).

Le modificazioni istoniche sono cambiamenti che interessano le proteine basiche, che costituiscono la componente strutturale della cromatina (istoni), e che portano alla generazione di regioni genomiche con un diverso potenziale di trascrizione. Diverse sono le modifiche che gli istoni possono subire, ma le più comuni sono l'acetilazione che consiste nell'aggiunta di un acetile e che, in genere, si associa ad un'"apertura" della cromatina e quindi ad un aumento della trascrizione e la metilazione che, invece, avviene a seguito dell'aggiunta di gruppi metilici, determinando comunemente una "chiusura" cromatinica con conseguente riduzione della trascrizione (Streifer e Gore, 2021). L'associazione tra modifiche istoniche e ASD è stata esaminata sistematicamente in uno studio condotto nel 2016 su cervelli post-mortem di pazienti affetti, dimostrando che circa il 68% dei pazienti condivideva modifiche istoniche in regioni localizzate a livello della corteccia prefrontale e temporale. È stato inoltre dimostrato che i geni coinvolti erano legati a canali ionici, sinapsi, morfogenesi del tratto digestivo, segnalazione di chemochine e a processi microgliali (Sun et al., 2016).

La metilazione del DNA è la modifica epigenetica più comunemente studiata nell'autismo. Questo avviene sia per motivi pratici che biologici. Dal punto di vista pratico, la metilazione del DNA è una marcatura relativamente stabile nei tessuti congelati. Dal punto di vista biologico, la metilazione del DNA è abbondante nel genoma umano, è strettamente correlata ad altri processi epigenetici ed è influenzata direttamente dalla sequenza stessa (LaSalle, 2023). Così come per le modificazioni istoniche, anche per la metilazione del DNA sono state condotte ricerche che hanno consentito di individuare un pattern di metilazione che varia tra pazienti affetti e pazienti neurotipici in diversi tessuti, tra cui tra cui sperma, sangue e placenta (Zhu et al., 2019; García-Ortiz et al., 2021; Garrido et al., 2021; Feinberg et al., 2023). Inoltre, altri studi hanno rilevato variazioni di metilazione in specifici geni candidati associati all' ASD, tra cui l'ipermetilazione di APOE e HTR2A e l'ipometilazione di HTR4 (Hu et al., 2018; Hranilović et al., 2015; Hu et al., 2020). È stato anche dimostrato che la metilazione specifica del locus di Mecp2, noto per essere ipermetilato nei soggetti autistici, è associata a cambiamenti tipici di questa sindrome (Lu et al., 2020). In aggiunta, una mutazione nel

gene *ASH1L*, che codifica l'enzima istone-lisina N-metiltransferasi, è stata riscontrata in alcuni pazienti affetti da questa sindrome e, nei modelli murini, ha dimostrato causare molteplici difetti nello sviluppo, comportamenti autistici e problemi cognitivi (Gao et al., 2021; Shen et al., 2019).

I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificante che svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica. Questi miRNA agiscono come regolatori post-trascrizionali, il che significa che influenzano l'attività dei geni dopo che l'informazione genetica è stata trascritta in mRNA, ma prima che venga tradotta in proteine. Un singolo miRNA può legarsi a diverse centinaia di siti bersaglio nelle regioni non tradotte 3' (3' UTR) degli mRNA e controllare una vasta gamma di vie molecolari che potrebbero essere coinvolte nella fisiopatologia dell'ASD. In effetti, i miRNA sono espressi in varie regioni del cervello e svolgono funzioni cruciali durante lo sviluppo cerebrale (Tsujimura et al., 2022). Diversi studi hanno consentito di identificare numerosi miRNA candidati per l'autismo, implicati in processi quali differenziazione neurale, plasticità sinaptica, formazione della memoria, infiammazione e sviluppo dendritico (Fig.1.8; Li et al., 2022). Ad esempio, uno studio recente ha evidenziato una iper-espressione del miRNA 155p nell'amigdala di bambini autisti, il che è correlato al profilo infiammatorio che tipicamente si riscontra in questa sindrome (Almehmadi et al., 2020).

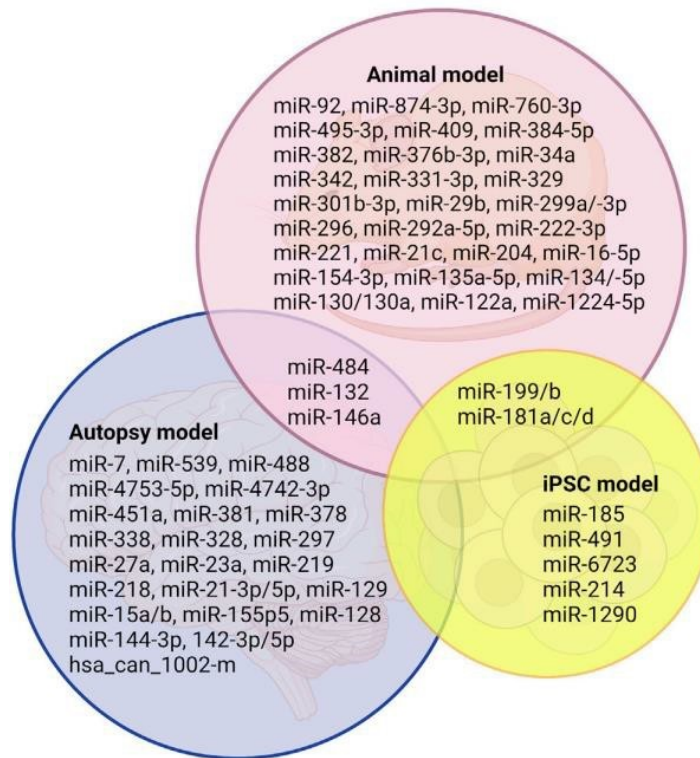


Fig.1.8 MicroRNA candidati per l'autismo. I diversi microRNA sono stati identificati in studi post-mortem su umani, in modelli roditori e nelle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) (modificato da Li et al., 2022).

4. FISIOPATOLOGIA DELL'ASD

Nonostante tutti i progressi compiuti nell'identificazione dei fattori genetici, ambientali ed epigenetici implicati nell' ASD, c'è ancora molto da scoprire. Si potrebbero potenzialmente creare modelli di studio diversi per tutti i fattori di rischio genetici e non genetici, ma potrebbe non essere necessario vista la convergenza verso una sintomatologia simile, nota come fenotipo autistico. Questo fenomeno di convergenza suggerisce una connessione delle vie biologiche coinvolte in un punto comune per dare origine a questa sindrome, che però, ad oggi, non è stato ancora possibile identificare (Jure, 2019).

Gli sforzi scientifici nel campo dell'autismo hanno dimostrato che, nonostante la mancanza di un pathway convergente universalmente riconosciuto, vi sono diversi meccanismi fisiopatologici chiave che emergono come promettenti linee di ricerca, quali regolazione della neurotrasmissione, infiammazione, stress ossidativo, integrità della mielina e composizione del microbiota intestinale (Usui et al., 2023; Lewerissa et al.,

2023; Avolio et al., 2022; Zhou e Fu, 2022). Esaminare e focalizzarsi su questi meccanismi rappresenta un passo cruciale per migliorare la comprensione dell'autismo e per lo sviluppo di terapie appropriate.

4.1 Alterazioni neurochimiche

I neurotrasmettitori e i neuropeptidi svolgono un ruolo fondamentale nel corretto sviluppo cerebrale contribuendo alla regolazione delle attività cognitive, sociali e motorie (Quaak et al., 2013). Oltre alla trasmissione sinaptica, questi componenti influenzano processi quali la migrazione neuronale, la differenziazione, la sinaptogenesi, l'apoptosi e la potatura sinaptica. Conseguentemente, alterazioni dirette o indirette dei sistemi di neurotrasmissione possono compromettere il corretto funzionamento cerebrale e contribuire all'insorgenza dell'autismo (Arya e Sindhvani, 2017). Nella fisiopatologia dell'ASD sono stati esaminati numerosi sistemi di neurotrasmissione e fra questi, quello GABAergico, glutammatergico e ossitocinergico hanno dimostrato un forte legame con questa sindrome (Marotta et al., 2020).

4.1.1 Il sistema GABAergico e Glutammatergico

Il GABA è un neurotrasmettitore che si forma a partire dal Glu attraverso una reazione di decarbossilazione catalizzata dall'enzima Glu decarbossilasi. Il GABA svolge un'importante funzione nel bilanciare l'eccitabilità neuronale, svolgendo principalmente un ruolo eccitatorio, durante lo sviluppo cerebrale, influenzando processi chiave come la proliferazione delle cellule nervose, la loro migrazione nel cervello, la maturazione delle sinapsi, la differenziazione e l'apoptosi, mentre svolge azione inibitrice nel sistema nervoso maturo. Non sorprende, quindi, che difetti del sistema GABAergico siano stati associati a molti disturbi dello sviluppo neurologico e all'autismo (Di et al., 2020).

Oltre alle mutazioni in geni coinvolti nella neurotrasmissione GABAergica (si veda paragrafo Eziologia), nel campo dell'autismo sono state identificate variazioni in questo sistema mediante l'utilizzo di diverse tecniche di indagine. Ad esempio, mediante tecniche di neuroimaging, nelle regioni cerebrali motorie, visive, uditive e somatosensitive dei pazienti autistici sono state rilevate alterazioni del sistema GABAergico e dei livelli del GABA che si correlano alla gravità dei sintomi e alle

differenze di genere che caratterizzano questa sindrome (Fung et al., 2021). Nello specifico, è stata osservata una correlazione negativa tra i livelli del GABA nella regione del talamo e la gravità dei sintomi nei maschi affetti, mentre nelle femmine è stata osservata una correlazione opposta. Tramite studi post-mortem, sono stati evidenziati sovraespressione della Glu decarbossilasi 67 (GAD 67) negli interneuroni inibitori, sottoregolazione di GAD 65 nelle cellule più grandi dei nuclei dentati del cervelletto, oltre che livelli significativamente ridotti di svariate subunità dei recettori GABA_A e GABA_B in diverse aree cerebrali (Yip et al., 2008; Yip et al., 2020; Fatemi et al., 2009; Hong et al., 2020). Inoltre, a livello plasmatico, è stato notato un significativo aumento dei livelli del GABA e del rapporto Glu/glutamina rispetto ai neurotipici (Al-Otaish et al., 2018). Il legame tra questo sistema di neurotrasmissione e autismo è stato ulteriormente confermato dall'individuazione in modelli animali di alterazioni GABAergiche, come la sottoespressione di GABRA2 e alterazioni nella neurotrasmissione dei GABA_A, la cui modulazione si associa a miglioramenti delle anomalie comportamentali (Lim et al., 2017; Yoshimura et al., 2017; Tallarico et al., 2023).

È interessante notare che le cellule del sistema immunitario possiedono recettori GABA_A, suggerendo un ruolo cruciale del sistema GABAergico anche nella regolazione dell'infiammazione in patologie autoimmuni (Tian e Kaufman, 2023). In accordo con questa ipotesi, uno studio recente ha dimostrato che la somministrazione in ratti autistici di omotaurina, un amminoacido strutturalmente simile al GABA, non solo ha migliorato le anomalie comportamentali ma ha anche ridotto i livelli delle citochine proinfiammatorie IL-1 β , IL-6 e TNF- α , aumentando al contempo il livello della citochina antinfiammatoria IL-10 nel SNC (Singla et al., 2022).

Il Glu, oltre ad essere il principale neurotrasmettitore eccitatorio del cervello dei mammiferi, è un neuromodulatore chiave nel controllo delle sinapsi e delle funzioni dei circuiti cerebrali. Le azioni del Glu sono mediate dai sottotipi α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA), e kainato del recettore ionotropico (iGluR), che mediano le risposte sinaptiche veloci, e Recettori metabotropici del Glu di tipo 1-8 (mGluR), che modulano l'eccitabilità delle cellule e la neurotrasmissione sinaptica più lentamente, innescando una serie di reazioni intracellulari a cascata, mediate da un secondo messaggero (Zoicas e Kornhuber, 2019).

La neurotrasmissione glutamatergica è molto importante nelle forme prolungate di plasticità, contribuendo alle funzioni cognitive, come l'apprendimento e la formazione della memoria (Tam e Ju, 2022). Inoltre, è anche coinvolto nelle attività motorie,

sensoriali e nelle interazioni sociali (Iovino et al., 2020; Zoicas et al., 2019). Conseguentemente, essendo questo neurotrasmettitore implicato in una così ampia gamma di funzioni, è fondamentale mantenerne i livelli extracellulari all'interno di un intervallo fisiologico, al fine di garantire una trasmissione e una vitalità neuronale adeguata evitando implicazioni neuropatologiche significative.

Negli ultimi anni l'aumento delle evidenze derivate da analisi genetiche, di neuroimaging e da studi in modelli animali, a sostegno della nozione di metabolismo glutammatergico alterato nei disturbi del neurosviluppo, ha incentivato l'interesse nella valutazione della disfunzione di questo sistema di neurotrasmissione nell' ASD (Nisar et al., 2022).

La letteratura scientifica fornisce un ampio supporto bibliografico riguardo ai cambiamenti nei livelli di Glu e glutammina nei pazienti affetti da autismo. Inizialmente, gli studi clinici si sono concentrati sui livelli plasmatici, rilevando un significativo aumento di Glu e decremento di glutammina nei bambini con ASD rispetto ai neurotipici, dati che sono stati poi confermati da studi più recenti e correlati alla gravità dei sintomi (Moreno et al., 1992; Moreno-Fuenmayor et al., 1996; Al-Otaish et al., 2018; Khalifa et al., 2019). Questi cambiamenti sono stati riportati anche alle regioni cerebrali, con concentrazioni più elevate di Glu in diverse aree implicate nell' ASD quale amigdala, ippocampo, corteccia e cervelletto (Page et al., 2006; He et al., 2021; Kang et al., 2021; Oya et al., 2023).

Data l'alta concentrazione di recettori del Glu nelle regioni cerebrali legate all'autismo, non sorprende che siano state identificate mutazioni nei loro geni e alterazioni trascrizionali e traduzionali delle loro subunità nei pazienti affetti. Pertanto, la maggior parte delle mutazioni sono state osservate negli iGluR, con GRIN2B, GRIN1 e GRM5 tra i più suscettibili, ma anche in geni correlati al sistema di segnalazione glutammatergico, come il gene SLC1A che codifica per un trasportatore del Glu ad alta affinità di tipo gliale e che rientra nella categoria dei geni candidati ad alto rischio (Nisar et al., 2022).

Anche gli studi preclinici hanno evidenziato un ruolo chiaro del Glu nei comportamenti simil autistici. In particolare, in studi su modelli animali è emerso che le proteine regolatrici del sistema glutammatergico, compresi i recettori GluK2, mGlu8, NMDAR, GluR1 e GluR2, nonché i suoi trasportatori quali GLT1, GLAST, SLC1A1 ed EAAT-1,2 risultano fortemente implicati nella fisiopatologia del disturbo autistico (Fig.1.9; Montanari et al., 2022).

Infine, diverse evidenze suggeriscono che il disfunzionamento glutammatergico, l'eccitotossicità (sovraccarico di calcio nei neuroni) e l'infiammazione neurologica

rappresentino fenomeni interconnessi (Viviani et al., 2014). Gli astrociti e le cellule del sistema immunitario regolano l'infiammazione cerebrale attraverso segnali "on" e "off" provenienti dai neuroni. Il rilascio di Glu è un segnale "on" che attiva la produzione di citochine pro-infiammatorie come il TNF- α e l'IL-1 β (Jesudasan et al., 2021). Allo stesso tempo, le citochine possono potenziare il rilascio del Glu e influenzarne i recettori (Mieller et al., 2013). Ad esempio, il TNF- α potenzia le sinapsi eccitatorie e indebolisce quelle inibitorie, spostando così l'equilibrio verso una maggiore eccitazione (Stellwagen et al., 2005). IL-1 β , invece sembra aumentare l'attività dei recettori NMDA e inibire i recettori GABA_A (Viviani et al., 2003; Ruffolo et al., 2022). D'altra parte, è stato dimostrato come IL-10 sposti l'equilibrio verso una maggiore inibizione incrementando l'attività dei recettori GABA_A (Ruffolo et al., 2022).

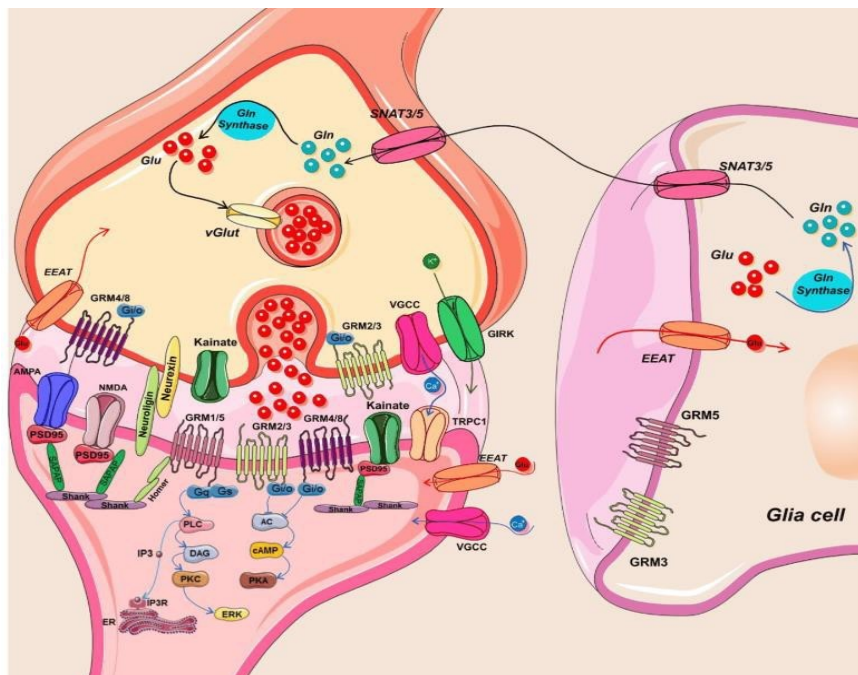


Fig.1.9 Disegno schematico della via sinaptica glutammatergica alterata nell'ASD. Una volta rilasciato, il Glu può legarsi e attivare recettori ionotropici AMPA, Kainato e NMDA o recettori metabotropici accoppiati a proteine G su neuroni postsinaptici o presinaptici, così come su cellule gliali. Il Glu, catturato dalle cellule gliali tramite i trasportatori del Glu EAAT1/2, viene convertito in glutammina, che può essere trasportata nei neuroni glutammatergici tramite i trasportatori SNAT3/5 (Modificato da Montanari et al., 2022).

4.1.2 Ossitocina

L'ossitocina è un ormone peptidico prodotto dai neuroni localizzati soprattutto nel nucleo paraventricolare e, in minor misura, nel sopraottico dell'ipotalamo e secreto dalla

neuroipofisi (Sanchez Jimenez e De Jesus, 2023). L'ossitocina è presente in tutti i mammiferi e svolge un ruolo cruciale nel parto e nella lattazione. Oltre alle funzioni appena elencate, il sistema ossitocinergico ha ricevuto molta attenzione come principale neuromodulatore del comportamento sociale, dimostrando di avere proiezioni diffuse in tutto il sistema nervoso centrale e in particolare all'interno delle strutture del circuito sociale come amigdala, corteccia prefrontale (PFC) e nucleo accumbens (Jones et al., 2017). È stato dimostrato che le anomalie in questo sistema di neurotrasmissione alterano i vari aspetti del comportamento sociale, promuovendo così gli studi sulla determinazione del suo ruolo nell'autismo (Rigney et al., 2022).

Nell' ASD, studi su pazienti umani e modelli animali hanno rivelato che le alterazioni nel sistema dell'ossitocina sono più comuni di quanto inizialmente previsto. Sono state trovate variazioni genetiche nei principali componenti coinvolti nella segnalazione di questo sistema di neurotrasmissione, quali i polimorfismi rs7632287, rs237887, rs2268491 e rs2254298, rs2254298 e rs53576, responsabili di modifiche nei suoi recettori, o in elementi implicati in processi biologici correlati all'ossitocina, come ad esempio in CD38, un ADP-ribosil ciclasi coinvolta nel suo rilascio (Zhang, 2022; Peñagarikano, 2017). Altre alterazioni sono state riportate da indagini effettuate sulla determinazione delle concentrazioni di ossitocina nei campioni biologici di pazienti affetti da autismo, che hanno indicato livelli significativamente inferiori rispetto ai neurotipici (John et al., 2021; Pichugina et al., 2022).

La somministrazione di ossitocina è in grado di produrre una risposta comportamentale e neurobiologica figurandosi come potenziale bersaglio terapeutico per l'autismo (Huang et al., 2021). Ad esempio, uno studio recente ha dimostrato che la somministrazione intranasale di ossitocina, in un modello roditore di autismo, ha migliorato l'interazione sociale, l'ansia e la depressione, oltre ad aver ridotto significativamente i livelli di marcatori infiammatori e di stress ossidativo (Wang et al., 2018).

Gli effetti dell'ossitocina potrebbero anche esplicitarsi attraverso la sua potenziale interazione con il microbiota intestinale. Questo neuro-ormone sembra, infatti, essere in grado di influenzare il microbioma intestinale e, allo stesso tempo, di subirne l'influenza, come suggerito dall'aumento dei suoi livelli dopo la somministrazione di *Lactobacillus reuteri* e dalla riduzione dei suoi recettori in risposta a una diminuzione di questo probiotico (Fetissov et al., 2019).

4.2 Infiammazione

La parola “infiammazione” derivata dal latino “inflammatio” (accendere) è un processo biologico che si attiva in seguito a perturbazioni delle strutture tissutali, a causa di stimoli fisici, chimici o biologici. La risposta infiammatoria è una componente essenziale del sistema immunitario che viene attivata da stimoli nocivi al fine di raggiungere una regolazione omeostatica (Azab et al., 2016). L'infiammazione, a seconda della natura e della capacità della risposta di raggiungere la risoluzione attraverso l'eliminazione dell'agente estraneo o dei tessuti danneggiati, può essere descritta come acuta (di breve durata) o cronica (di lunga durata).

In particolare, la neuroinfiammazione coinvolge l'attivazione di microglia e astrociti, il rilascio di citochine e chemochine, la produzione di ROS e spesso l'infiltrazione di leucociti periferici nel sistema nervoso centrale (Zhou et al., 2021). Nella sua forma transitoria, la neuroinfiammazione è in gran parte protettiva, inducendo, ad esempio, i cosiddetti “sickness behaviors”, evolutivamente necessari per contrastare gli antigeni e le infezioni, potenzialmente mortali, senza compromettere ulteriormente l'integrità della barriera emato-encefalica o il trasferimento di cellule immunitarie periferiche al sistema nervoso centrale (Tohidpour et al., 2017). Inoltre, la neuroinfiammazione contribuisce alla plasticità cerebrale, compresi i processi di crescita e potatura di dendriti e assoni, formazione delle sinapsi e apoptosi, mantenendo così l'equilibrio neuronale (Golia et al., 2019). Tuttavia, se la neuroinfiammazione non avviene in un range fisiologico può portare a deficit neuronali e avere un ruolo significativo nello sviluppo di problemi psicopatologici (Xie et al., 2021).

Le persone autistiche spesso mostrano segni di risposte infiammatorie alterate e anomalie del sistema neuro-immunitario per tutta la vita, il che suggerisce un ruolo dell'infiammazione nella fisiopatologia dell'ASD (Hughes et al., 2023). Il primo collegamento tra sistema immunitario e autismo è stato proposto per la prima volta oltre 40 anni fa. Da allora, numerosi studi hanno rivelato la presenza di uno stato infiammatorio significativo, spesso caratterizzato da livelli elevati di citochine pro-infiammatorie nei pazienti affetti da ASD (Saghazadeh et al., 2019; Pangrazzi et al., 2020). Le citochine sono proteine secrete dalle cellule per coordinare, segnalare e reclutare una risposta a un insulto immunitario. In generale, queste proteine segnalatrici sono di natura pro-infiammatoria e sono importanti per orchestrare la risposta immunitaria, ma possono anche essere antinfiammatorie e regolare o sopprimere una risposta immunitaria crescente

(Majeed et al., 2023). Sono stati registrati profili anomali di citochine e chemochine nel liquido cerebrospinale, nel sangue e nel cervello di pazienti con ASD (Hughes et al., 2023).

L'evidenza suggerisce che le cellule immunitarie periferiche si infiltrino nel sistema nervoso centrale, incrementando la permeabilità della barriera ematoencefalica e inducendo l'attivazione anomala di microglia e astrociti che, a loro volta, producendo una robusta risposta infiammatoria, portano a neuroinfiammazione (Fig.1.10; Hughes et al., 2023). Elevati livelli di citochine pro-infiammatorie, quali IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-8, IL-12 e TNF- α sono stati osservati nel plasma di pazienti affetti da autismo, e associati alla gravità della malattia (Suzuki et al., 2011; Belica et al., 2023). Inoltre, concentrazioni elevate di alcune citochine nel siero materno, come IFN- γ , IL-4 e IL-5, sono state associate a un aumento del rischio di autismo nella prole (Goines et al., 2011; Carter et al., 2021). Alterazioni nel network di citochine (come IL-6, IL-1 β e il TNF- α) sono state osservate anche nei tessuti cerebrali post-mortem dei pazienti con ASD, confermando il ruolo di questi fattori pro-infiammatori nella fisiopatologia di questo disturbo (Liao et al., 2020).

I profili citochinici si correlano alle diverse comorbilità che caratterizzano questa sindrome. Ad esempio, in uno studio è stato osservato che i bambini autistici che soffrivano di epilessia avevano livelli più bassi di IL-6 plasmatica, rispetto ad altri bambini con ASD non epilettici (Jácome et al., 2016). Profili citochinici specifici sono stati osservati anche nei bambini autistici con ADHD rispetto a quelli che non presentavano questa comorbilità (Han et al., 2017).

Il ruolo del sistema immunitario nell'autismo è ulteriormente confermato dall'aumento delle prove precliniche che collegano le risposte infiammatorie alterate con aberrazioni comportamentali simil-autistiche (Hughes et al., 2023). È stato dimostrato che la stimolazione immunitaria, in un determinato momento della gravidanza, determina nella prole l'insorgenza di anomalie sociali, comportamenti ripetitivi e altre comorbilità comuni nell'autismo (Zawadzka et al., 2021). Anche in modelli animali di ASD, quali il BTBR T+Itpr3tf/J (BTBR) e quello dell'acido valproico (VPA), sono state osservate anomalie immunitarie ed elevati livelli di citochine infiammatorie sia a livello periferico che centrale (Careaga et al., 2015; Lucchina et al., 2014), la cui modulazione con agenti antiinfiammatori porta a un miglioramento delle anomalie comportamentali (Cristiano et al., 2022). Di grande rilevanza sono i risultati ottenuti in uno studio recente, nel quale è stato dimostrato che la somministrazione di vasostatina-1, un peptide derivato dalla

cromogranina A e dotato di proprietà antiinfiammatorie, ha invertito i deficit sociali, ridotto i comportamenti ripetitivi e incrementato le capacità mnemoniche nel modello BTBR di autismo idiopatico (Avolio et al., 2024 submitted).

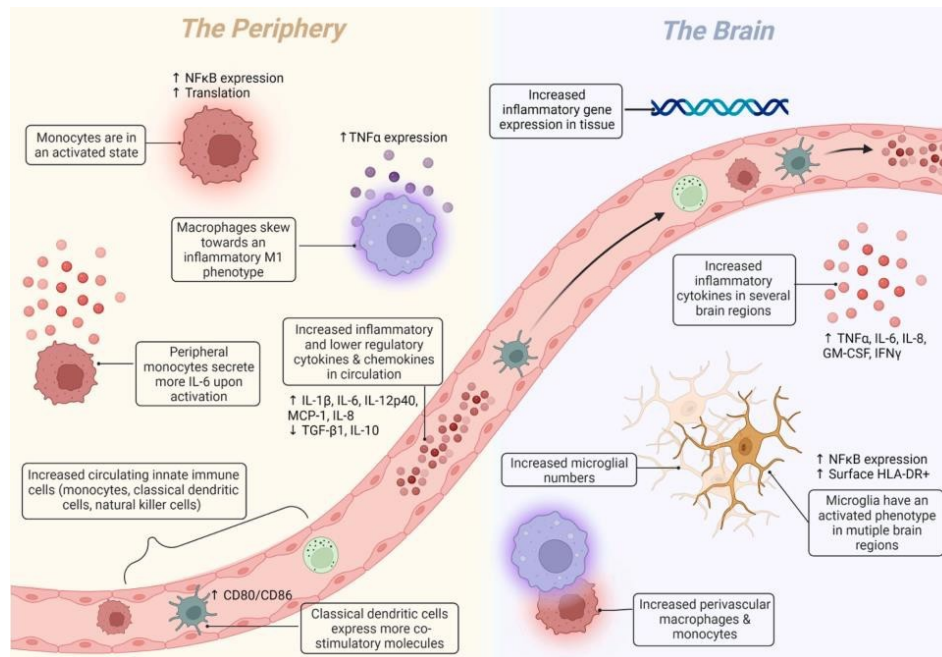


Fig. 1.10 Disregolazione nel sistema immunitario innato periferico e nel cervello dell'ASD. Le citochine infiammatorie prodotte dalle cellule del sistema immunitario sono elevate nella periferia delle persone autistiche. Questo aumento delle citochine e delle alterazioni nelle cellule innate, come monociti, macrofagi e cellule dendritiche, contribuisce all'instaurazione e alla perpetuazione dell'infiammazione. Inoltre, le condizioni infiammatorie nel cervello possono influenzare l'attivazione delle cellule immunitarie residenti e la densità cellulare in diverse regioni cerebrali associate all' ASD (Modificato da Hughes et al., 2023).

4.3 Stress ossidativo

Lo stress ossidativo è definito come uno squilibrio tra le specie pro-ossidanti e antiossidanti. In questa situazione, le specie pro-ossidanti sono in eccesso rispetto agli antiossidanti, il che porta a un ambiente in cui le cellule sono più suscettibili ai danni causati dall'ossidazione. A concentrazioni fisiologiche nell'organismo, ROS e le specie reattive dell'azoto (RNS) regolano diverse funzioni biologiche modulando ad esempio, a livello del sistema nervoso, la plasticità sinaptica, la segnalazione cellulare,

l'orientamento degli assoni e l'apoptosi (Jomova et al., 2023). In uno stato cronico, però, le specie reattive possono diventare dannose, poiché ossidano proteine e lipidi e danneggiano il DNA. Inoltre, la risposta allo stress ossidativo è di cruciale importanza per la risposta neuroinfiammatoria che, come precedentemente descritto, è considerata un importante fattore fisiopatologico dell'ASD. Le specie reattive possono portare all'attivazione della microglia e degli astrociti e di vie di segnalazione, come quella del NF- κ B, che mantengono un'elevata secrezione di citochine e chemochine proinfiammatorie. Allo stesso tempo, citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-1 β , e TNF- α aumentano la produzione di ROS. Si crea così un circolo vizioso in cui le specie reattive causano l'infiammazione che, a sua volta, induce la produzione di ulteriori specie reattive, compromettendo il funzionamento cerebrale (Fig.1.11; Solleiro-Villavicencio e Rivas-Arancibia, 2018).

Il ruolo dello stress ossidativo nell'ASD è stato oggetto di studio per decenni e un numero molto elevato di marcatori, come rivelato dalla comparazione dei loro livelli ematici nei pazienti autistici rispetto a quelli neurotipici, è stato il punto focale della pratica clinica. Lo studio dello stress ossidativo, a livello plasmatico, ha rivelato alterazioni in diversi marcatori, quali riduzione della superossido dismutasi (SOD), aumento della catalasi (CAT) e della perossidazione lipidica nei pazienti affetti da autismo, tali da suggerire una disregolazione di questo sistema (Liu et al., 2022). Ovviamente, l'indagine clinica si è estesa anche al cervello, portando alla luce danni da stress ossidativo e deficit nella capacità antiossidante in aree implicate nell'elaborazione del linguaggio, nel comportamento sociale, nella memoria, nella percezione sensoriale e nella coordinazione motoria (Rossignol e Frye, 2014). Ad esempio, livelli di malondialdeide, un prodotto finale della perossidazione lipidica, dell'8-idrossi-2'-deossiguanosina, un marcatore di danni ossidativi al DNA, e del 3-nitrosile, un marcatore dell'ossidazione proteica, sono risultati significativamente aumentati negli individui con ASD (Rose et al., 2012; Yui et al., 2017). Inoltre, è stato segnalato un maggior numero di cellule cerebrali contenenti lipofuscina, un indicatore di stress ossidativo, in aree corticali correlate al linguaggio (Lopez-Hurtado e Prieto, 2008).

In questo contesto, importanti fattori da considerare sono i mitocondri in quanto essendo una fonte endogena primaria di ROS, nonché un bersaglio principale di questi ultimi, il loro danneggiamento in combinazione ad una non efficace capacità antiossidante può creare un ciclo vizioso di stress ossidativo (Gaetano et al., 2021). I mitocondri disfunzionali producono elevate quantità di ROS, che possono causare il

malfunzionamento degli enzimi della catena di trasporto degli elettroni, in particolare del complesso I e III, e dell'aconitasi, il primo enzima del ciclo dell'acido citrico. A peggiorare questa situazione, il glutatione ridotto (GSH), il principale antiossidante intracellulare e mitocondriale, richiede ATP per la sua produzione de novo. Di conseguenza, una diminuzione nella produzione di ATP dovuta a una ridotta funzionalità mitocondriale comporterà una produzione inferiore di GSH, con conseguente minor controllo dei ROS. In effetti, un rapporto redox di GSH più basso è stato correlato a una minore attività dell'aconitasi nel cervello post-mortem di pazienti autistici (Frye et al., 2020). In più, alterazioni nel DNA mitocondriale (coerentemente con il danno ossidativo) e anomalie nei complessi della catena di trasporto degli elettroni, soprattutto nei complessi I e III, sono stati riscontrati nei soggetti affetti da ASD (Gu et al., 2013; Chen et al., 2015). Conseguentemente, i mitocondri possono contribuire alle anomalie del sistema immunitario per il legame tra infiammazione e stress ossidativo, ma non solo. In presenza di disfunzione mitocondriale potrebbe risultare difficile regolare la risposta infiammatoria dato che le cellule implicate in questo processo dipendono fortemente dall'ATP prodotto dalla fosforilazione ossidativa, contrariamente alle cellule infiammatorie che preferiscono la glicolisi (Fry et al., 2020).

In conclusione, le disfunzioni mitocondriali, possono innescare processi infiammatori a causa del loro impatto sull'energia cellulare, la produzione di ROS e l'interazione con il metabolismo immunitario, contribuendo così alle complicanze legate all' ASD.

4.4 Autofagia

Il termine "autofagia" si riferisce a complesse vie molecolari in cui i componenti intracellulari vengono trasportati al compartimento lisosomiale per la degradazione e il riciclaggio. Finora sono state descritte tre principali forme di autofagia, ovvero, macroautofagia, microautofagia e autofagia chaperone-mediata, che si differenziano per il segnale induttivo, il tempo di azione, il tipo di bersaglio e per il percorso di trasporto verso i lisosomi. La macroautofagia è la forma più comunemente studiata nei contesti patologici ed è ciò che chiamiamo autofagia, durante la quale il carico cellulare, scelto in modo non selettivo o strettamente regolato, viene racchiuso in una vescicola a doppia membrana, chiamata autofagosoma. In base ai carichi specifici coinvolti, la macroautofagia può essere suddivisa in sottotipi, come ad esempio la mitofagia che è

specifica per i mitocondri. Nella microautofagia, invece, non si osserva la presenza di autofagosomi ma la raccolta del materiale cellulare avviene direttamente tramite invaginazioni membranose formate sulla superficie di endosomi tardivi o dei lisosomi. Mentre l'autofagia chaperone-mediata è specifica per le proteine (Filippone et al., 2022).

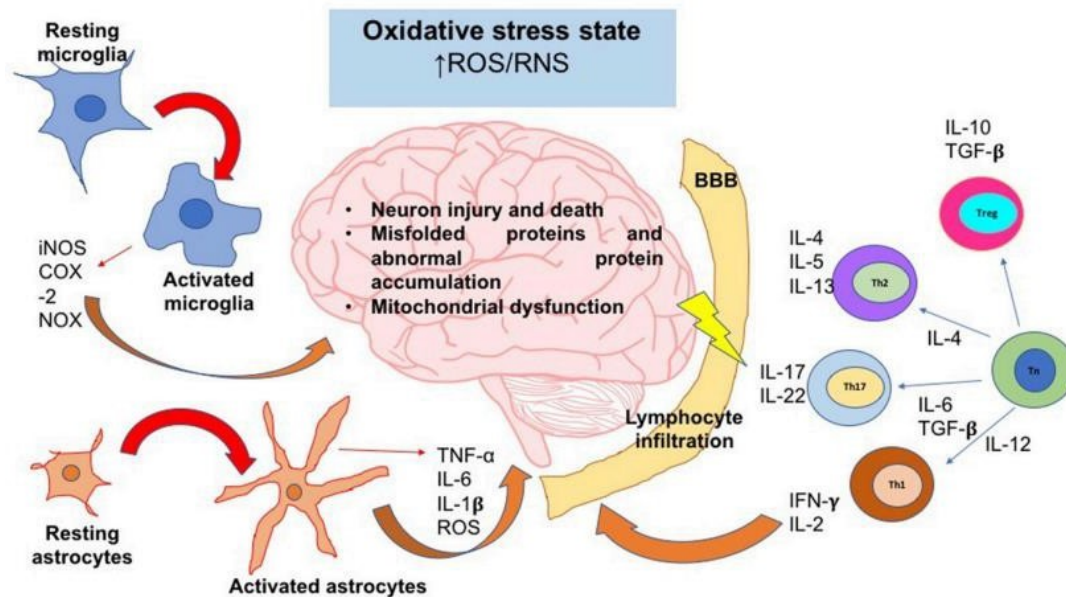


Fig.1.11 Stress ossidativo e danni neuronali. Le specie reattive aumentano attivando cellule infiammatorie cerebrali come microglia e astrociti. Queste cellule rilasciano sostanze proinfiammatorie, peggiorando l'infiammazione (Modificato da Solleiro-Villavicencio e Rivas-Arancibia, 2018).

L'autofagia è una via cellulare responsabile della pulizia degli organelli danneggiati, in particolare di quelli prodotti durante lo stress ossidativo, e della rigenerazione dei precursori metabolici. Soprattutto nei neuroni, l'autofagia impedisce la tossicità cellulare consentendo l'eliminazione di proteine aggregate che altrimenti si accumulerebbero. Inoltre, l'autofagia è importante per la maturazione di dendriti e assoni, per la connessione sinaptica e per un corretto sviluppo cerebrale (Zapata-Muñoz et al., 2021; Stavoe et al., 2019).

Non sorprende, quindi, se diverse ricerche hanno suggerito come alterazioni nell'autofagia siano coinvolte in malattie psichiatriche (Filippone et al., 2022). Dimostrazioni del possibile ruolo dell'autofagia nell'autismo sono date

dall'identificazione di CNV nei geni coinvolti nelle sue vie, così come di una sua compromissione insieme ad un'iperattivazione di un regolatore fondamentale di questo processo, mTOR (mammalian target of rapamycin; Tang et al., 2014; Poultney et al., 2013), in cervelli post-mortem di pazienti con ASD. Altre prove derivano da studi preclinici nei quali è stato osservato che interferenze nel processo autofagico si associano allo sviluppo di comportamenti simil-autistici così come una regolazione del suo deficit ne migliora le anomalie (Kim et al., 2017; Sener et al., 2023; Atia et al., 2023).

Inoltre, il ruolo dell'autofagia nell'autismo potrebbe essere giustificato anche dalla relazione esistente con lo stress ossidativo e l'infiammazione, che potrebbe essere descritta brevemente attraverso i seguenti punti:

- L'autofagia innescata dallo stress ossidativo riduce, a sua volta, il livello di stress ossidativo; i ROS agiscono come molecole segnalatrici nella regolazione dell'autofagia prendendo di mira fattori di trascrizione (ad esempio, il fattore di trascrizione alpha ipossia-inducibile; HIF-1 α) e sistemi di trasduzione del segnale (ad esempio, mTOR e mitogen-activated protein kinase-MAPK). Questo porta all'attivazione dell'autofagia che inibisce l'accumulo di ROS eliminando i mitocondri e i perossisomi danneggiati (Ornatowski et al., 2020).
- L'autofagia svolge un ruolo chiave nei meccanismi di risposta infiammatoria del sistema nervoso: l'inibizione di mTOR e l'attivazione della protein chinasi AMP attivata (AMPK) e Forkhead box O1 (FOXO1) potenziano l'autofagia e, di conseguenza, sopprimono l'attività dell'inflammasoma (NLRP3) e l'apoptosi, contribuendo al sollievo dalla risposta neuroinfiammatoria. In aggiunta, l'autofagia attenua la neuroinfiammazione principalmente promuovendo la polarizzazione della microglia da uno stato pro-infiammatorio a uno antinfiammatorio, riducendo la produzione di mediatori pro-infiammatori e aumentando i livelli di fattori antinfiammatori (Chen et al., 2023; Hegdekar et al., 2023).

4.5 Mielina e oligodendrociti

La mielina, una struttura multi laminare prodotta dagli oligodendrociti nel sistema nervoso centrale, avvolge gli assoni e permette una rapida conduzione saltatoria dei

potenziali d'azione. Recentemente, è emerso che la mielina reagisce all'attività cerebrale e contribuisce al perfezionamento delle reti neuronali, influenzando la velocità e la sincronia dei segnali nervosi, oltre a fornire supporto metabolico agli assoni. Inoltre, le cellule progenitrici degli oligodendrociti ricevono segnali sinaptici dalle fibre nervose in tutto il sistema nervoso centrale, il che suggerisce che potrebbero essere coinvolte in una forma di comunicazione bidirezionale tra neuroni e cellule gliali (Graciarena et al., 2019). Fino a poco tempo fa, si credeva che la mielinizzazione fosse un processo limitato al neurosviluppo. Tuttavia, recenti ricerche mostrano che la mielinizzazione è un processo che avviene anche nell'adulto consentendo il perfezionamento delle reti neuronali per tutta la vita (Shimizu et al., 2023). Infatti, accanto alla plasticità neuronale ve ne è una mielinica, definita come la mielinizzazione degli assoni precedentemente non mielinizzati o come cambiamenti nella struttura degli assoni già mielinizzati (Bonetto et al., 2020). Conseguentemente, essendo la plasticità mielinica capace di modulare i circuiti neuronali, potrebbe svolgere un ruolo chiave nelle disfunzioni che si verificano in malattie neuropsichiatriche come l'ASD (Graciarena et al., 2019).

Gli studi di neuroimaging supportano l'idea che i pazienti autistici presentino un disturbo complesso e dinamico in cui il grado di coinvolgimento della materia bianca sia associato alla gravità clinica. I pazienti autistici mostrano ampie alterazioni nella materia bianca in diverse regioni corticali e sottocorticali, come corteccia, amigdala, fascicolo occipito-frontale, giro occipito-temporale, talamo, peduncolo cerebellare superiore e medio, lemnisco mediale, e tratto cortico-spinale (Fig.12; Galvez-Contreras et al., 2020).

È stato dimostrato che alcuni geni candidati per l'autismo, come PTEN, sono coinvolti nel processo di mielinizzazione anomala, suggerendone un ruolo fondamentale nella fisiopatologia autistica e nella sua presentazione clinica (Lee et al., 2019). Ad esempio, uno studio recente su topi e organoidi derivati da individui affetti da Phelan-McDermid, sindrome genetica con tratti autistici causata da una delezione in eterozigosi in una regione cromosomica dove SHANK3 è codificato, è stato scoperto che oltre ai problemi nella comunicazione tra neuroni, anche i difetti nella formazione della mielina possono contribuire in modo significativo ai sintomi clinici (Malara et al., 2022).

Altra evidenza a supporto del ruolo della plasticità mielinica nell'autismo deriva dalla dimostrazione che la somministrazione di IGF-1 (fattore di crescita insulino simile), la cui via di segnalazione è fondamentale per un'adeguata mielinizzazione degli assoni e la differenziazione degli oligodendrociti, ha consentito di migliorare notevolmente la

funzione neuronale aumentando il potenziamento a lungo termine e riducendo i comportamenti stereotipati (Bozdagi et al., 2013).

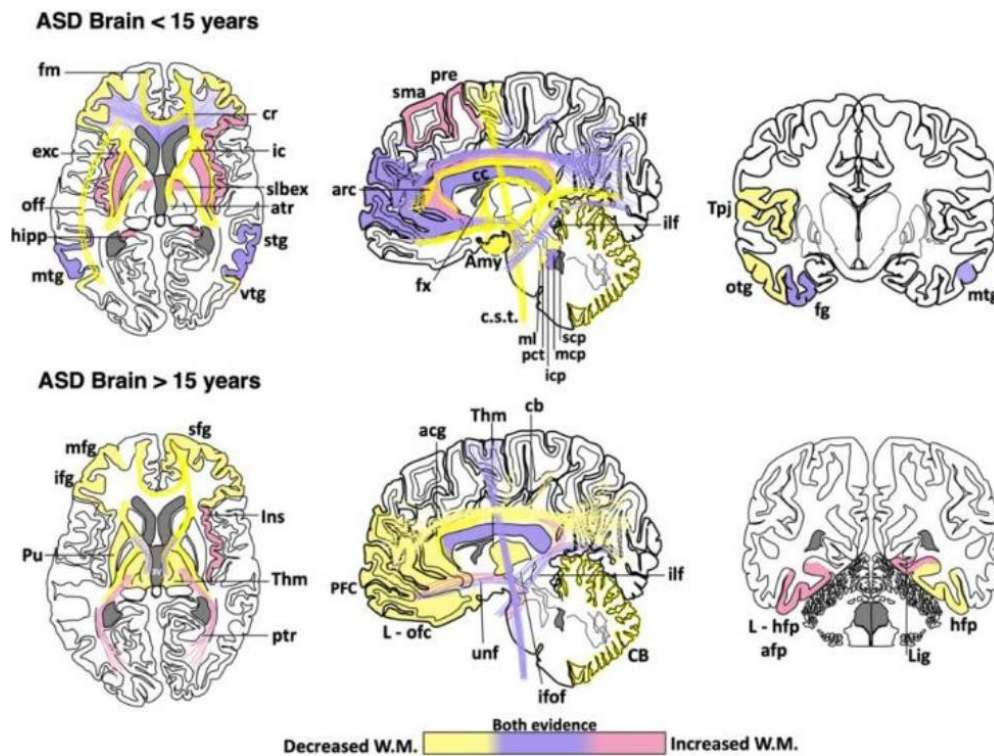


Fig.12 Alterazioni mieliniche in pazienti affetti da ASD. Sono mostrate le più comuni alterazioni mieliniche riscontrate durante due diverse fasi dello sviluppo di pazienti affetti da ASD. Abbreviazioni: acg: giro cingolato anteriore; Amy: amigdala; atr: radiazione talamica anteriore; arc: fascicolo arcuato; CB: cervelletto; cc: corpo calloso; c.s.t.: tratto corticospinale; cr: corona radiata; fm: forcipe minore; fx: fornice; hipp: ippocampo; icp: peduncolo cerebellare inferiore; ifof: fascicolo fronto-occipitale inferiore; ifg: giro frontale inferiore; Ins: insula; ic: capsula interna; mcp: peduncolo cerebellare medio; mtg: giro frontale medio; mtg: giro temporale medio; PFC: corteccia prefrontale; Pu: putamen; scp: peduncolo cerebellare superiore; sfg: giro frontale superiore; slf: fascicolo longitudinale superiore; stg: giro temporale superiore; Tpj: giunzione temporoparietale; Thm: talamo; unf: fascicolo uncinato (modificato da Galvez-Contreras et al., 2020).

4.6 L'asse intestino-cervello

Come detto precedentemente, l'autismo è una sindrome la cui complessità è data anche dalla presenza di comorbidità. Nell' ASD, diversi disturbi psichiatrici e medici possono presentarsi con una frequenza diversa che varia anche in base all'età dei soggetti (Bougeard et al., 2021). Tra le condizioni concomitanti maggiormente presenti figurano i

problemi gastrointestinali. Le metanalisi più esaustive, finora condotte, hanno ottenuto risultati consistenti rivelando che i bambini con autismo hanno una probabilità quattro volte maggiore di sviluppare problemi gastrointestinali, rispetto ai neurotipici e che stitichezza, diarrea e dolore addominale sono riportati più frequentemente (McElhanon et al., 2014; Lasheras et al., 2013). Altri studi hanno segnalato che questi disturbi si associano alla gravità dei sintomi e che la loro severità aumenterebbe a seguito di maggiori compromissioni sociali e verbali (Leader et al., 2022). È stato anche osservato che i bambini autistici con disturbi gastrointestinali manifestano frequenti scoppi di rabbia e comportamenti aggressivi (Iovene et al., 2017). Nonostante questi studi non abbiano indicato precisamente una relazione causa-effetto tra i sintomi gastrointestinali e l'autismo, hanno però suggerito un coinvolgimento dell'intestino in questo disturbo, il che è in linea con il concetto di asse intestino-cervello proposto negli ultimi anni (Margolis et al., 2021).

Il termine "asse intestino-cervello" si riferisce a un complesso sistema morfo-funzionale che comprende il sistema nervoso enterico, i rami del sistema nervoso autonomo, le vie neurali che collegano l'intestino al midollo spinale e al cervello, nonché le regioni cerebrali. Queste componenti collaborano in modo sinergico per regolare la funzione intestinale e influenzare il sistema nervoso centrale, in entrambe le direzioni, coinvolgendo anche ormoni e molecole segnale (Socała et al., 2021). Elemento chiave di questa comunicazione è il microbiota intestinale che, negli ultimi anni, è emerso come un importante fattore fisiopatologico di disturbi neurologici e neuropsichiatrici (Villavicencio-Tejo et al., 2023).

Tutti gli animali, compresi gli esseri umani, si sono evoluti in stretta associazione con comunità microbiche comprendenti batteri, archea, funghi e virus. Queste comunità di microorganismi, indicate collettivamente come microbiota, popolano praticamente ogni superficie del corpo esposta all'ambiente esterno. Il microbiota dotato della più alta abbondanza e densità di microrganismi è quello localizzato a livello intestinale, fondamentale per il funzionamento del nostro sistema immunitario, del nostro metabolismo e persino dello sviluppo di vari organi. Le comunità batteriche del microbiota intestinale sono entità dinamiche che possono cambiare sia nella composizione che nell'attività, nel corso della nostra vita e in risposta a fattori legati all'ospite, come l'età e la genetica, nonché ai cambiamenti nei fattori ambientali, tra i quali dieta e farmaci (Morais et al., 2021). L'ambiente intestinale favorisce principalmente la crescita di batteri appartenenti a sette divisioni predominanti (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*,

Actinobacteria, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Cyanobacteria*). Tra queste sette divisioni, i *Bacteroidetes* e i *Firmicutes* costituiscono oltre il 90% della popolazione totale. La maggior parte delle specie all'interno del Phylum *Bacteroidetes* appartiene ai Generi *Bacteroides* e *Prevotella*. Mentre, le Specie batteriche all'interno del Phylum *Firmicutes* includono prevalentemente i Generi *Clostridium*, *Eubacterium* e *Ruminococcus*. Tuttavia, la comunità microbica presente nei compartimenti del tratto intestinale, ovvero stomaco, intestino tenue e intestino crasso, non è uguale ma differisce in quanto ognuno di essi possiede un ambiente con caratteristiche uniche e una distinta barriera fisico-chimica (Fig.1.14; Adak e Khan, 2019).

Il microbiota intestinale è in grado di influenzare e regolare le funzioni cerebrali attraverso diversi meccanismi che possono essere così riassunti (Fig.1.15):

- Regolazione della barriera intestinale ed emato-encefalica: l'assenza di microbiota nei topi si associa a cambiamenti nell'integrità di queste barriere, determinando una maggiore permeabilità e suscettibilità a modifiche (Braniste et al., 2014; Ghosh et al., 2021). Tali cambiamenti però possono essere invertiti a seguito di trattamenti microbiota-specifici, come il trapianto fecale oppure la somministrazione di metaboliti (Cheng et al., 2018; Knox et al., 2022).
- Produzione di metaboliti, neurotrasmettitori, e di altri componenti neuroattivi: questi composti possono essere prodotti direttamente dai microbi stessi o avere un effetto indiretto attraverso la trasmissione di segnali neuronali o l'influenza sul sistema immunitario (Morais et al., 2021). Ad esempio, il GABA, il più importante neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso, è sintetizzato direttamente da alcuni tipi di batteri intestinali, principalmente *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* (Strandwitz, 2018). Mentre gli acidi grassi a catena corta (SCFAs), metaboliti prodotti dal microbiota intestinale, possono alterare il comportamento attraverso la stimolazione diretta delle vie neurali o mediante effetti centrali indiretti, derivanti dall'attivazione neuroendocrina e immunitaria (Silva et al., 2020).
- Mimetismo molecolare: meccanismo per cui gli antigeni del proprio organismo e quelli estranei condividono somiglianze nella sequenza nucleotidica o nella struttura molecolare con conseguenti effetti biologici. Ad esempio, *Escherichia Coli* è capace di rilasciare una proteina mimetica dell'ormone melanocito stimolante in grado di indurre il rilascio del glucagon-like peptide (GLP-1) e i cui

effetti biologici non sono stati ancora completamente chiariti (Fettisov et al., 2019).

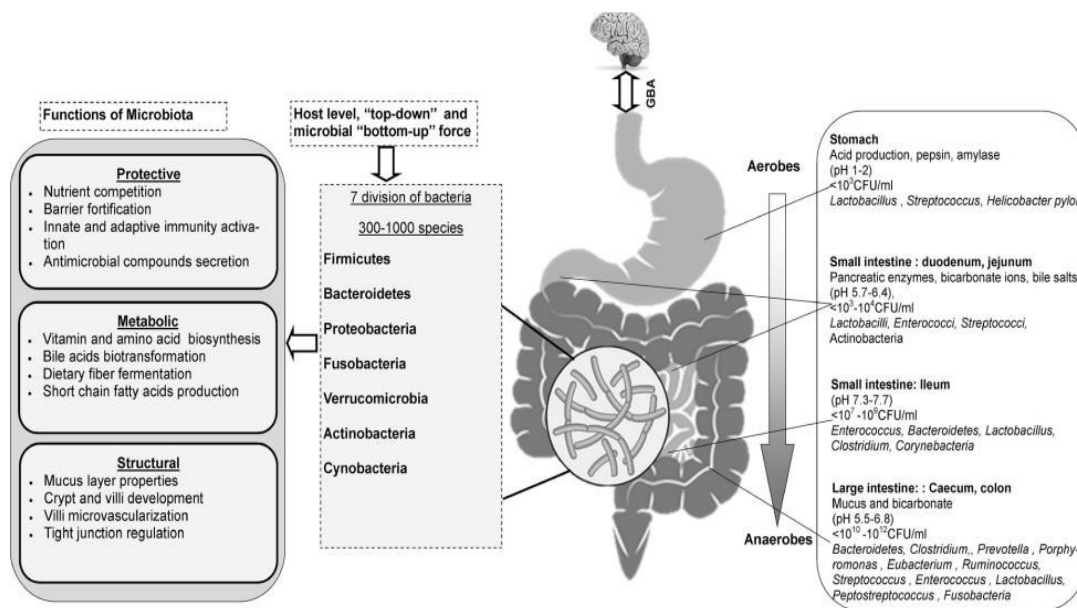


Fig.1.14 Distribuzione della flora intestinale nelle diverse porzioni intestinali. GBA è l'abbreviazione dell'inglese "gut brain axis," che si riferisce all'interazione tra l'intestino e il cervello (Modificato da Adak e Khan 2019).

Vista l'importanza del microbiota intestinale nel funzionamento cerebrale, il suo ruolo è stato e continua ad essere indagato in svariati contesti patologici, incluso l'ASD (Margolis et al., 2021; Villavicencio-Tejo et al., 2023).

In generale, la composizione del microbiota intestinale dei bambini autistici mostra sostanziali differenze: i dati presenti nella letteratura scientifica indicano una riduzione dei *Bacteroides*, dei *Bifidobacterium* e di *Escherichia coli* con un aumento di *Faecalibacterium* e di *Lactobacillus* (Tomova et al., 2015). Nonostante queste differenze non provino l'esistenza di batteri specifici direttamente associati all'insorgenza di questa sindrome, è evidente che una minore quantità di batteri benefici e una maggiore di batteri dannosi è presente nell'intestino dei pazienti affetti da ASD e che la rimodellazione del microbiota può ridurre la severità dei sintomi (Iglesias-Vázquez et al., 2020).

Similmente a quanto osservato negli studi preclinici, anche nei modelli animali per l'autismo sono state riscontrate alterazioni del microbiota, nei quali la rimodellazione attraverso, ad esempio, l'utilizzo di probiotici (definiti come ceppi batterici benefici) e

prebiotici (sostanze non digeribili che stimolano la crescita dei batteri benefici) ne ha migliorato le anomalie comportamentali e fisiologiche, quali infiammazione e alterazioni neurochimiche (Liu et al., 2022; Wang et al., 2023; Pochakom et al., 2022). Inoltre, il trapianto fecale di microbiota proveniente da pazienti autistici in topi neurotipici elicitava comportamenti alterati, suggerendo che il microbiota intestinale potrebbe contribuire all'espressione di comportamenti simili all'autismo (Avolio et al., 2020).

Il microbiota intestinale è in grado di interferire con diversi pathway neuronali modulando processi quali la mielinizzazione, lo sviluppo e la maturazione della microglia e la plasticità sinaptica (Wang et al., 2022; Davoli-Ferreira et al., 2021; D'Amato et al., 2020). Conseguentemente, comprendere come i batteri intestinali agiscono sul comportamento, soprattutto nel caso dell'ASD, è uno degli obiettivi principali. A tal proposito un approccio fondamentale potrebbe essere quello metabolomico. La segnalazione chimica è alla base della comunicazione tra intestino e cervello e la determinazione delle differenze nei profili metabolici, nonché lo studio dei loro effetti fisiologici, potrebbe rappresentare un passo importante per la comprensione della fisiopatologia dell'ASD e per lo sviluppo di terapie appropriate. Ad esempio, tramite analisi metabolomica condotta su topi colonizzati con il microbiota di individui affetti è stato possibile identificare metaboliti potenzialmente correlati all' ASD, tra cui l'acido 5-aminovalerico e la taurina. Entrambi questi composti presentano, infatti, proprietà agonistiche per il recettore GABA_A e la loro integrazione in topi autistici della linea BTBR ha dimostrato ridurre i comportamenti ripetitivi e i deficit sociali (Morais et al., 2021).

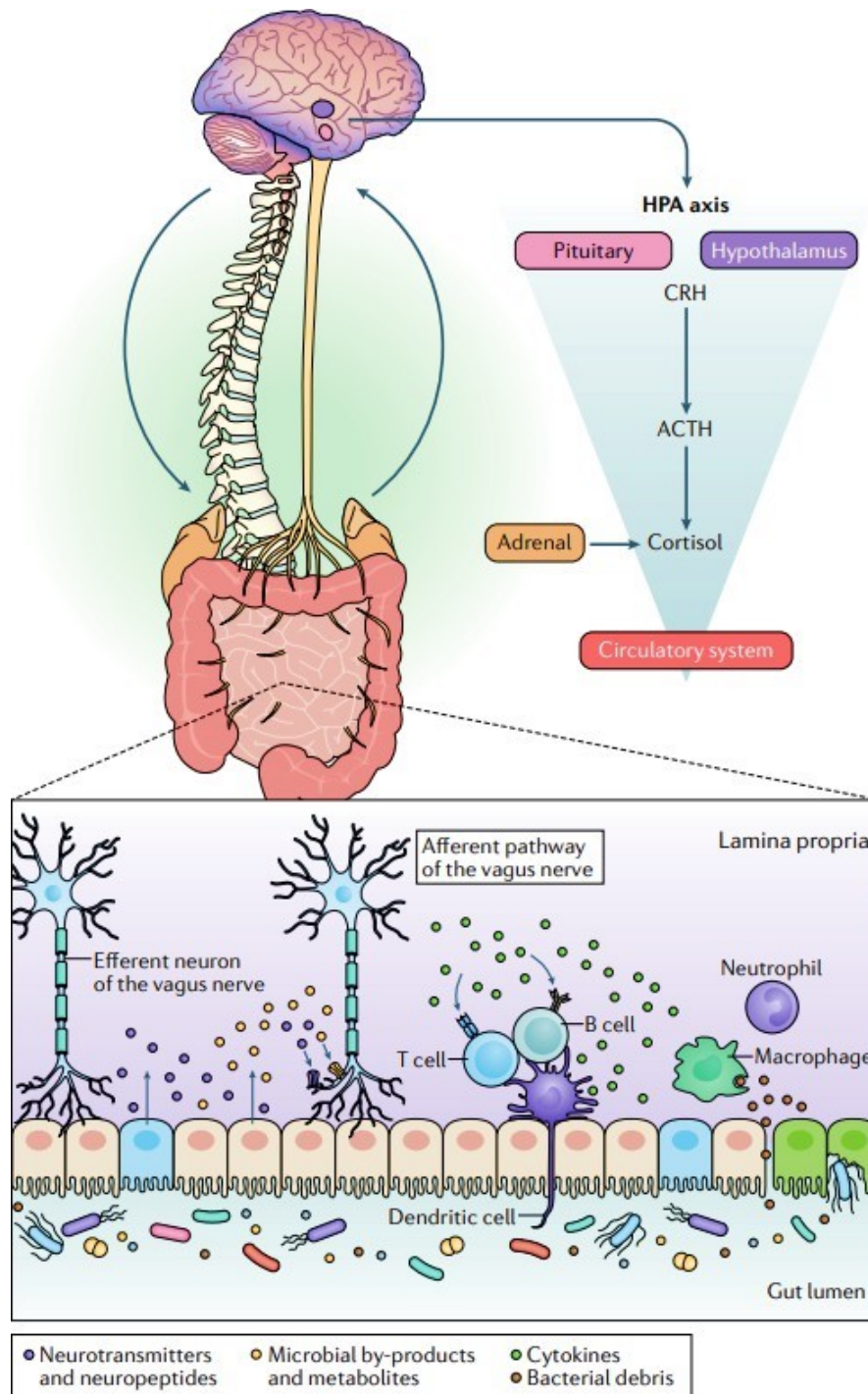


Fig.1.15. Comunicazione bidirezionale tra il microbiota intestinale e il sistema nervoso centrale attraverso l'asse intestino-cervello. Questa interazione coinvolge molteplici vie, tra cui il sistema nervoso autonomo, il sistema neuroendocrino e il sistema immunitario. Il microbiota intestinale può influenzare la produzione di composti neuroattivi nel tratto gastrointestinale, che possono a loro volta influenzare il sistema immunitario, il metabolismo, il cervello e la barriera intestinale. Inoltre, il microbiota può modulare l'ambiente intestinale e la sua composizione attraverso le vie neuronali (Modificato da Morais et al., 2021).

5. DIETA CHETOGENICA

Negli ultimi decenni, osservazioni epidemiologiche significative hanno messo in evidenza una connessione tra diete salutari e una riduzione del rischio di patologie del sistema nervoso centrale. Di conseguenza, la ricerca sugli effetti della dieta sul funzionamento cerebrale è diventata un campo di forte interesse (Mao et al., 2021). In effetti, l'assunzione adeguata di specifici nutrienti o gruppi alimentari ha dimostrato notevoli benefici per alcuni disturbi neurologici sia in studi preclinici che clinici (Nagpal et al., 2019; Hindiyeh et al., 2020; Jia et al., 2023). In aggiunta, l'intervento dietetico, rispetto ad altre strategie terapeutiche, ha il vantaggio di essere un approccio a costo inferiore ed è maggiormente accettato dal pubblico in quanto ritenuto meno invasivo e privo di effetti collaterali (Mao et al., 2021).

La dieta chetogenica (KD), inizialmente sviluppata per trattare l'epilessia e ora consolidata come approccio terapeutico, è un regime alimentare caratterizzato da un alto contenuto di grassi, una normale quantità di proteine e un basso contenuto di carboidrati che imita lo stato di digiuno (Barzegar et al., 2019). Nelle situazioni in cui è presente ossigeno, la principale fonte di energia cellulare deriva dal glucosio, il quale viene metabolizzato in piruvato attraverso il processo di glicolisi, seguito dall'ossidazione nei mitocondri tramite la fosforilazione ossidativa. Quando però il glucosio scarseggia, come ad esempio a seguito dell'assunzione di un pattern dietetico chetogenico, il corpo produce energia mediante il degrado degli acidi grassi e delle proteine, con la conseguente formazione di corpi chetonici come il 3-β-idrossibutirrato (BHB), l'acetoacetato e l'acetone. I corpi chetonici, principalmente prodotti all'interno del fegato, vengono quindi trasportati tramite il flusso sanguigno verso altri organi per soddisfare il fabbisogno energetico delle cellule in tutto il corpo, comprese quelle del cervello (Fig.1.16; Vidali et al., 2015). L'encefalo pur costituendo solo il 2% del nostro peso corporeo, è l'organo più energetico e sebbene il glucosio sia la sua fonte energetica preferita, i corpi chetonici possono coprirne il 60% del suo fabbisogno totale (Pietrzak et al., 2022).

Un crescente numero di ricerche ha dimostrato che la KD, attraverso cambiamenti nelle vie biochimiche, può avere un effetto positivo sulle funzioni cerebrali e può apportare benefici terapeutici non solo nell'epilessia ma in una vasta gamma di condizioni neurologiche (Pietrzak et al., 2022).

5.1 Metabolismo cerebrale dei corpi chetonici

Il trasporto dei corpi chetonici attraverso la barriera emato-encefalica richiede trasportatori specifici e, a differenza del glucosio, non è influenzato dall'attività neuronale, ma piuttosto è correlato alle concentrazioni circolanti. I trasportatori dei corpi chetonici sono i trasportatori monocarbossilati (MCT) di cui ne esistono diverse isoforme e la cui espressione varia tra i diversi tipi cellulari. Ad esempio, l'isoforma MCT1 è localizzata a livello della barriera emato-encefalica e su cellule gliali, che esprimono anche l'isoforma MCT4, mentre i neuroni esprimono principalmente l'isoforma MCT2 che è associata a strutture sinaptiche ricche di mitocondri, il che ne suggeriscono un ruolo nella trasmissione sinaptica. Pertanto, l'aumento della capacità di assorbimento dei corpi chetonici è correlato al livello di espressione degli MCT (Pérez-Escuredo et al., 2016). Una volta che il BHB e l'acetoacetato sono stati trasportati nel cervello, vengono convertiti nuovamente in acetil-CoA, il quale entra nel ciclo dell'acido citrico per generare ATP. La conversione avviene all'interno dei mitocondri, dove il BHB è trasformato in acetoacetato grazie all'azione reversibile della beta-idrossibutirrato deidrogenasi utilizzando NAD⁺ e successivamente formando NADH. L'acetoacetato viene poi catabolizzato in acetoacetil-CoA dalla succinil-CoA:3-chetoacido coenzima A transferasi (SCOT). I livelli di mRNA di SCOT sono rilevabili in tutti i tessuti umani, tranne il fegato che non è in grado di utilizzare i corpi chetonici come substrato energetico. L'acetoacetil-CoA viene quindi convertito nuovamente in due molecole di acetil-CoA pronte per entrare nel ciclo dell'acido citrico grazie all'azione reversibile della tiolasi (il primo enzima della chetogenesi). A differenza del glucosio, questa conversione di BHB e acetoacetato in una forma ossidabile non richiede ATP. Nel cervello in via di sviluppo dei roditori, i neuroni, gli astrociti e gli oligodendrociti sono tutti in grado di utilizzare i corpi chetonici per il metabolismo ossidativo a un ritmo molto più elevato rispetto al glucosio. Tuttavia, i neuroni e gli oligodendrociti sembrano essere più efficienti nell'ossidare i corpi chetonici rispetto agli astrociti (Jensen et al., 2020).

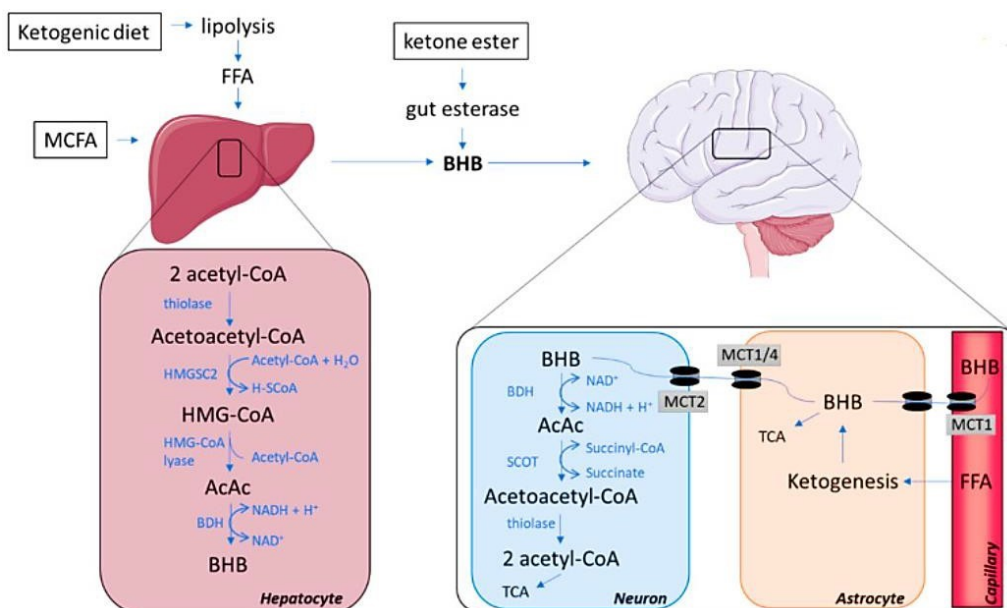


Fig.1.16. Percorsi coinvolti nella sintesi e catabolismo dei corpi chetonici. AcAc, acetacetato; Acetil-CoA, acetil coenzima A; BHB, beta-idrossibutirrato; BHD, beta-idrossibutirrato deidrogenasi; FFA, acidi grassi liberi; HMG-CoA, 3-idrossi-3-metilglutaryl-CoA; HMGSC2, 3-idrossi-3-metilglutaryl-CoA sintetasi 2; MCFA, acidi grassi a catena media; MCT, trasportatore monocarbossilico; SCOT, succinil-CoA:3-chetoacido Coenzima A transferasi; TCA, ciclo tricarbossilico (Modificato da Jensen et al., 2020).

5.2 Effetti neuroprotettivi della dieta chetogenica

La KD svolge ruoli neuroprotettivi nel sistema nervoso centrale attraverso l'inibizione della glicolisi e la produzione di corpi chetonici. La funzione neuroprotettiva dei corpi chetonici non è stata ancora ben compresa, ma si pensa che questa possa esplicitarsi su tre livelli, ovvero metabolico, di segnalazione ed epigenetico.

La KD agisce direttamente sul metabolismo cellulare, spingendo il cervello ad utilizzare i chetoni come principale fonte di energia. Questo cambiamento metabolico contribuisce a migliorare la funzione mitocondriale di neuroni e cellule gliali, riducendo la produzione di ROS e aumentando quella di ATP (Vidali et al., 2015). Uno studio recente in vitro ha suggerito che il BHB aumenta il potenziale di membrana mitocondriale, regola il rapporto tra NAD^+ e $NADH$ e influenza positivamente proteine coinvolte nella regolazione mitocondriale. Questi effetti contribuiscono a rendere i neuroni più resistenti allo stress energetico, migliorando la loro capacità di produrre energia in condizioni metabolicamente sfavorevoli. Inoltre, il BHB stimola l'autofagia e la pulizia delle

componenti cellulari danneggiate, ottimizzando la salute mitocondriale nei neuroni (Gómora-García et al., 2023).

A livello epigenetico, l'azione dei corpi chetonici può essere esplicata attraverso diverse vie. Il BHB ha dimostrato di inibire le istoni deacetilasi di classe I (HDAC), portando ad un aumento delle acetilazioni istoniche e alla trascrizione di geni associati alla resistenza per lo stress ossidativo, processo che potrebbe contribuire alla neuroprotezione fornita dalla KD (Shimazu et al., 2013). Inoltre, il BHB modifica direttamente le proteine istoniche attraverso la β -idrossibutirilazione e influisce su più di 1.300 proteine diverse, il che ne suggerisce un ruolo significativo nella regolazione epigenetica che però, soprattutto a livello del sistema nervoso centrale, deve essere ulteriormente esplorato (Huang et al. 2021).

LA KD è in grado di influire sulla segnalazione consentendo la rimozione efficiente del Glu dallo spazio intersinaptico da parte degli astrociti, e la sua conversione in glutammina e successivamente in GABA (Barry et al., 2018). I corpi chetonici hanno, inoltre, dimostrato di modulare la neurochimica del cervello, agendo sui recettori glutammatergici e GABAergici, oltre che sui canali ionici, inclusi quelli del Ca^{2+} (Zhu et al., 2019; Rogawski et al., 2016).

A seguito dei numerosi effetti dei corpi chetonici sulla neurofisiologia, l'interesse nella comunità scientifica per la KD è cresciuto. Diversi studi, sia clinici che preclinici, hanno dimostrato la capacità di questa dieta di migliorare la condizione di vari disturbi neurologici portando alla luce nuovi meccanismi d'azione (Fig.1.17; Dyńka et al., 2022). In un modello murino di Alzheimer, la KD ha consentito di migliorare le funzioni cognitive in associazione al ripristino sinaptico, sia nell'ippocampo che nella corteccia, e alla riduzione della deposizione della placca amiloide e dell'attivazione microgliale, con conseguente riduzione della neuroinfiammazione (Xu et al., 2022). Effetti comparabili sono stati osservati anche in un modello murino di Parkinson, dimostrando che la chetosi potrebbe ridurre l'infiammazione in questa patologia, attraverso vari meccanismi, tra cui l'inibizione dell'espressione genica di mediatori proinfiammatori e dell'assemblaggio di NLRP3, adattamenti epigenetici associati alla restrizione calorica e riduzione dei ROS (Zhu et al., 2022)

Un altro meccanismo, sempre più frequentemente riportato in letteratura, è l'effetto della KD sulla prevenzione e il trattamento delle malattie neurologiche attraverso una modifica del microbiota intestinale (Tao et al., 2022). Una esaustiva e recente revisione sistematica ha dimostrato che la KD aumenta i ceppi di *Bacteroides*, *Prevotella* e diminuisce i ceppi

di *Firmicutes* e di *Actinobacteria* nei pazienti affetti da epilessia, in associazione alla riduzione della frequenza e della gravità delle crisi epilettiche di oltre il 50% (Paoli et al., 2019). Parallelamente, in pazienti obesi con resistenza insulinica, la somministrazione di una KD ha comportato un aumento dei *Bacteroides* e una diminuzione dei *Firmicutes* insieme ad una significativa perdita di peso e miglioramenti nei parametri testati, come la riduzione della glicemia a digiuno, dell'insulina, della pressione sanguigna e delle lipoproteine a bassa densità (Basciani et al., 2020; Ang et al., 2020). Altri effetti di questa dieta sono stati registrati sul numero di *Lactobacilli* e *Akkermansia muciniphila*, batteri a cui sono state attribuite proprietà neuroprotettive (Santangelo et al., 2023).

La revisione della letteratura sul rapporto tra KD e ASD suggerisce risultati incoraggianti. La KD in modelli roditori di autismo ha dimostrato migliorare significativamente i deficit sociali e i comportamenti ripetitivi insieme al metabolismo mitocondriale, all'equilibrio eccitazione/inibizione e alla ristrutturazione del microbiota intestinale (Ahn et al., 2014 (Newell et al., 2016; Castro et al., 2017; Kin et al., 2022; Olivito et al., 2023). Mentre sugli umani la KD ha dimostrato di migliorare notevolmente le capacità cognitive e linguistiche, le abilità sociali e le stereotipie (El-Rashidy et al., 2017; Evangeliou et al., 2003; Frye et al., 2011). Più recentemente, un regime di KD privo di glutine e con il supplemento di olio di trigliceridi a catena media, somministrata a 15 bambini con ASD, ha migliorato in 3 mesi i comportamenti sociali, nonché altri comportamenti tipici di questa sindrome quali il contatto visivo, il linguaggio, la concentrazione e l'iperattività (Lee et al., 2018). Dunque, la KD ha fornito risultati incoraggianti nel contesto dell'ASD e ulteriori studi sono necessari al fine di chiarire i meccanismi che ne giustificano la sua azione positiva sulle aberrazioni comportamentali.

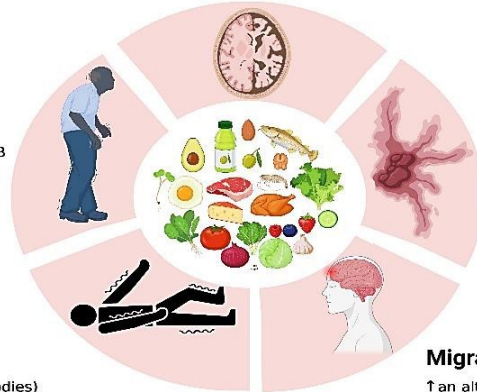
Ketogenic Diet in the Treatment of Neurological Diseases

Alzheimer's disease (AD)

- ↓ inflammation in the brain
- ↓ brain insulin resistance
- ↑ compensation of glucose deficiency in the brain
- ↓ deposition of amyloid plaques in the hippocampus
- ↓ activation of microglia

Parkinson's disease (PD)

- ↓ dopaminergic neurodegeneration
- ↓ mitochondrial deficit
- ↓ death of dopaminergic neurons
- ↑ modulation of the Akt/GSK-3β/CREB signaling pathway mediated by histone acetylation of the mGluR5 promoter region



Multiple sclerosis (MS)

- ↑ neuroprotective effect
- ↑ BDNF synthesis
- ↓ sNFL level
- ↓ ALOX5, COX1, COX2 expression
- ↑ neural regeneration

Epilepsy

- ↑ anticonvulsant effect (ketone bodies)
- ↑ ability of β -hydroxybutyrate to directly activate KCNQ2/3 channels
- ↓ levels of glutamate and pro-inflammatory cytokines
- ↓ glucose availability
- ↑ synthesis of the neurotransmitter GABA and adenosine A1
- ↓ AcAc inhibits voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCC) and reduces EPSC

Migraine

- ↑ an alternative source of energy for the brain
- ↑ influence on disturbed metabolism of brain cells

Fig.1.17 Effetti neuroprotettivi della KD in diversi disturbi neurologici (Dyńska et al., 2022).

***MATERIALI &
METODI***

Questo progetto di dottorato si compone di due parti principali: studio in vivo (Parte I) e studio in vitro (Parte II).

Nella I fase, è stato analizzato l'effetto indotto dalla somministrazione di una KD sul comportamento e su alcuni meccanismi fisiopatologici associati all' ASD (Parte I-A). Questa sezione include anche uno studio condotto in collaborazione con il Professore Sergueï Fetissov presso l'Università di Rouen (Francia), che ha consentito di approfondire la relazione tra microbiota intestinale e ASD (Parte I-B).

Nella II fase, è stata effettuata un'analisi in vitro in collaborazione con l'ITM-CNR (UNICAL), volta ad esplorare gli effetti della chetosi su specifiche popolazioni neuronali, offrendo una visione più mirata e controllata dei meccanismi cellulari coinvolti.

Il vantaggio di condurre entrambi i tipi di studi sta nel fatto che nella prima parte i risultati ottenuti riflettono l'interazione tra il sistema nervoso centrale e altri organi, mentre nella seconda parte le risposte registrate sono indipendenti da fattori esterni alle cellule nervose oggetto di studio, contribuendo così a una comprensione più completa degli effetti della chetosi nell' ASD.

1. Modello sperimentale: BTBR T+Itpr3tf/J (BTBR)

Date le difficoltà correlate all'ottenimento di campioni provenienti da pazienti autistici, l'utilizzo dei modelli animali che mimano le caratteristiche di questa sindrome, si configurano come una valida alternativa per studiare cambiamenti comportamentali e processi fisiopatologici, nonché fattori diagnostici e possibili terapie (Li et al., 2021). Ne consegue che la selezione di un modello animale affidabile per lo studio dell'ASD è di cruciale importanza e deve essere condotta attentamente in base agli obiettivi specifici di ricerca e ai risultati desiderati.

Un modello animale è in grado di riflettere meglio le malattie umane quanto più è efficace. L'efficacia viene stabilita sulla base di tre criteri, ovvero la validità di costrutto, di faccia e predittiva (Chadman, 2017). In primo luogo, la validità di costrutto richiede che il modello si conformi a una certa ipotesi teorica e che i cambiamenti fisiopatologici siano coerenti con essa. In secondo luogo, la validità di faccia impone che il modello simuli le caratteristiche tipiche della malattia in molti aspetti, come il comportamento. In terzo luogo, la validità predittiva implica che le risposte farmacologiche e non siano comparabili a quelle umane. Dato che attualmente non esiste alcun trattamento

farmacologico efficace per l'autismo, la validità predittiva nei modelli animali risulta ancora inconclusiva (Kazdoba et al., 2016). Tuttavia, è importante notare che ciò non esclude la possibilità che un modello animale di ASD possa contribuire all'identificazione di farmaci potenzialmente benefici per gli esseri umani.

Data l'eterogeneità dell'ASD, attualmente non esiste il modello migliore, ma diversi modelli la cui scelta si correla anche al tipo di studio che si vuole condurre. In questo progetto di dottorato la scelta è ricaduta su un modello roditore di autismo idiopatico, ovvero il BTBR T+Itpr3tf/J (BTBR) per i motivi di seguito riportati.

Il ceppo BTBR T+ Itpr3tf/J è un derivato del ceppo inbred BTBR (Black and Tan BRachyury) che porta mutazioni nel gene non agouti (responsabile del colore nero e fulvo), nel gene che codifica il recettore 3 dell'inositolo trifosfato (Itpr3tf), il quale è legato al fenotipo "tufted", e nel gene che codifica per la proteina brachiuro (T; <https://www.jax.org/strain/002282>). Inizialmente selezionato per studi sulla resistenza all'insulina, la nefropatia indotta dal diabete e la fenilchetonuria, il ceppo BTBR è successivamente emerso come un modello valido di autismo (Meyza et al., 2017; Fig.2.1). I topi BTBR mostrano una vasta gamma di comportamenti rilevanti per l'autismo con deficit estremamente consistenti e robusti, in vari aspetti sociali, e manifestazioni accentuate di vari comportamenti ripetitivi e stereotipati. I risultati ottenuti in correlazione allo stress e all'ansia supportano collettivamente l'idea che questi non siano alla base dei comportamenti anomali mostrati da questo ceppo (Meyza et al., 2017). Inoltre, deficit cognitivi e dell'attenzione, comorbilità ricorrenti dell'ASD, sono caratteristiche di questo modello di topo, che ne confermano ulteriormente l'utilità traslazionale per l'identificazione di endofenotipi che contribuiscono all'eziologia e alle patologie associate a questa sindrome (Careaga et al., 2015).

Le analogie dei BTBR con l' ASD ovviamente non si limitano al comportamento ma coinvolgono aberrazioni fisiopatologiche che, mimando l'eterogeneità e la complessità di questa sindrome negli umani, sono concettualmente rilevanti per la comprensione di questo disturbo e che comprendono ad esempio alterazioni neurochimiche, nella neurogenesi e di mielinizzazione, anomalie immunologiche e infiammazione, stress ossidativo e disturbi del microbiota intestinale (Meyza et al., 2017; Coretti et al., 2017; Zhang et al., 2019; Khanbabaei et al., 2019; Higuchi et al., 2023).

Di conseguenza, lo studio in tale modello delle risposte comportamentali e fisiologiche a trattamenti farmacologici e nutrizionali, risulta fondamentale non solo per la

comprensione dell'autismo, ma anche per l'identificazione di approcci terapeutici efficaci che potrebbero essere utili all'uomo.

Per fornire validità ai risultati ottenuti e per garantire una specificità al fenomeno studiato, è stato utilizzato come controllo un ceppo di topo inbred, il C57BL/6J (C57), che oltre a possedere una spiccata socialità, non presenta alterazioni comportamentali e aberrazioni fisiologiche che invece si riscontrano nei BTBR e nell'autismo (<https://animalab.eu/c57bl-6j-mouse-jax>).



Fig. 2.1 La validità del modello animale BTBR in breve. Le analogie dei BTBR con l'ASD comprendono anomalie comportamentali e aberrazioni fisiopatologiche che, mimando l'eterogeneità e la complessità di questa sindrome, contribuisce a una comprensione più completa e approfondita del disturbo. Inoltre, la valutazione delle risposte a trattamenti farmacologici e non in questo ceppo è utile sia per una maggiore comprensione dell'ASD che per l'identificazione di terapie utili all'uomo (immagine realizzata con Biorender.com).

2. PARTE I-A

2.1 Procedura sperimentale

Durante il periodo di stabulazione i topi BTBR e la controparte sociale, i topi C57 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), sono stati mantenuti e alloggiati in gabbie di plastica dalle dimensioni di 28 cm x 17 cm x 12 cm, con una temperatura costante di circa $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e un livello di umidità del 60%. L'illuminazione, gestita tramite cicli

automatici di 12 ore di luce e 12 ore di buio con inizio alle 7:30, è stata regolata mediante un sistema automatizzato.

Dopo una settimana di acclimatazione gli animali sono stati posti in coppie (maschio-femmina) al fine di consentirne l'accoppiamento e dare vita alla prole. A giorni alterni, è stato misurato il peso delle femmine per l'individuazione di quelle gravide, evitando l'utilizzo di metodiche invasive. Qualche giorno prima della fine della gravidanza, durata in media 20 giorni, i maschi sono stati separati dalle femmine al fine di evitare fenomeni di cannibalismo. La prole è stata mantenuta con la madre fino allo svezzamento, avvenuto al giorno postnatale (PND) 22 ± 1 . Dopo lo svezzamento, i topi di entrambi i ceppi sono stati raggruppati da 3 a 5 per gabbia e assegnati casualmente a una dieta controllata (CD, Dieta Globale Teklad 2019 - 9% di grassi, 19% di proteine, 44,9% di carboidrati; Envigo RMS, Udine, Italia) o a una KD (Dieta PF4390, 67,70% di grassi, 15,90% di proteine, 1% di carboidrati; Mucedola, Milano, Italia) per 5 settimane, seguendo un protocollo simile a quanto precedentemente utilizzato da altri (Qin et al., 2022). Dopo 5 settimane di trattamento, i topi appartenenti ad ogni gruppo sperimentale sono stati sacrificati e sono state effettuate le opportune analisi molecolari (Fig.2.2). Queste analisi hanno permesso di valutare i livelli nel plasma e/o nelle aree encefaliche corrispondenti a PCF e HIP di marker infiammatori (TNF- α , IL-6, IL-1 β) e di stress ossidativo (TBARS e SOD). Contestualmente, sono state impiegate tecniche di sequenziamento del DNA batterico, estratto dalle feci per l'analisi del microbiota intestinale.

La gestione degli animali e le procedure sperimentali sono state condotte nel rispetto delle disposizioni etiche per la cura e l'uso degli animali da laboratorio, come riportato nella legge legislativa n. 26 (04-03-2014), e sono state autorizzate dal Comitato Nazionale del Ministero della Salute italiano. Sono state adottate tutte le misure necessarie per minimizzare il disagio degli animali e ridurre al minimo il numero di esperimenti.

2.2 Analisi comportamentale

Alla fine di 4 settimane di trattamento, 8 topi per ciascun gruppo sono stati sottoposti a diversi test comportamentali che si sono protratti per una settimana, fino alla conclusione della somministrazione della dieta (Fig.2.2). I test sono stati condotti tra le 10 del mattino e le 5 del pomeriggio in una sala appositamente attrezzata per le analisi comportamentali. I test sono stati eseguiti secondo questa sequenza: Light Dark Test (LTD), Three Chamber

Test (TCT), Self-grooming Test e Novel Object Recognition Test (NOR). Durante tutte le sessioni di osservazione, le performance comportamentali sono state registrate mediante l'utilizzo di una telecamera aerea (SONY, DSC-W310), la quale ha seguito i movimenti di ciascun soggetto. Successivamente, le registrazioni sono state analizzate attraverso il software EthoLog (versione 2.2.5, Visual Basic, São Paulo, Brasile).

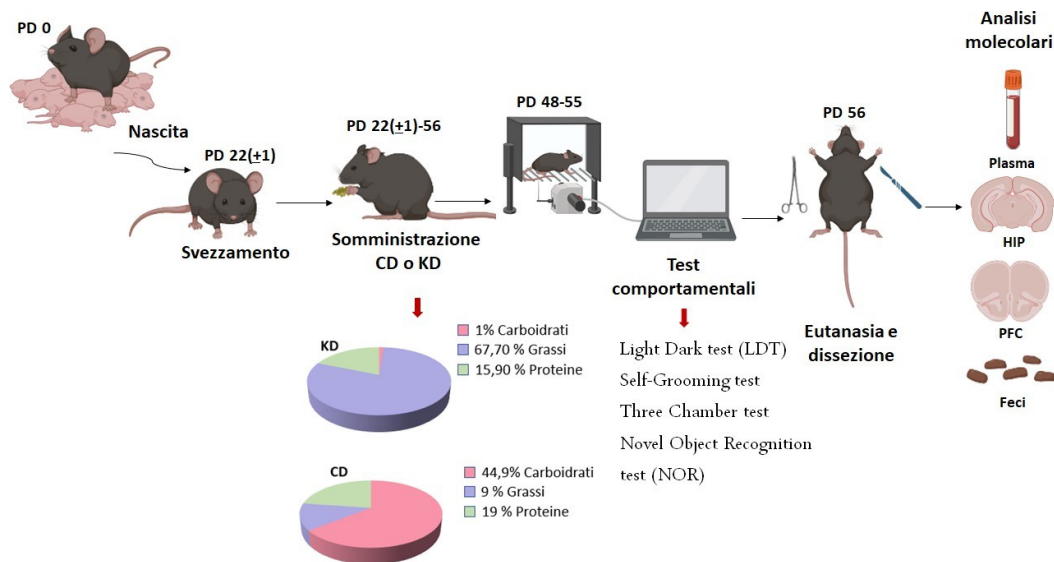


Fig.2.2 Procedura sperimentale. I topi BTBR e i C57 sono stati assegnati casualmente a una CD (9% grassi, 19% proteine, 44.9% carboidrati) o a una KD (67.70% grassi, 15.90% proteine, 1% carboidrati) per 5 settimane. Alla fine di 4 settimane di trattamento, i topi di ciascun gruppo sono stati sottoposti ai test comportamentali che si sono protratti per una settimana, fino alla conclusione della somministrazione della dieta. Dopo il trattamento di 5 settimane, i topi sono stati sacrificati e sono stati prelevati sangue, HIP e PFC. Inoltre, le variazioni nella composizione del microbiota sono state rilevate attraverso tecniche di sequenziamento del DNA, estratto dalle feci dei roditori (Immagine creata con Biorender.com).

2.2.1 Light Dark Test

Il LDT, ovvero il test di transizione luce/buio, si basa sulla propensione naturale dei roditori a permanere in aree più scure e sulla loro inclinazione a esplorare nuovi ambienti. Nel contesto del test, il conflitto tra la tendenza a esplorare e la tendenza a evitare ambienti non familiari e illuminati fornisce una valutazione del comportamento legato all'ansia (Arrant et al., 2013). Di conseguenza, il LDT è stato utilizzato per valutare gli effetti del trattamento sui livelli di ansia. L'apparato, costruito in plexiglass, è costituito da una scatola dotata di due compartimenti interconnessi da un'apertura (Fig.2.3): un primo ambiente composto da un piccolo e oscuro compartimento in plastica (16×16×16 cm), e

un secondo ambiente dotato di un ampio compartimento traslucido e illuminato (25×25×30 cm). Ciascun topo è stato posizionato nel compartimento illuminato, rivolto lontano dall'apertura, e gli è stato concesso di esplorare l'intero apparato per un periodo di 5 minuti.

Per l'analisi comportamentale sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- *Light permanence*: tempo, espresso in secondi, trascorso dall'animale nella camera luminosa dell'apparato.
- *Dark permanence*: tempo, espressi in secondi, trascorso dall'animale nella camera buia dell'apparato.
- *Latency to dark*: tempo, espresso in secondi, trascorso dall'inizio del test prima che l'animale raggiunga la camera buia.
- *Number of transitions*: numero di transizioni compiute dal roditore tra una camera e l'altra.

Al termine di ogni test, l'apparato è stato pulito con etanolo al 70%, al fine di rimuovere ogni traccia e l'odore residuo degli animali testati precedentemente.



Fig.2.3 LDT. Il test si basa sulla propensione naturale dei roditori a permanere in aree più scure e sulla loro inclinazione a esplorare ambienti nuovi. L'apparato, costruito in plexiglass, è costituito da una scatola dotata di due compartimenti, uno illuminato e l'altro buio, interconnessi da una piccola apertura (immagine creata con Biorender.com).

2.2.2 Three Chamber test

Gli individui di diverse specie manifestano comportamenti sociali, interagendo in modo cooperativo per migliorare le loro probabilità di sopravvivenza e di riproduzione. I topi, in particolare, hanno elevata propensione per l'interazione sociale, la cui valutazione

attraverso test specifici ha importanti implicazioni nello studio dell'ASD (Sato et al., 2023).

Il TCT (test delle tre camere), comunemente impiegato negli studi preclinici sull'autismo, nel contesto di questo progetto è stato utilizzato per valutare l'impatto della dieta e dei probiotici (Parte I-B) sul comportamento sociale nei topi. Questo test mira a quantificare la preferenza dell'animale per uno stimolo sociale e per uno non sociale, fornendo indicazioni sulla propensione del roditore a interagire e, quindi, a socializzare (Yang et al., 2011).

L'apparato del TCT è composto da tre camere identiche realizzate in plexiglas, ciascuna con dimensioni di 23 cm x 40 cm x 22 cm, interconnesse da piccole aperture circolari (diametro di 3,5 cm). L'esecuzione del test ha compreso 3 fasi:

- 1) *Habituation nella camera centrale* (Fig.2.4a): il roditore da testare, ovvero l'animale tester, è stato posto nella camera centrale e lasciato libero di esplorarla per 5 minuti. In questa fase all'animale tester è stato impedito l'accesso alle camere laterali che sono state ostruite adagiando e fissando, tramite opportuni supporti, delle sottili pareti di plastica per incoraggiarne l'esplorazione nella fase successiva.
- 2) *Habituation nell'intero apparato* (Fig.2.4b): all'animale tester è stato concesso di esplorare per 10 minuti l'intero apparato, incluse le camere laterali, per consentirne l'adattamento al nuovo ambiente.
- 3) *Sociability* (Fig.2.4c): all'animale tester è stato concesso di esplorare per 10 minuti l'intero apparato in cui uno *stranger* (un topo della stessa età e dello stesso sesso dell'animale tester con cui non ha mai interagito) è stato posizionato sotto una gabbietta, collocata casualmente nella camera di sinistra o destra, mentre un'altra gabbia vuota identica (*novel object*), è stata posizionata sul lato opposto.

La propensione dell'animale a socializzare è stata quantificata attraverso l'analisi del tempo trascorso dall'animale tester in ciascuna camera (chamber time) e quello dedicato all'esplorazione dello stranger o del novel object. In particolare, il comportamento di esplorazione, indicato come exploring time, è stato definito come il tempo speso dall'animale tester ad annusare o toccare ciascuna gabbietta, mantenendo una distanza inferiore a 2 cm dal suo muso. Inoltre, per una comparazione tra i vari gruppi sperimentali è stato calcolato il social index (SI) secondo la seguente formula:

$$SI = \frac{\text{time exploring stranger} - \text{time exploring novel object}}{\text{time exploring stranger} + \text{time exploring novel object}}$$

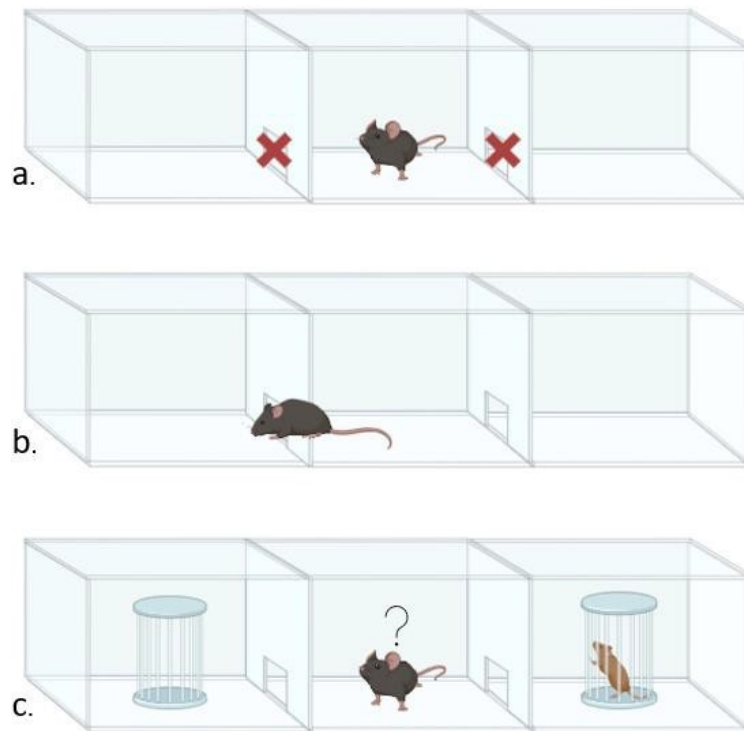


Fig.2.4 Le varie fasi del Three Chamber Test. **a)** *Habituation nella camera centrale*: il roditore è lasciato libero di esplorare solo la camera centrale per 5 minuti. **b)** *Habituation nell'intero apparato*: il roditore è lasciato libero di esplorare per 10 minuti l'intero apparato, incluse le camere laterali. **c)** *Sociability*: due gabbiette, una vuota e l'altra con lo stranger sono posizionate ognuna in una delle due camere laterali. La quantificazione, in quest'ultima fase, della preferenza dell'animale per lo stranger e per il novel object, fornisce indicazioni sulle capacità sociali del roditore (Immagine creata con Biorender.com)

2.2.3 Self Grooming Test

Nell' ASD si riscontra una gamma di comportamenti ripetitivi che possono differire notevolmente da un paziente all'altro. Nonostante non esistano criteri specifici che ne definiscano le diverse categorie, un comportamento per poter essere considerato ripetitivo deve manifestarsi con un tasso relativamente elevato e con modalità costante e invariata. Analogamente ai pazienti umani, i modelli murini di autismo mostrano diversi tipi di comportamenti stereotipati e ripetitivi, e fra questi il Self-Grooming è quello più frequentemente saggiato (Kim et., 2016).

Il Self-Grooming Test è un paradigma comportamentale che nei roditori consente di verificare se il comportamento di auto-toilettatura è ripetuto con una frequenza e una durata più elevate (Silverman et al., 2010). L'esecuzione del Self-Grooming Test è avvenuta collocando ciascun topo da testare in una gabbia di plastica pulita, vuota

(33×15×13 cm) e priva di lettiera (Fig.2.5). Dopo un periodo di habituation di 10 minuti, il tempo cumulativo trascorso dal roditore nell'attività di Self-Grooming è stato analizzato e quantificato per altri 10 minuti mediante l'utilizzo di un cronometro.

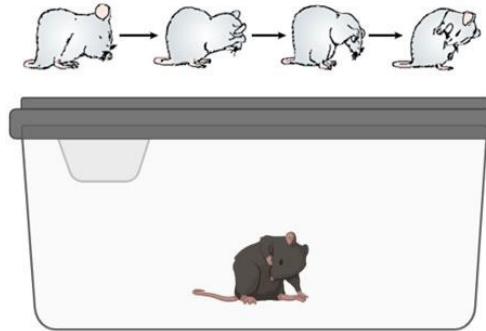


Fig.2.5 Il Self-Grooming Test. Durante l'esecuzione del test ciascun topo da testare viene posto in una gabbia di plastica pulita, vuota e priva di lettiera. L'attività di Self-Grooming nei roditori avviene secondo una serie di movimenti che includono il leccarsi la pelliccia, usando di tanto in tanto le zampe anteriori e passandole sul naso con una serie di brevi movimenti orizzontali (immagine creata con Biorender.com).

2.2.4 Novel Object Recognition Test

L'analisi della capacità di un roditore di riconoscere, come familiare, un oggetto precedentemente esplorato rispetto ad un oggetto con il quale non ha mai interagito ne consente di valutare le capacità cognitive e in particolare la memoria di riconoscimento. Questo principio è alla base nel NOR che, sfruttando la naturale e spontanea preferenza dei roditori a esplorare la novità, e quindi ad interagire maggiormente con un oggetto nuovo piuttosto che un oggetto familiare (Lueptow, 2017), è stato utilizzato per valutare la memoria nei topi di ciascun gruppo sperimentale.

L'esecuzione di questo test ha previsto tre fasi distinte, distribuite in due giorni. Il primo giorno per 10 minuti ciascun topo è stato abituato individualmente all'apparato, costituito da una gabbia di polycarbonato vuota (50×50×30 cm; Fig.2.6a). Il giorno successivo, il topo è stato introdotto nell'arena con la testa posizionata di fronte a due blocchi cilindrici identici (8 cm di altezza × 2 cm di diametro), indicati come oggetti familiari, e gli è stato permesso di esplorarli per 10 minuti (Fig.2.7b). Dopo un'ora, il topo è stato reinserto nell'arena ed è stato lasciato libero di esplorare per 5 minuti un oggetto familiare e uno

nuovo, rappresentato da un blocco rettangolare (8×2.5×2 cm; Fig.2.7c). L'esplorazione è stata definita tale, quando il topo avvicinava il muso all'oggetto a una distanza inferiore o uguale a 2 cm (Antunes e Bala., 2012). L'atto di sedersi sull'oggetto non è stato considerato come indice di esplorazione (Lueptow, 2017).

La capacità di riconoscimento è stata calcolata mediante un indice di discriminazione (DI), utilizzando il tempo trascorso dal roditore ad esplorare l'oggetto nuovo (*time exploring novel object*) e quello familiare (*time exploring familiar object*), secondo la seguente formula:

$$DI = \frac{\text{time exploring novel object} - \text{time exploring familiar object}}{\text{time exploring novel object} + \text{time exploring familiar object}}$$

Una maggiore esplorazione dell'oggetto familiare, e quindi un $DI < 1$, indica deficit cognitivi.

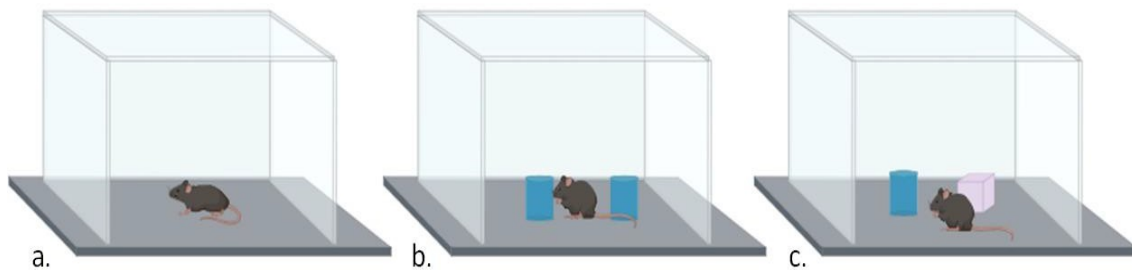


Fig. 2.6 Novel Object Recognition Test. a) Il primo giorno ciascun topo da testare è stato abituato individualmente all'apparato vuoto per 10 minuti. b) Il giorno successivo, il topo è stato introdotto nell'arena con la testa posizionata di fronte a due blocchi cilindrici identici, indicati come oggetti familiari e gli è stato permesso di esplorarli per 10 minuti. c) Dopo un'ora, il topo è stato reintrodotto nell'arena ed è stato lasciato libero di esplorare per 5 minuti un oggetto familiare e uno nuovo, rappresentato da un blocco rettangolare. La misura del tempo trascorso dal roditore ad esplorare l'oggetto nuovo, rispetto a quello familiare, consente di valutare le sue capacità cognitive (Immagine creata con Biorender.com).

2.3 Analisi citochine pro-infiammatorie

Dopo 5 settimane di trattamento, i topi di ogni gruppo sperimentale sono stati sacrificati per ottenere i campioni di plasma e il tessuto cerebrale di interesse. Il sangue, ottenuto mediante puntura cardiaca, è stato centrifugato a 12500 giri/min per 15 minuti a 4°C e successivamente raccolto in tubi eparinizzati, conservati a -20°C in attesa dell'analisi immunologica. I cervelli, una volta rimossi, sono stati dissezionati nelle regioni della PFC

e dell'HIP. Le regioni cerebrali di riferimento, destinate all'analisi delle citochine proinfiammatorie (n=6/gruppo), sono state poi omogeneizzate in un tampone di lisi (150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,5% di deossicolato di sodio, 0,1% SDS, più 1% di nonilfenolo P-40) e centrifugate a 12500 giri/min a 4° C per 30 minuti. Dopo la centrifugazione, il surnatante raccolto è stato congelato a -80° C in attesa del successivo utilizzo.

La determinazione quantitativa delle concentrazioni di TNF- α , IL-6 e IL-1 β nelle aree cerebrali di interesse e nel plasma è avvenuta mediante l'impiego della tecnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) utilizzando un "Mouse TNF alpha ELISA Kit" (Cat. # MBS825075; MyBioSource, San Diego, USA), un "Mouse IL-1 β ELISA kit" (RAB0275) e un "Mouse IL-6 ELISA kit" (RAB0309; Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA). In breve, i campioni processati secondo le istruzioni fornite dai kit ELISA di riferimento sono stati aggiunti in duplicato nei pozzetti contenenti gli anticorpi per le citochine di interesse. Successivamente, sono stati addizionati complessi anticorpo-streptavidina-HRP specifici e l'assorbanza è stata misurata utilizzando un lettore di micropiastre (Multiskan™SkyHigh, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Le concentrazioni delle citochine (pg/mL) sono state ottenute per interpolazione sulla curva standard, allestita con quantità note crescenti di standard di riferimento.

2.4 Analisi marcatori di stress ossidativo

2.4.1 Dosaggio delle Sostanze Reattive all'Acido Tiobarbiturico

A causa della capacità dell'acido tiobarbiturico di reagire con i prodotti della perossidazione lipidica (in particolare il malondialdeide) che si accumulano durante condizioni stressanti, la generazione di perossidi lipidici nella PFC e nell'HIP (n=6/gruppo) è stata analizzata mediante il dosaggio TBARS, come descritto in precedenza (Pasqua et al., 2020; Rocca et al., 2022). In breve, dopo l'omogeneizzazione dei tessuti in KCl allo 0,9% (pH 7,4) (10% w/v), un'aliquota di 2 ml di ciascun campione è stata miscelata con 1 mL di acido tricloroacetico al 40% (w/v) (TCA) e 1 mL di acido tiobarbiturico al 2% (w/v) (TBA). La miscela del reagente TBA è stata inoltre integrata con idrossitoluene butilato al 2% (w/v) per prevenire la perossidazione lipidica artificiale durante il dosaggio. La miscela è stata quindi riscaldata a 100 °C per 15 minuti, sono stati aggiunti 2 mL di TCA al 70% (w/v) e i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a

3500 rpm. La concentrazione di TBARS è stata stimata spettrofotometricamente con Multiskan™ SkyHigh (Thermo Fisher Scientific Inc., Milano, Italia) a 523 nm ed espressa in nmol/g di tessuto.

2.4.2 Dosaggio della superossido dismutasi

L'attività della superossido dismutasi (SOD), un altro indicatore di stress ossidativo, è stata analizzata nell'HIP e nel PFC (n=6/gruppo) misurando l'inibizione dell'auto-ossidazione del pirogallolo mediante il dosaggio spettrofotometrico (Rocca et al., 2022). Dopo l'omogeneizzazione in un tampone contenente 50 mM di Tris HCl (pH 8,2) e 1 mM di etilendiamminotetraacetato, i tessuti sono stati sottoposti a centrifugazione (20 min a 20.000 g). I sovrinatanti così ottenuti sono stati utilizzati per valutare l'attività della SOD con l'avvio della reazione mediante l'aggiunta di 0,2 mM di pirogallolo e il monitoraggio della sua auto-ossidazione a 420 nm, per 3 minuti, mediante uno spettrofotometro Multiskan™ SkyHigh (Thermo Fisher Scientific Inc., Milano, Italia). L'attività della SOD nei tessuti dell'HIP e del PFC è stata normalizzata in base ai livelli totali di proteine del campione, quantificate utilizzando l'albumina sierica bovina come standard, ed è stata espressa in unità per mg di proteina, considerando che 1 U di SOD corrisponde alla quantità di enzima capace di inibire la velocità di auto-ossidazione del pirogallolo del 50%.

2.5 Analisi del Microbiota

I campioni fecali (n=6/gruppo) sono stati raccolti in contenitori di plastica sterili e successivamente congelati a -80 °C fino all'analisi. Per l'estrazione del DNA, i campioni sono stati omogeneizzati e processati seguendo il protocollo del kit QIAamp DNA Stool Mini (QIAGEN, Barcellona, Spagna) con una modifica data dall'aggiunta del tampone di lisi e un'incubazione a 95 °C anziché a 70 °C, per garantire la lisi sia di batteri Gram-positivi che Gram-negativi. La quantificazione del DNA è stata effettuata con uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, DE, USA), misurando i rapporti di assorbanza per il contenuto di sale, fenolo e contaminazione proteica a A260/280 nm e A260/230 nm.

Il DNA estratto è stato amplificato mediante PCR, utilizzando le seguenti coppie di primer 16S miranti le regioni ipervariabili V3 e V4 del gene 16S rRNA batterico (Herlemann et al., 2013):

16S Amplicon PCR Forward Primer:

50TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicon PCR Reverse Primer:

50GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTA TCTAATCC

Tutte le PCR sono state eseguite in volumi di reazione da 25 μ L contenenti 12,5 μ L di 2X KAPA HiFi Hotstart ready mix (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA), 5 μ L di ciascun primer forward e reverse (1 μ M) più 2,5 μ L di DNA estratto (10 ng), seguendo condizioni cicliche specificate. Il clean-up della PCR è stato eseguito con perline AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) per purificare l'amplicone 16S V3 e V4 da primers liberi e dimeri di primers.

Successivamente, è stata effettuata la determinazione dell'indice PCR aggiungendo indici doppi e adattatori di sequenziamento Illumina con il kit Nextera XT Index (Illumina, San Diego, CA, USA). Il pool dei prodotti della PCR è stato nuovamente purificato con perline AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) prima della quantificazione. Gli ampliconi risultanti sono stati sequenziati su MiSeq (Illumina, USA), utilizzando il sistema di sequenziamento Illumina MiSeq (2x300nt).

Per la valutazione della qualità delle letture grezze, è stato utilizzato Galaxy (Schloss et al., 2009), insieme allo strumento Mothur. Le letture sono state assemblate e filtrate in base alla lunghezza, mantenendo solo quelle comprese tra 250 bp e 550 bp. Il processo di elaborazione dei dati tramite MG-input RAST ha coinvolto diverse fasi, tra cui demultiplexing, filtraggio della qualità, filtraggio della lunghezza, dereplicazione e rimozione delle sequenze di organismi modello. I dettagli dei dati e le impostazioni di pre-elaborazione hanno incluso un ritaglio dinamico delle sequenze FASTQ, basato sul punteggio di qualità Phred.

Le relative abbondanze ai livelli tassonomici di Phylum, Famiglia e Genere sono state fornite per i dati microbiologici grezzi. La diversità della comunità microbica, sia α che

β , è stata esaminata per tutti i gruppi sperimentali, calcolando l'abbondanza relativa osservata di ciascun taxon mediante il conteggio delle letture.

2.6 Analisi Statistica

Tutti i dati sono espressi come media \pm errore standard della media (s.e.m.) e sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 8. Per il TCT, il test t di Student è stato utilizzato per confrontare sia il tempo di permanenza che di esplorazione per lo stranger e il novel object, per ciascun gruppo sperimentale. Per i restanti parametri comportamentali e molecolari è stata condotta un'Analisi della Varianza (ANOVA) a due vie utilizzando la correzione di Bonferroni per confrontare due variabili quando $p < 0.05$. Nell'analisi del microbiota, le letture dell'intero processo degli ampliconi (file fastq) sono state importate tramite Quantitative Insights into Microbial Ecology 2 (QIIME 2.0) versione 2021.4.0. Le letture grezze sono state pre-processate con l'approccio Cutadapt, come precedentemente descritto (Kechin et al., 2017). Le paired-end reads sono state demultiplexate e sono state create tabelle caratteristiche, utilizzando l'algoritmo di Denoising Amplicon Divisivo che include filtraggio e rifilatura della qualità delle letture, stima del tasso di errore, dereplicazione, fusione delle letture più rilevanti e rilevamento delle chimere. L'assegnazione tassonomica è stata ottenuta utilizzando sequenze estrapolate (OTU al 99%) dal database Silva versione 138 tramite il plugin QIIME 2 q2-feature-classifier. Per visualizzare la composizione del microbiota, sono state create rappresentazioni grafiche a barre impilate con ggplot2. L' α -diversità del microbiota è stata stimata utilizzando la diversità di Shannon del pacchetto phyloseq. La β -diversità è stata generata in R con il pacchetto vegan (2.6.0), utilizzando la distanza di Bray-Curtis. Le significatività statistiche tra i gruppi sono state determinate applicando l'Analisi delle Varianze Multivariate Permutazionale (PERMANOVA), tramite la funzione Adonis del pacchetto vegan di R. Anche in questa fase, i valori di p sono stati corretti per il confronto multiplo, applicando le indicazioni appropriate utilizzate per confrontare due variabili quando $p < 0.05$. Per tutte le comparazioni statistiche, il livello di significatività è stato fissato a * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

3. PARTE I-B

3.1 Procedura sperimentale

Topi BTBR, acquistati dai laboratori Charles Rivers, Francia, sono stati stabulati presso il Dipartimento di Risorse Biologiche dell'Università di Rouen, ad una temperatura di circa 22 ± 2 °C, umidità del 60% e con cicli di 12h luce/buio (luce alle 8:30) controllati da un sistema automatizzato. Dopo una settimana di acclimatazione gli animali sono stati posti in coppie (maschio-femmina) al fine di permetterne l'accoppiamento e dare vita alla prole, consentendo la formazione e il mantenimento di una colonia. Topi BTBR di 7-8 settimane all'interno della colonia sono stati poi selezionati nel contesto del presente studio e assegnati ad uno dei gruppi sperimentali (n=8/9 per gruppo). In dettaglio, la procedura sperimentale ha previsto per motivi logistici due fasi consecutive (A e B) distanziate da un intervallo di 2 settimane l'una dall'altra, durante le quali i topi, in relazione al gruppo di appartenenza, hanno ricevuto 5 giorni a settimana per 5 settimane, tramite gavage intragastrico, uno dei ceppi di *Lactobacillus* (Strain # L1. *L. salivarius* - LS7892; Strain # L2. *L. gasseri* - LG6410; Strain # L3. *L. plantarum* - LP14D; Strain # L4. *L. reuteri* -LR92; Strain # L5. *L. camelliae* - LC LMG 24277), o la sola soluzione fisiologica allo 0,9%. Dopo 3 settimane di somministrazione è stato condotto lo studio del comportamento sociale dei topi mediante il TCT, mentre l'ansia e la locomozione sono state valutate tramite l'Open Field (OF) e l'Elevated Plus Maze (EPM). Il giorno successivo all'ultima valutazione comportamentale, i topi sono stati sacrificati mediante decapitazione e i campioni di sangue raccolti sono stati poi utilizzati per il dosaggio periferico delle immunoglobuline (Ig) reattive per l'ossitocina e dell'ossitocina stessa.

3.2 Trattamento

I ceppi *L. salivarius* - LS7892 (L1), *L. gasseri* - LG6410 (L2), *L. plantarum* - LP14D (L3), e *L. reuteri* -LR92 (L4) sono stati forniti TargEDys SA, mentre *L. camelliae* - LC LMG 24277 (L5) è stato coltivato prima dell'uso (vedi paragrafo successivo "Coltura batterica"). I probiotici sono stati diluiti con soluzione fisiologica allo 0,9 % per raggiungere una concentrazione di 1×10^{10} CFU/mL e somministrati ai topi in un volume pari a 400 ul. Ai topi di controllo sono stati somministrati 400 ul di soluzione fisiologica allo 0.9%.

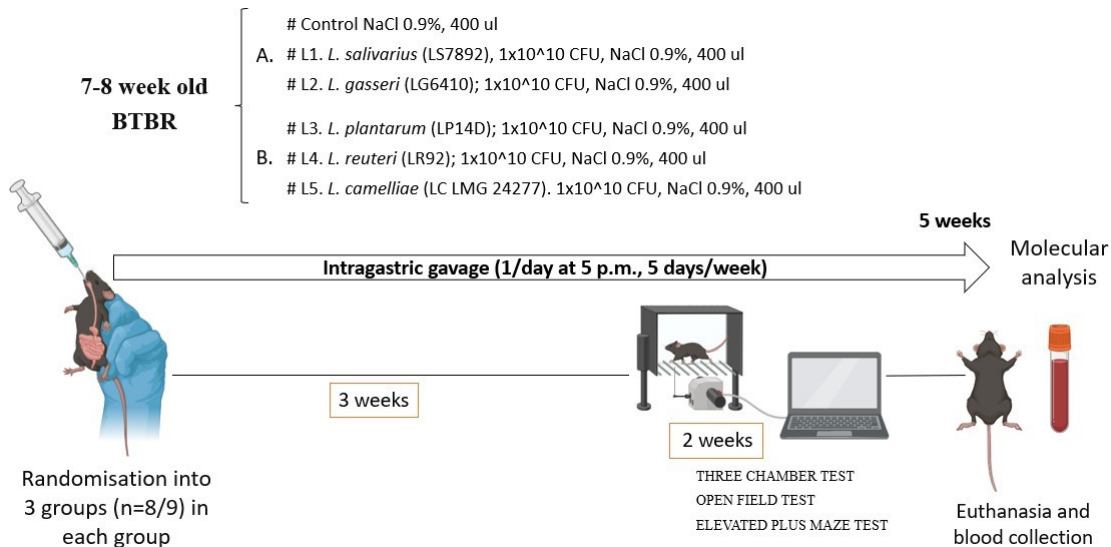


Fig. 2.7 Disegno sperimentale. Topi BTBR di 7-8 settimane sono stati assegnati ad uno dei gruppi sperimentali (n=8/9 per gruppo). Lo studio ha coinvolto due fasi (A e B), ciascuna della durata di 5 settimane, durante le quali i topi hanno ricevuto i 5 ceppi di *Lactobacillus* o una soluzione salina tramite gavage intragastrico. Nelle restanti 2 settimane di trattamento, i topi sono stati sottoposti a test comportamentali per valutare la socialità e l'ansia. Il giorno successivo all'ultima valutazione comportamentale, i topi sono stati sacrificati e i campioni di sangue raccolti sono stati poi processati per il dosaggio dell'ossitocina e delle Ig ossitocina-reattive (Immagine creata con Biorender.com).

3.2.1 Coltura batterica

Il ceppo L5 è stato coltivato per una notte in 50 mL di terreno di coltura De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco) a 37°C, mantenendo il liquido in costante movimento a 140 giri al minuto (rpm). Successivamente, la coltura risultante è stata diluita a un'assorbanza ottica di 600 nm pari a 0,01 OD (circa 2.10^6 CFU/mL) in 200 mL di MRS e incubata per 24 ore. La coltura è stata poi sottoposta a una prima centrifugazione a 5000 rpm a 4 °C per 30 minuti. I pellet ottenuti sono stati mescolati in 10 mL di soluzione tampone salino (PBS), uniti e centrifugati a 5000 rpm a 4 °C per 30 minuti. Successivamente, sono seguite nuove risospensioni in PBS e centrifugazioni a 5000 rpm a 4 °C per 30 minuti. Infine, il pellet è stato raccolto e conservato a una temperatura di -80 °C fino al processo di liofilizzazione (Fig. 2.8).

3.3 Analisi comportamentale

Alla fine delle 3 settimane di trattamento, tempo necessario per indurre la risposta anticorpale IgG, i topi di ciascun gruppo sono stati sottoposti a diversi test comportamentali che si sono protratti per due settimane, fino alla conclusione della somministrazione dei probiotici. I test sono stati condotti tra le 9 del mattino e le 5 del pomeriggio in una sala appositamente attrezzata per le analisi comportamentali. I test sono stati eseguiti secondo questa sequenza: TCT, OF ed EPM. Durante tutte le sessioni di osservazione, le performance comportamentali sono state registrate mediante l'utilizzo di una telecamera collegata ad un computer e sono state analizzate attraverso il software Anymaze (Stoelting Co., Wood Dale, USA).

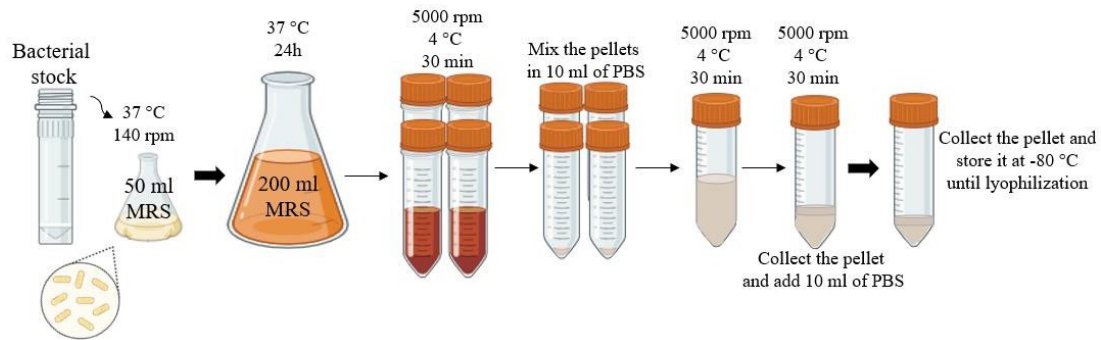


Fig.2.8 Coltivazione del ceppo L5 in terreno MRS seguita da diluizioni, centrifugazioni e conservazione a -80 °C prima della liofilizzazione (Immagine creata con Biorender.com).

3.3.1 Three Chamber test

Il TCT è stato utilizzato per valutare l'effetto della somministrazione dei probiotici sul comportamento sociale nei BTBR. Come precedentemente illustrato (per maggiori dettagli consultare il paragrafo 2.2.2), il test è stato suddiviso in tre sessioni consecutive: **Fase I:** habituation nella camera centrale per 5 minuti. **Fase II:** habituation all'intero apparato per 10 minuti. **Fase III:** al topo è stato concesso di esplorare l'intero apparato per 10 minuti, che comprendeva uno stimolo sociale (stranger) in una camera laterale e uno non sociale (novel object) nell'altra camera laterale. La propensione dell'animale a socializzare è stata quantificata attraverso l'analisi del tempo trascorso dall'animale tester in ciascuna camera (chamber time) e quello dedicato all'esplorazione dello stranger o del novel object.

3.3.2 Open Field Test

Uno dei test più popolari per la sua facilità di esecuzione e per la possibilità di analizzare diversi aspetti comportamentali nei roditori è l'OF.

L'OF si basa sulla propensione naturale dei roditori a permanere in aree più coperte e sulla loro inclinazione a esplorare nuovi ambienti. Nel contesto del test, e in maniera simile al LDT, il conflitto tra la tendenza a esplorare e la tendenza a evitare ambienti non familiari e aperti consente una valutazione del comportamento legato all'ansia (Kraeuter et al., 2019). L'apparato utilizzato in questo esperimento consisteva in un contenitore cilindrico con diametro di 40 cm (Fig.2.9). Ciascun topo è stato posizionato al centro dell'arena circolare e gli è stato permesso di esplorare liberamente l'intero apparato per 20 minuti. La determinazione del tempo trascorso nella zona centrale, rispetto a quello trascorso nella zona periferica, è stata utilizzata per valutare l'effetto dei probiotici sui livelli di ansia, mentre la quantificazione della distanza percorsa e del tempo di immobilità ha fornito informazioni su eventuali modifiche, indotte dai trattamenti, sulla locomozione. In aggiunta, l'analisi del tempo trascorso dai roditori nell'attività di Self-Grooming è stata misurata manualmente utilizzando i video registrati e mantenendo l'anonimato rispetto ai diversi gruppi sperimentali.

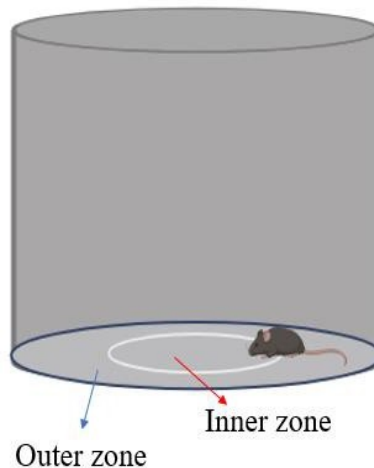


Fig. 2.9 Open Field Test. L'area di test è costituita da un'arena circolare di PVC (polivinilcloruro) di 40 cm di diametro, con pareti laterali alte 30 cm, che presenta al suo interno suddivisioni tracciate con delle linee bianche sul pavimento, non distinguibili dai topi. In questo modo, sono state ricavate una zona interna (inner zone) e una periferica (outer zone; Immagine creata con Biorender.com).

3.3.3 Elevated Plus Maze test

Per ottenere una visione più approfondita e completa dell'effetto dei probiotici sul comportamento legato all'ansia è stato condotto un ulteriore test, ovvero, EPM.

L'apparato dell'EPM consiste in quattro bracci elevati che si irradiano da una piattaforma centrale, formando una figura a croce. Due dei bracci opposti sono chiusi lateralmente da pareti, mentre i restanti sono completamente aperti (Fig.2.10). Durante l'esecuzione del test, il topo è stato posizionato nell'area centrale e gli è stato permesso di esplorare l'intero apparato per un periodo di tempo pari a 5 minuti. La valutazione dei comportamenti simil-ansiosi è stata effettuata considerando sia la quantità di tempo trascorsa che il numero di ingressi nei bracci chiusi, rispetto a quelli aperti. I roditori, infatti, mostrano una naturale tendenza ad evitare luoghi aperti ed elevati, ma al contempo sono dotati di un'innata curiosità nell'esplorare aree nuove. Per cui, gli animali più ansiosi tenderanno a evitare le zone aperte e preferiranno rimanere in quelle chiuse e sicure (Fig. 2.10; Kraeuter et al., 2019).

3.4 Analisi molecolari

Il sangue prelevato mediante decapitazione dai topi di ciascun gruppo sperimentale (n=9/8 per gruppo) è stato sottoposto a centrifugazione a 12500 giri/min per 15 minuti a 4°C. Successivamente, il plasma è stato separato e raccolto in tubi eparinizzati che sono stati conservati a -20°C in attesa di essere utilizzato per l'analisi immunologica volta a rilevare i livelli di ossitocina e la presenza di Ig reattive a questo peptide.

3.4.1 Analisi delle immunoglobuline reattive per l'ossitocina

Il sistema immunitario produce una quantità enorme di Ig, le quali svolgono varie funzioni di difesa. Alcune di queste sono fondamentali nella protezione contro patogeni, nell'autoimmunità e nel cancro, mentre altre regolano la trasmissione chimica. I neuropeptidi, quali l'ossitocina, possono, infatti, essere soggetti a reazioni autoanticorpali che alterano la loro segnalazione, influenzando così la neurofisiologia (Fetissov, 2011).

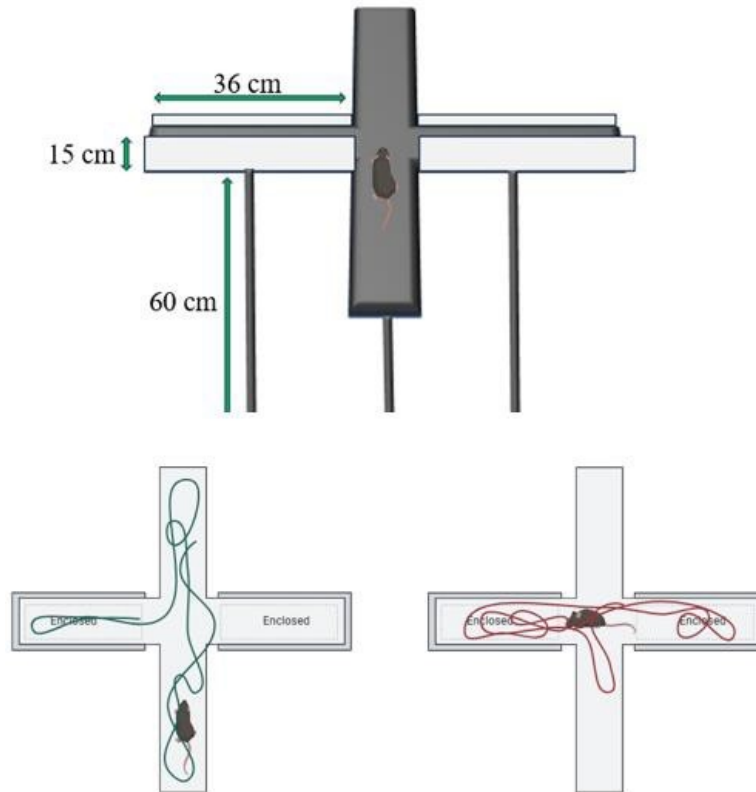


Fig.2.10 Elevated Plus Maze Test. Il test si basa su due tendenze innate e contrastanti: la naturale curiosità ad esplorare un ambiente nuovo e la tendenza ad evitare spazi aperti ed elevati, situazioni che costituiscono un rischio per il predatore. L'apparato è costituito da quattro bracci di dimensioni uguali (16 cm), di cui due sono aperti e due sono chiusi da pareti (altezza 15 cm), sospesi dal suolo a un'altezza di 60 cm. Il tempo trascorso ad esplorare i bracci chiusi rispetto a quelli aperti indica il livello di ansia del roditore. Quando collocati in questo apparato, i topi meno ansiosi tenderanno a esplorare i bracci aperti per un periodo di tempo maggiore (verde) rispetto a quelli con livelli di ansia più elevati (rosso; Immagine creata con Biorender.com).

Il dosaggio plasmatico delle IgG e delle IgM reattive per l'ossitocina è avvenuto utilizzando la tecnica ELISA, come descritto in un lavoro precedente (Fig.11; Fetissov, 2011). In sintesi, piastre Maxisorp da 96 pozzetti (Nunc, Rochester, NY, USA) sono state rivestite con ossitocina (Bachem AG, Bubendorf, Svizzera), aggiungendo in ogni pozzetto 100 μ l di una soluzione composta dal peptide di interesse, 0.5 M NaCO₃, 0.5 M NaHCO₃ e 0.02% di azoto sodico con pH di 9.6, e a seguito di un'incubazione di 48 ore a 4 °C. Le piastre sono state poi sottoposte a lavaggi e incubate per 3 ore a 37 °C con 100 μ L di plasma diluito 1:400 in PBS a pH 7.4 per il dosaggio delle IgG libere o in PBS con 3M di NaCl + 1.5M di glicina a pH 8.9 per il dosaggio delle IgG totali. Dopo ulteriori lavaggi, sono stati aggiunti 100 μ L di anticorpi anti IgG o IgM, coniugati con fosfatasi alcalina, e diluiti in PBS (1:2000, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Infine, sono

stati aggiunti 100 μ L di soluzione di fosfato di p-nitrofenile (Sigma) come substrato. Dopo 40 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la reazione è stata fermata aggiungendo NaOH 3N. L'assorbanza è stata misurata a 405 nm utilizzando un lettore di microplacche (Metertech Inc.). I valori di assorbanza ottenuti dalle piastre di controllo (senza campioni di plasma) sono stati sottratti dai valori di assorbanza dei campioni. Ciascuna misurazione è stata eseguita in duplicato, con una variazione tra i valori duplicati inferiore al 5%.

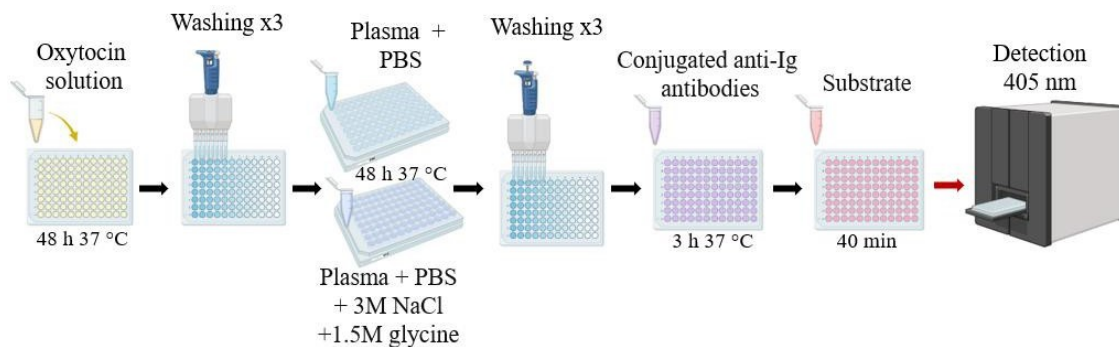


Fig.2.11 Il dosaggio plasmatico IgG e IgM reattive per l'ossitocina. Piastre da 96 pozzetti sono state rivestite con ossitocina e incubate con i campioni di plasma. Le IgG libere sono state misurate in PBS, mentre le IgG totali in una soluzione con NaCl e glicina. Dopo i lavaggi, sono stati aggiunti anticorpi contro le Ig coniugate con fosfatasi alcalina e infine un substrato di p-nitrofenile. L'assorbanza è stata misurata a 405 nm (Immagine creata con BioRender.com).

3.4.2 Dosaggio ossitocina plasmatica

La determinazione quantitativa delle concentrazioni di ossitocina nel plasma è avvenuta mediante l'impiego della tecnica ELISA utilizzando un kit commerciale (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). In breve, l'ossitocina è stata purificata dai campioni di plasma utilizzando le colonnine C-18, diluita nel "tampone di analisi" fornito nel kit e aggiunta in duplicato nei pozzetti rivestiti da anticorpi diretti contro il neuropeptide di riferimento. Successivamente, sono stati addizionati complessi anticorpo-streptavidina-HRP specifici e l'assorbanza è stata misurata utilizzando un lettore di micropiastre (MultiskanTMSkyHigh, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Le concentrazioni di ossitocina (pg/mL) sono state ottenute per interpolazione sulla curva standard, allestita con quantità note crescenti di standard di riferimento.

3.5 Analisi statistica

Tutti i dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{s.e.m}$ e sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism 8. Per il TCT, il confronto sia del tempo di permanenza che di esplorazione per lo stranger e il novel object, in ciascun gruppo sperimentale, è stato effettuato mediante il test t di Student. Per gli altri parametri comportamentali e molecolari è stato adottato un approccio statistico misto: l'ANOVA e l'analisi post hoc di Bonferroni sono stati utilizzati per i dati che seguivano una distribuzione normale, mentre il test di Kruskal-Wallis e l'analisi post hoc di Dunnett sono stati impiegati per i dati non distribuiti normalmente. I valori di p sono stati corretti per il confronto multiplo quando $p < 0.05$. Per tutte le comparazioni statistiche, il livello di significatività è stato fissato a $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ e $***p < 0.001$.

4. PARTE II

4.1 Procedura sperimentale

Colture di neuroni PFC e HIP sono state ottenute da topi BTBR e C57 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) allo stadio di sviluppo post-natale di 1-3 giorni (PND1-3). A partire dal 7° giorno di crescita neuronale in vitro (DIV7= stadio critico per lo sviluppo di dendriti e assoni; Giusi et al., 2009) per alcune colture di BTBR è stata simulata una condizione di chetosi (#BTBR-KD) mentre per le altre sono state rispettate le condizioni di partenza (#C57; #BTBR). A intervalli di DIV21 e DIV28 le colture di ciascun gruppo sperimentale sono state soggette ad analisi morfologiche al confocale. Contestualmente, le analisi dei livelli proteici del Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) al DIV 7 (fase precoce di differenziamento) e al DIV21 e 28 (fasi avanzate di differenziamento) hanno consentito di esaminare l'avvio del processo di maturazione e il mantenimento della funzionalità e vitalità neuronale (Fig. 2.12).

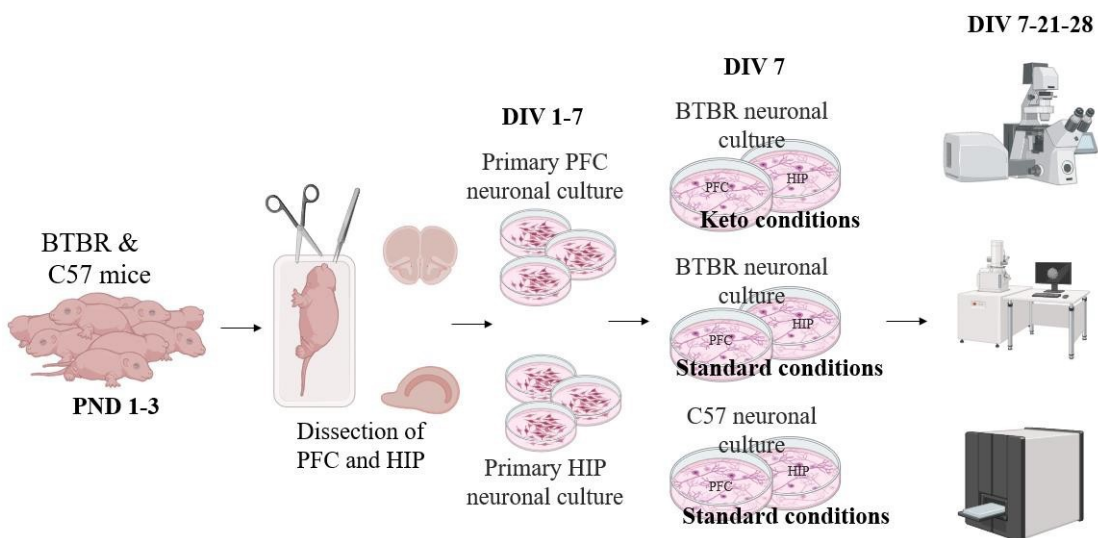


Fig. 2.12 Disegno sperimentale. Colture neuronali di PFC e HIP sono state ottenute a partire da topi BTBR e da topi C57 al PND 1-3. A partire dal DIV7 alcune colture di PFC e HIP, ottenute dai BTBR, sono state sottoposte a condizioni di chetosi, mentre per le rimanenti sono state mantenute le condizioni standard. Analisi morfologiche e di marcatori neuronali sono state condotte a intervalli di DIV7, DIV21 e DIV28, offrendo una visione mirata sui diversi tipi neuronali e sugli effetti della chetosi (Immagine creata con Biorender.com).

4.2 Allestimento delle colture neuronali

Nel corso della sperimentazione, i tessuti corrispondenti alla PFC e all'HIP sono stati isolati e successivamente sottoposti a specifiche procedure, al fine di garantirne l'integrità e la vitalità durante la fase di dissociazione. Le seguenti fasi sperimentali sono state eseguite separatamente per le due aree encefaliche (Fig.2.13):

- 1. Fase post-isolamento:** Dopo l'isolamento, il tessuto è stato immerso in una soluzione di conservazione (Soluzione 1: Neurobasal Medium A e BSA 0,02%) mantenuta in ghiaccio.
- 2. Fase di digestione:** Successivamente, per la fase di digestione, la Soluzione 1 è stata rimossa dalla Falcon da 15 ml, sostituendola con la Soluzione 2 (Neurobasal Medium A + Papaina 0,1% + BSA 0,02%) per 20 minuti a 37°C.
- 3. Fase di pre-dissociazione:** Al termine della digestione, con i tessuti sedimentati, il sopranatante è stato delicatamente rimosso e sostituito con la Soluzione 3 (mezzo di coltura: Neurobasal medium A + Supplemento B27 + Antibiotici + glutammina 0,5 mM + β -FGF 5 ng/mL).
- 4. Fase di dissociazione:** Le cellule sono state dissociate, utilizzando una pipetta di plastica monouso, i sopranatanti sono stati rimossi ed è stata miscelata la Soluzione 4 (Neurobasal medium + inibitore della tripsina 1% + BSA 1% + Antibiotici).
- 5. Fase di centrifugazione:** Dopo la sedimentazione degli aggregati, è stata eseguita una centrifugazione a 1300 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente.
- 6. Fase di analisi della vitalità cellulare:** Le cellule pellettate sono state risospese in mezzo di coltura (Soluzione 3). Successivamente, è stata effettuata la conta cellulare secondo il metodo del Trypan Blue, calcolando il numero di cellule vive/ml come media delle cellule vive moltiplicata per 100.000.
- 7. Fase di piastramento:** Una volta determinato il numero, le cellule sono state piastrate con una densità di 200.000 cell/cm² in mezzo di coltura (Soluzione 3). Ciascun pozzetto, precedentemente condizionato con il mezzo di coltura, è stato progettato per la crescita di cellule neuronali. Al fine di ridurre la proliferazione gliale, è stata aggiunta AraC al 2° giorno di coltura e rimossa al 4° giorno.
- 8. Fase di mantenimento:** Le cellule in coltura sono state fatte crescere su piastre multiwell, modificate con supporti a membrana al fluorocarbonio (FC; per maggiori dettagli si rimanda al paragrafo 4.2.1 Supporti a membrana) all'interno

di un incubatore in cui l'atmosfera è mantenuta a concentrazioni fisse di anidride carbonica (CO₂; 5%), ad un'umidità del 90% e ad una temperatura di 37°C. La concentrazione del fattore di crescita β-FGF è stata mantenuta a 5 ng/ml fino al 4° giorno, successivamente incrementata a 10 ng/mL dopo il 4° giorno.

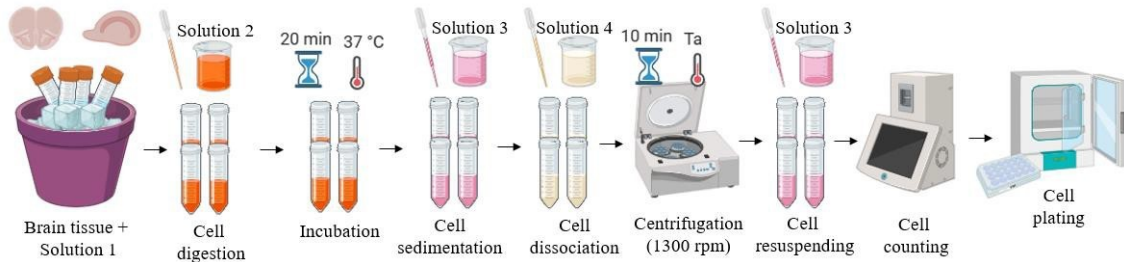


Fig.2.13 Allestimento delle colture neuronali. LA PFC e l'HIP, una volta isolati, sono stati processati secondo una serie di fasi che includono l'immersione in una soluzione di conservazione, la digestione con una soluzione enzimatica, la dissociazione cellulare, la centrifugazione, l'analisi della vitalità, il piastramento delle cellule su specifiche membrane e il mantenimento delle colture.

4.2.1 Supporti a membrana

Le cellule neuronali sono state fatte crescere su supporti a membrana al FC che, per la loro permeabilità all'O₂, alla CO₂ e al vapore acqueo, consentono una diretta ossigenazione delle cellule permettendo una forte adesione alla superficie della membrana e contribuendo così ad una corretta maturazione neuronale (De Bartolo et al., 2007). In particolare, i sistemi di coltura sono stati trattati con poli-L-lisina, disciolta in una soluzione di acido bórico:tetraborato di sodio (1:1) ad una concentrazione finale di 0.1 mg/ml che, nel caso della membrana FC, garantisce una densità di distribuzione dei gruppi funzionali pari a 40 µg/cm². Tutti i passaggi sono realizzati in un incubatore con CO₂ 5% e a 37°C.

4.3 Simulazione della chetosi in vitro

Le colture primarie di neuroni PFC e HIP sono state coltivate in terreno di coltura Gibco™ Neurobasal™-A Medium (Gibco™ A2477501) modificato con 4 mM di glucosio

(Standard conditions) o con 0.4 mM di glucosio e 4 mM di 3HB (Keto conditions), come precedentemente riportato da altri (Düking et al., 2022).

4.4 Analisi Immunocolorimetrica per la microscopia confocale a scansione laser

Il comportamento delle cellule di tutti i gruppi sperimentali è stato studiato attraverso la Microscopia Confocale a Scansione Laser (LSCM, Fluoview FV300, Olympus), a seguito dell'immunocolorazione di marcatori strutturali delle cellule neuronali. In breve, i neuroni sono stati fissati in paraformaldeide al 4% (p/v) per 30 minuti, seguiti da permeabilizzazione e blocco con una soluzione contenente Triton X-100 allo 0,3% (v/v) e FBS al 10% (v/v) in PBS per 1 ora a 37°C. Successivamente, i campioni sono stati incubati durante la notte a 4°C con gli anticorpi primari anti-Growth-Associated Protein 43 (GAP43; anti goat, 1:200; Santa Cruz Biotechnology), anti-Sinaptofisina (Syn; anti-mouse 1:400; Chemicon, Millipore, Italy) e anti-Tuj1 (anti rabbit 1:500; Covance). Gli anticorpi secondari sono stati poi aggiunti per 1 ora a temperatura ambiente. Infine, le cellule sono state incubate con 200 ng/mL di 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI; Molecular Probes) per la localizzazione nucleare, lavate in PBS e osservate al microscopio confocale.

4.5 Attività metabolica delle cellule

L'attività metabolica delle cellule neuronali è stata valutata misurando i livelli del BDNF al DIV-7, 21 e 28 mediante l'impiego della tecnica ELISA, utilizzando un "Mouse BDNF ELISA Kit" (Cat. #MBS355435; MyBioSource, San Diego, USA). In breve, i campioni processati secondo le istruzioni, fornite dai kit ELISA di riferimento, sono stati aggiunti in duplicato nei pozzetti contenenti gli anticorpi per il fattore di interesse. Successivamente, sono stati addizionati complessi anticorpo-streptavidina-HRP specifici e l'assorbanza è stata misurata utilizzando un lettore di micropiastre (Multiskan™SkyHigh, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Le concentrazioni del BDNF (pg/mL) sono state ottenute per interpolazione sulla curva standard allestita con quantità note crescenti di standard di riferimento.

4.6 Analisi statistica

La significatività statistica dei risultati sperimentali è stata valutata utilizzando il t-test di Student. I risultati sono stati espressi come media \pm s.e.m da almeno tre esperimenti indipendenti, ciascuno dei quali includeva cinque campioni per ogni trattamento. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

RISULTATI RELATIVI ALLA PARTE I-A

1.1 Effetto della KD sulle performance comportamentali

In primo luogo, nel mio Dottorato di Ricerca, è stato dimostrato che l'integrazione della KD è stata efficace nel contrastare la maggior parte dei comportamenti anomali esibiti dai topi BTBR.

Nel TCT i topi BTBR alimentati con CD hanno manifestato deficit sociali, come evidenziato dalla riduzione del tempo trascorso nella camera (chamber time) con lo stimolo sociale (stranger) (Fig. 1.1a; $p < 0.05$) rispetto a quello trascorso con la sola gabbietta vuota (novel object) e dalla simile quantità di tempo spesa ad interagire (exploration time) con lo stranger e con il novel object (Fig. 1.1b). Il trattamento con KD nei topi BTBR è stato in grado di invertire completamente i deficit sociali, aumentando significativamente sia il tempo trascorso nella camera con lo stranger rispetto a quella con il novel object (Fig. 1.1a; $p < 0.001$) e sia il tempo di esplorazione dello stimolo sociale rispetto a quello dello stimolo non sociale (Fig. 1.1b; $p < 0.001$). D'altra parte, i C57 alimentati con CD o KD non hanno manifestato deficit sociali, come indicato dalla netta preferenza per lo stimolo sociale, sia in termini di tempo trascorso nella camera (CD: Figura 1.1a; $p < 0.05$; KD: Figura 1.1a; $p < 0.001$) che di tempo di esplorazione (CD: Figura 1.1b; $p < 0.001$; KD: Figura 1.1b; $p < 0.001$).

Successivamente, è stata effettuata un'analisi del social index o SI per quantificare e analizzare le differenze esistenti tra i vari gruppi sperimentali. In accordo a quanto appena riportato, tale analisi ha evidenziato un significativo effetto di interazione tra il ceppo e la dieta sul comportamento sociale ($F_{(1, 28)} = 12.218$, $p = 0.002$). Nello specifico, il SI dei topi BTBR CD è risultato notevolmente inferiore rispetto ai C57 CD (Fig. 1.2a; $p < 0.001$). Tuttavia, l'introduzione della KD nei topi BTBR ha invertito il deficit sociale, aumentando significativamente il SI, rispetto ai topi BTBR CD, (Figura 1.2a, $p < 0.001$) e normalizzandolo quasi ai livelli osservati nei topi C57.

Per quanto riguarda la durata complessiva dell'attività di self-grooming, utilizzata per valutare il comportamento ripetitivo, è stata riportata un'interazione significativa tra ceppo e dieta ($F_{(1, 28)} = 16.709$; $p < 0.001$). In particolare, il tempo dedicato all'attività di grooming è risultato notevolmente ridotto nei topi BTBR alimentati con la KD, rispetto al gruppo BTBR CD (Fig. 1.2b; $p < 0.001$). Questa differenza è particolarmente evidente se consideriamo che il self-grooming nei topi BTBR alimentati con dieta standard è

risultato notevolmente più elevato rispetto a quello nei topi C57 CD (Figura 3.2b; $p < 0.001$).

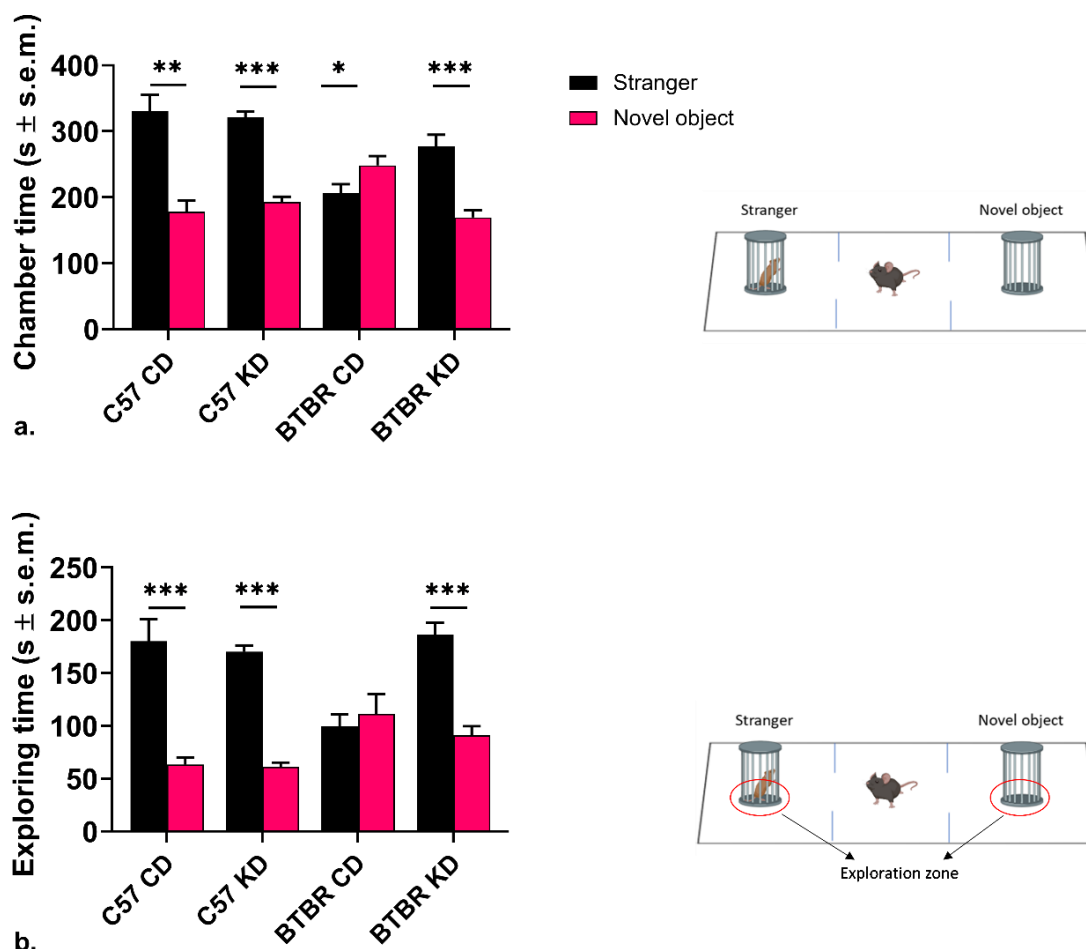


Fig.1.1 Effetti della KD sul comportamento sociale. Il tempo trascorso in ciascuna stanza laterale (a) e il tempo di esplorazione dello stranger/novel object (b) sono stati valutati nel Three Chamber test (TCT) sia per i topi BTBR che per quelli C57, alimentati con dieta controllata (CD) o chetogenica (KD) ($n=8$ /gruppo). I parametri sono stati calcolati come tempo medio (\pm s.e.m.) rispetto alla durata totale del test (600 s) come riportato nei Materiali e Metodi. Analisi statistica: t-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Per valutare gli effetti del trattamento dietetico sui comportamenti simili all'ansia, i topi sono stati sottoposti al LDT, nel quale non sono state registrate variazioni significative nel tempo di permanenza nel lato illuminato (Fig. 1.3a; ceppo x dieta: $F_{(1, 28)} = 0.06768$, $p = 0.797$ | ceppo: $F_{(1, 28)} = 0.02956$, $p = 0.86$; dieta: $F_{(1, 28)} = 0.06924$, $p = 0.79$). Similmente, anche nel numero totale di transizioni non sono stati osservati effetti di crossing-over (Fig. 1.3b; $F_{(1, 28)} = 0.5462$, $p = 0.47$) ma solo un effetto principale del ceppo (Fig. 1.3b; $F_{(1, 28)} = 5.413$, $p = 0.03$), indicando che quest'ultimo fattore, e non la dieta (Fig. 1.3b; $F_{(1, 28)}$

= 1.026, $p=0.32$), influenza il parametro in questione. Tuttavia, è emersa un'interazione significativa tra il ceppo e la dieta nella variabile della Latency to dark (Figura 1.3c; $F_{(1, 28)} = 5.662$, $p = 0.02$). Più in dettaglio, i topi BTBR KD hanno mostrato un tempo di Latency to dark significativamente più lungo rispetto ai BTBR CD (Fig. 1.3c; $p<0.01$). Allo stesso modo, per il gruppo dei C57, il trattamento con KD ha significativamente incrementato il tempo impiegato ad entrare per la prima volta nell'area buia, rispetto al gruppo dei C57 alimentati con CD (Fig. 1.3c; $p < 0,001$).

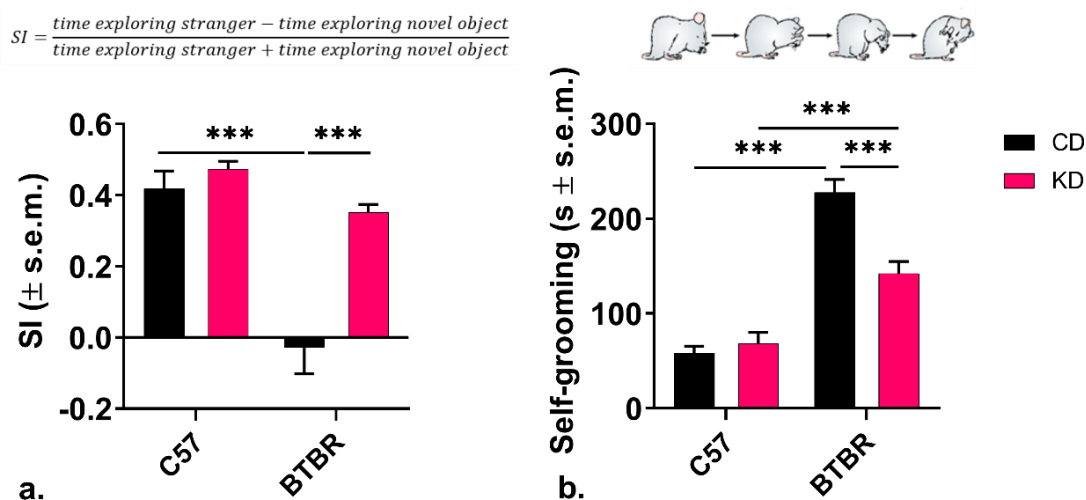


Fig 1.2 Effetti della KD sul comportamento sociale e sui comportamenti ripetitivi. a) Il social index o SI ricavato dal rapporto tra la differenza del tempo trascorso ad esplorare lo stranger e il tempo trascorso ad esplorare il novel object rispetto alla loro somma è stato valutato nel Three Chamber test (TCT) sia per i topi BTBR che per quelli C57, alimentati con dieta controllata (CD) o chetogenica (KD) ($n=8$ /gruppo). b) Il tempo ($s \pm s.e.m.$) dedicato ai comportamenti ripetitivi è stato valutato durante il Self-grooming test per i suddetti topi. Analisi statistica: ANOVA a due vie con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P<0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi. *** $p < 0.001$.

Infine, l'indagine nel NOR ha rivelato un effetto di crossing over statisticamente rilevante nelle capacità cognitive dei roditori (Fig. 1.3d.; $F_{(1, 28)} = 12.44$, $p = 0.001$). Dalle analisi condotte, è stato osservato che i BTBR CD manifestano deficit cognitivi in quanto non hanno mostrato alcuna preferenza per l'oggetto nuovo, come si evince dalla forte diminuzione del DI (Fig. 1.3d; $p<0.001$) rispetto ai C57 CD che, al contrario, hanno esibito una maggiore tendenza esplorativa verso l'oggetto non familiare. Il trattamento con KD è stato in grado di invertire completamente questa tendenza, aumentando

significativamente il DI nei BTBR (Fig. 1.3d; $p < 0.001$). La KD ha, inoltre, migliorato la memoria nei C57 (Fig. 1.3d; C57 KD vs C57 CD: $p < 0.05$).

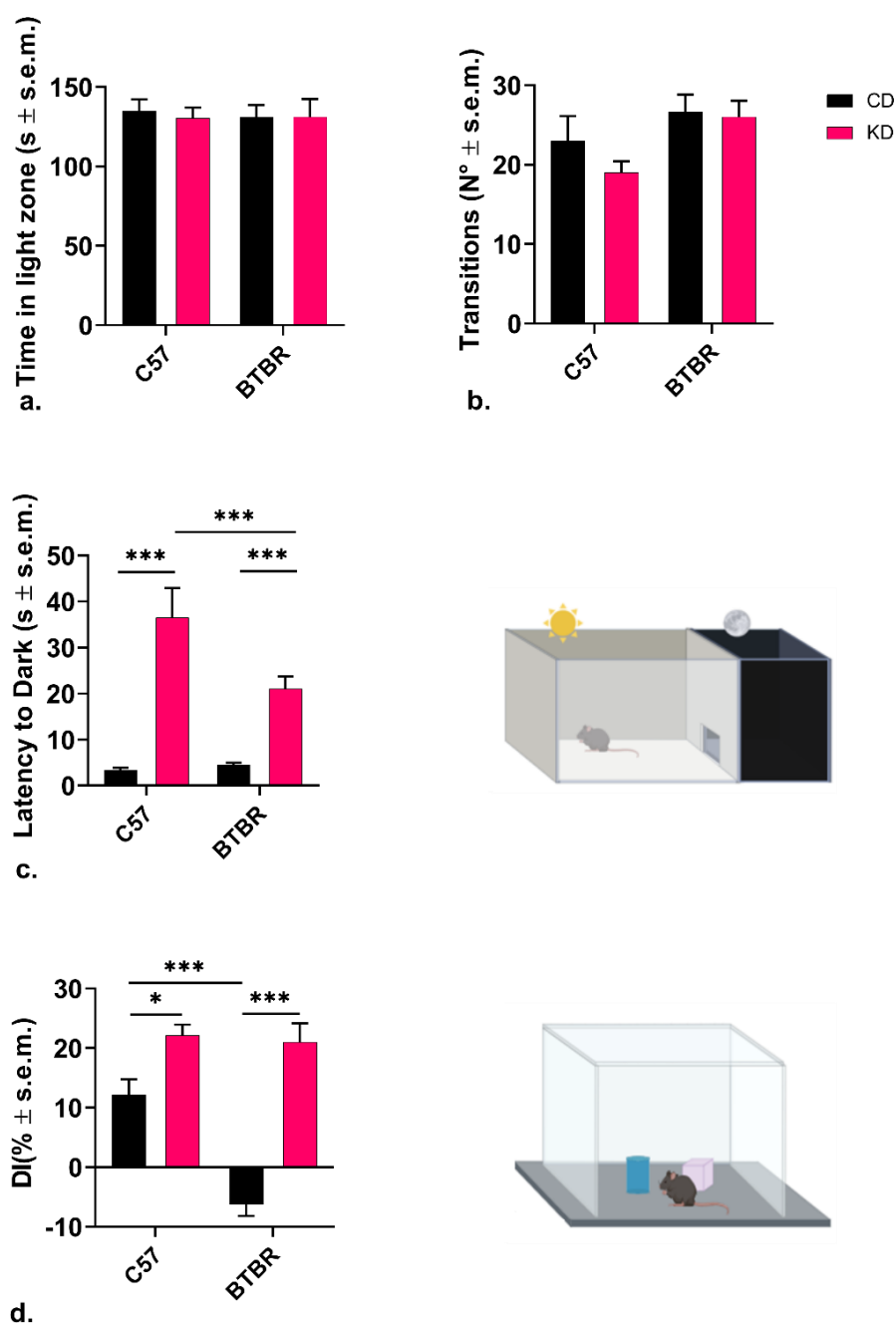


Fig.1.3 Effetti della KD sui livelli di ansia e sulle abilità cognitive. Il tempo (s ± s.e.m.) trascorso nella zona illuminata (a) e di Latency to dark (c), insieme al numero di transizioni tra il lato illuminato e buio (b), sono stati valutati nel Light Dark Test (LDT) sia per i topi BTBR che per quelli C57, alimentati con dieta controllata (CD) o chetogenica (KD) (n=8/gruppo). L'abilità di riconoscimento è stata valutata con il Discrimination Index (DI) (% ± s.e.m.; d) nel Novel Object Recognition Test (NOR) per i suddetti topi. Analisi statistica: ANOVA a due vie con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

1.2 Effetto della KD sulle citochine pro-infiammatorie

L'analisi dei livelli di espressione delle citochine pro-infiammatorie TNF- α , IL-1 β e IL-6 è stata condotta sia a livello cerebrale che nel plasma dei topi di ciascun gruppo sperimentale.

Per il TNF- α sono state osservate variazioni significative nella PFC (interazione dieta \times ceppo: $F_{(1, 20)} = 9.265$, $p = 0.006$; Fig. 1.4a), nell'HIP (effetto dieta $F_{(1, 20)} = 6.079$, $p = 0.02$; effetto ceppo: $F_{(1, 20)} = 76.47$, $p < 0,001$; Fig. 1.4b) e nel plasma (interazione dieta \times ceppo: $F_{(1, 20)} = 9.155$, $p = 0.007$; Fig. 3.4c). L'analisi post-hoc ha indicato che i topi BTBR presentavano livelli notevolmente più elevati ($p < 0.001$) di TNF- α nella PFC (Fig. 1.5a), nell'HIP (Fig. 1.5b) e nel plasma (Fig. 1.5c), rispetto ai C57. Il trattamento con la KD ha prodotto una riduzione molto alta dei livelli di TNF- α nella PFC ($p < 0.01$; Fig. 1.4a) e nel plasma ($p < 0.001$; Fig. 1.4c), con una riduzione moderata anche nell'HIP ($p < 0.05$; Fig. 1.4b) rispetto ai BTBR alimentati con CD.

Risultati rilevanti sono stati registrati anche per i livelli di IL-1 β nella PFC (Fig. 1.5a; effetto ceppo: $F_{(1, 20)} = 134$, $p < 0.001$; effetto dieta: $F_{(1, 20)} = 4.686$, $p = 0.04$) e nel plasma (Fig. 1.5c; interazione dieta \times ceppo: $F_{(1, 20)} = 17.269$, $p < 0.001$). Al contrario, solo un effetto principale del ceppo è stato osservato sui livelli di questa citochina a livello ippocampale ($F_{(1, 20)} = 101.290$, $p < 0.001$ Fig. 1.5b). L'analisi post-hoc ha indicato che i topi BTBR presentavano livelli notevolmente più elevati ($p < 0.001$) di IL-1 β nella PFC (Fig. 1.5a), nell'HIP (Fig. 1.5b) e nel plasma (Fig. 1.5c), rispetto ai C57. Tuttavia, il trattamento con la KD ha indotto una riduzione moderata di IL-1 β nella PFC (Fig. 1.5a; $p < 0.05$) e molto alta nel plasma (Fig. 1.5c $p < 0.001$) rispetto al gruppo di BTBR alimentato con dieta standard.

Contestualmente, sono state evidenziate interazioni significative tra dieta e ceppo per i livelli di IL-6 nella PFC (Fig. 1.6a; $F_{(1, 20)} = 5.680$; $p = 0.03$) e nell'HIP (Fig. 1.6b; $F_{(1, 20)} = 5.261$; $p = 0.03$). Al contrario, non è stato riscontrato effetto di interazione nel plasma (Fig. 1.6c; $F_{(1, 20)} = 2.006$, $p = 0.172$), ma effetti significativi del ceppo ($F_{(1, 20)} = 92.34$, $p < 0.001$) e della dieta ($F_{(1, 20)} = 6.061$, $p = 0.023$). I livelli di IL-6, estremamente elevati ($p < 0.001$) nei BTBR CD rispetto ai C57 CD, sono stati ridotti significativamente nei BTBR KD sia nella PFC (Fig. 1.6a $p < 0.05$) che nell'HIP (Fig. 1.6b; $p < 0.05$), così come a livello periferico (Fig. 1.6c; $p < 0.05$).

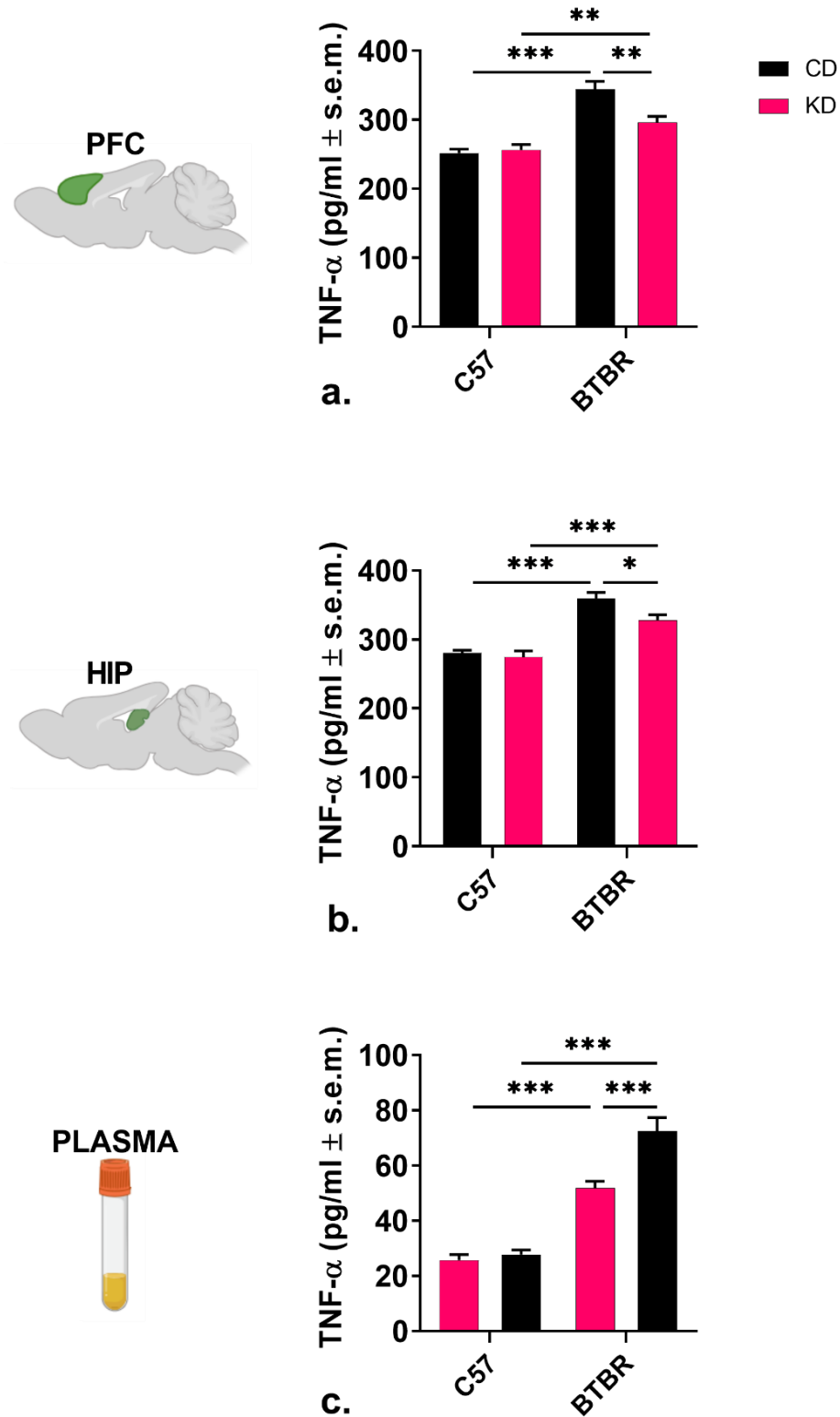


Fig. 1.4 Effetto della KD sui livelli TNF- α . I dati sono espressi in pg/ml (\pm s.e.m.) nella PFC (a), nell'HIP (b) e nel plasma (c) sia di topi BTBR che di topi C57 alimentati con dieta standard (CD) o chetogenica (KD) ($n = 6$ /gruppo). Analisi statistica: ANOVA a due vie con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

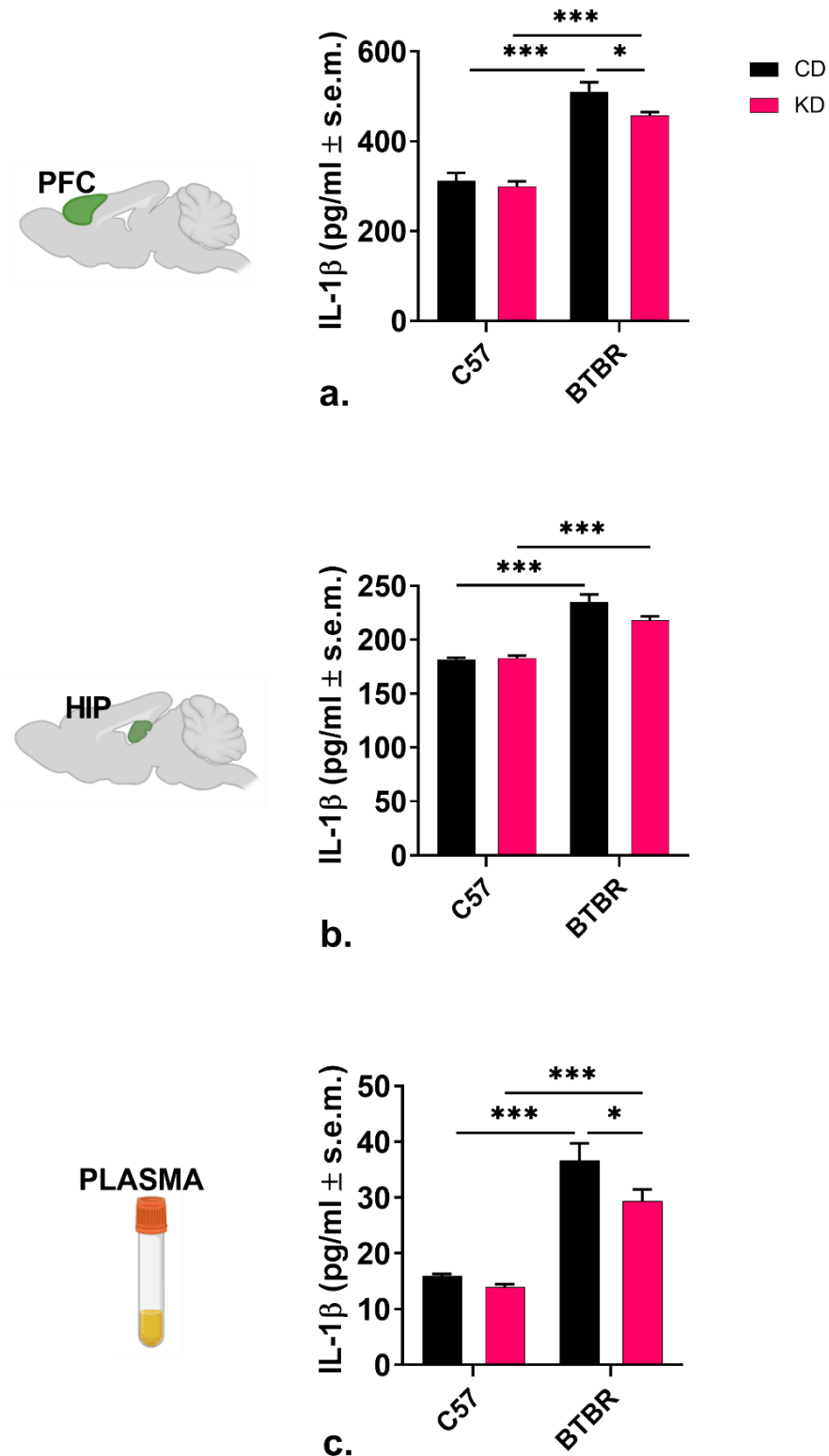


Fig.1.5 Effetto della KD sui livelli di IL-1 β . I dati sono espressi in pg/ml (\pm s.e.m.) nella PFC (a), nell'HIP (b) e nel plasma (c) sia di topi BTBR che di topi C57 alimentati con dieta standard (CD) o chetogenica (KD) (n = 6/gruppo). Analisi statistica: ANOVA a due vie con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

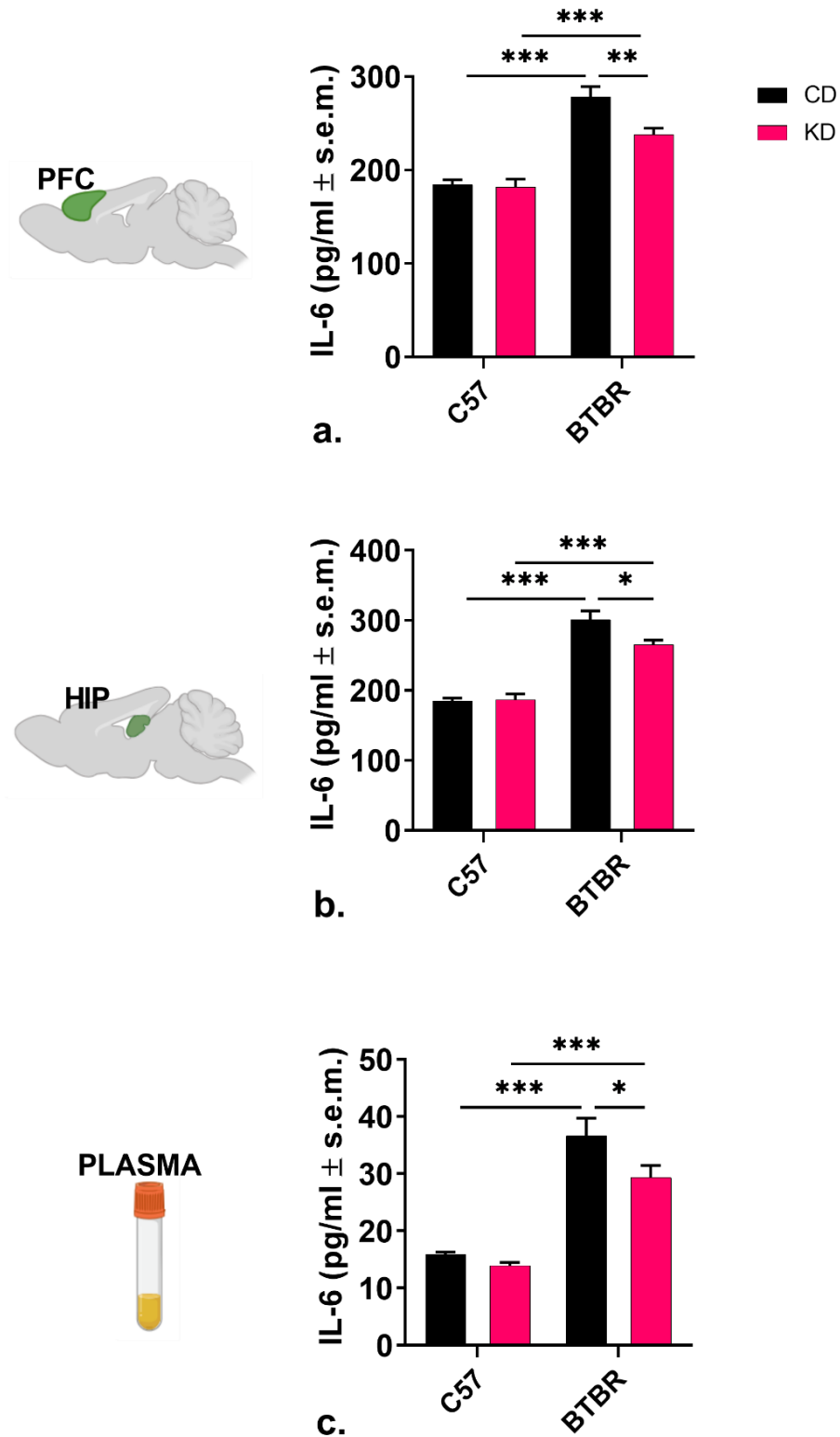


Fig.1.6 Effetto della KD sui livelli di IL-6. I dati sono espressi in pg/ml (\pm s.e.m.) nella PFC (a), nell'HIP (b) e nel plasma (c) sia di topi BTBR che di topi C57 alimentati con dieta standard (CD) o chetogenica (KD) ($n = 6$ /gruppo). Analisi statistica: ANOVA a due vie con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1.3 Effetti della KD sullo stress ossidativo

Nel contesto delle condizioni di stress ossidativo, è emersa una significativa interazione tra dieta e ceppo nei livelli di TBARS sia nella PFC (Fig. 1.7a) che nell'HIP (Fig. 1.7b) ($F_{(1, 20)} = 5.996$, $p = 0.02$; $F_{(1, 20)} = 5.299$, $p = 0.03$). Sono stati registrati livelli di TBARS molto elevati nella PFC (Fig. 1.7a; $p < 0.001$) e nell'HIP (Fig. 1.7b; $p < 0.001$) dei topi BTBR CD rispetto ai C57 CD. Questi livelli sono stati significativamente ridotti nel gruppo alimentato con KD sia nella PFC (Fig. 1.7a; $p < 0.05$) che nell'HIP (Fig. 1.7b; $p < 0.05$).

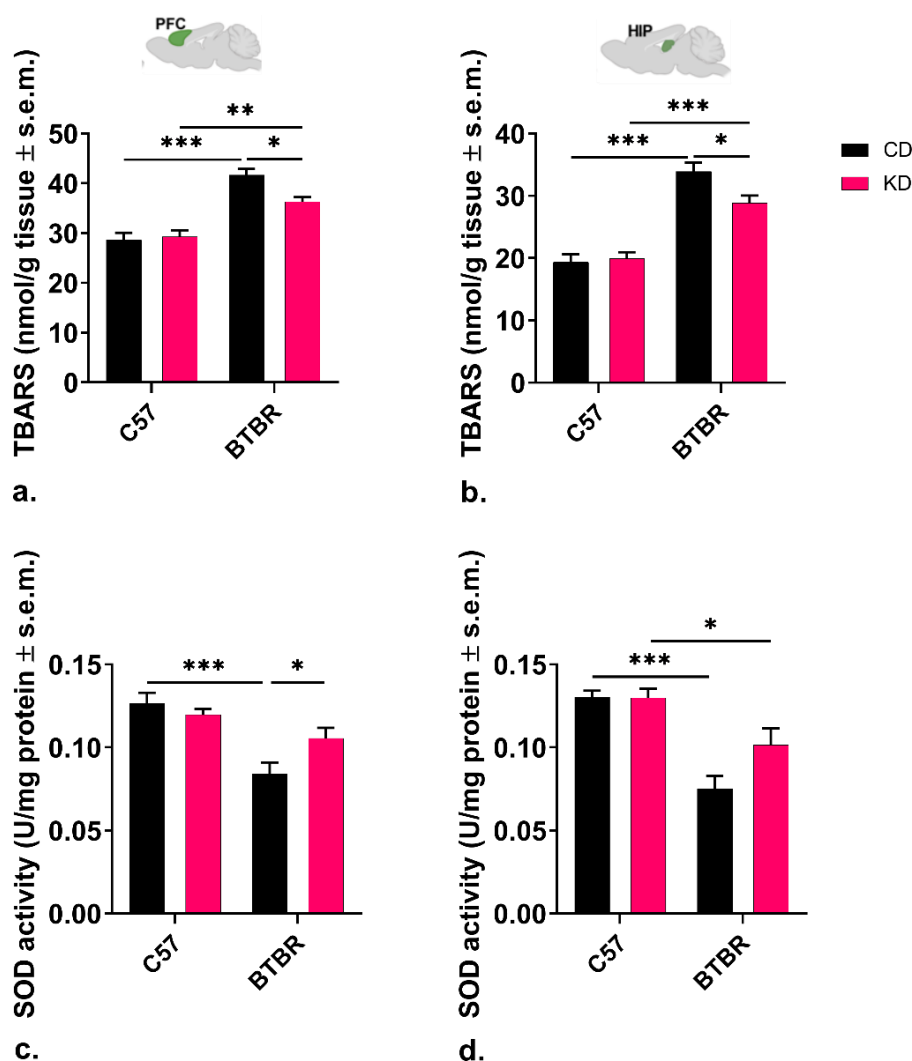


Fig.1.7 Effetto della KD sullo stress ossidativo. I dati sono espressi come nmol/g di tessuto (\pm s.e.m.) di TBARS nella PFC (a) e nell'HIP (b), e come U/mg di proteina (\pm s.e.m.) di attività SOD nella PFC (c) e nell'HIP (b) sia di topi BTBR che di topi C57 alimentati con dieta standard (CD) o chetogenica (KD) ($n = 6$ /gruppo). Analisi statistica: ANOVA a due vie con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Per quanto riguarda l'attività della SOD, è emerso un effetto di crossing over sostanzialmente significativo ($F_{(1, 20)} = 5.996$; $p = 0.02$) nella PFC (Fig. 1.7c). L'analisi post-hoc ha evidenziato una marcata riduzione della SOD nella PFC dei topi BTBR CD rispetto ai topi C57 CD (Fig. 1.7c; $p < 0.001$), la quale è aumentata in modo significativo dopo il trattamento con KD (Fig. 1.7c; $p < 0.05$). Al contrario, nell'HIP (Fig. 1.7d) è stato rilevato solo un effetto significativo del ceppo ($F_{(1, 20)} = 34.44$; $p < 0.001$) sull'attività della SOD, nonostante l'effetto tendenziale di interazione ($F_{(1, 20)} = 3.440$; $p = 0.08$) e della dieta ($F_{(1, 20)} = 3.291$; $p = 0.08$), entrambi vicini al limite di significatività statistica.

1.4 Effetti della KD sul microbiota intestinale

Le caratteristiche ecologiche del microbiota intestinale sono state analizzate mediante la misura dell'entropia di Shannon che ha consentito di stimare la variabilità delle specie all'interno di ciascun campione (α -diversità), e l'analisi delle Coordinate Principali (PCoA) che ha permesso di valutare le differenze nella composizione tra campioni (β -diversità).

Dall'analisi dell' α -diversità, sono state riscontrate significative differenze tra i due gruppi alimentati con CD ($p=0.029$), mentre non sono emerse variazioni significative ($p=0.63$) tra quelli alimentati con KD (Fig.1.8).

La PCoA per la valutazione della β -diversità ha mostrato significative differenze nella composizione batterica intestinale (Fig.1.9), con una chiara separazione tra i gruppi C57 e BTBR alimentati con CD ($p < 0.001$). Il trattamento con KD ha ridotto la β -diversità tra i due ceppi, posizionando i campioni BTBR KD vicino ai campioni C57 KD.

Differenze importanti sono emerse anche a seguito dell'analisi dei profili tassonomici dei vari gruppi sperimentali. A livello del Phylum (Fig.1.10), è stato registrato un aumento nell'abbondanza relativa dell'*Actinobacteria* e una diminuzione di *Proteobacteria* nei BTBR KD (0.7%; 0.1%) rispetto ai BTBR CD (0.01%; 0.2%). Allo stesso modo, il Phylum *Bacteroidota* ha sperimentato modesti aumenti nei gruppi KD, rispetto a quelli CD (BTBR KD: 52% vs BTBR CD: 40%; C57 KD 44% vs C57 CD: 37%). Al contrario, l'abbondanza relativa del Phylum *Firmicutes*, pari al 60%, nei BTBR CD e del 59% nei C57 CD è risultata lievemente ridotta nei BTBR KD (45%) e nei C57 KD (48%).

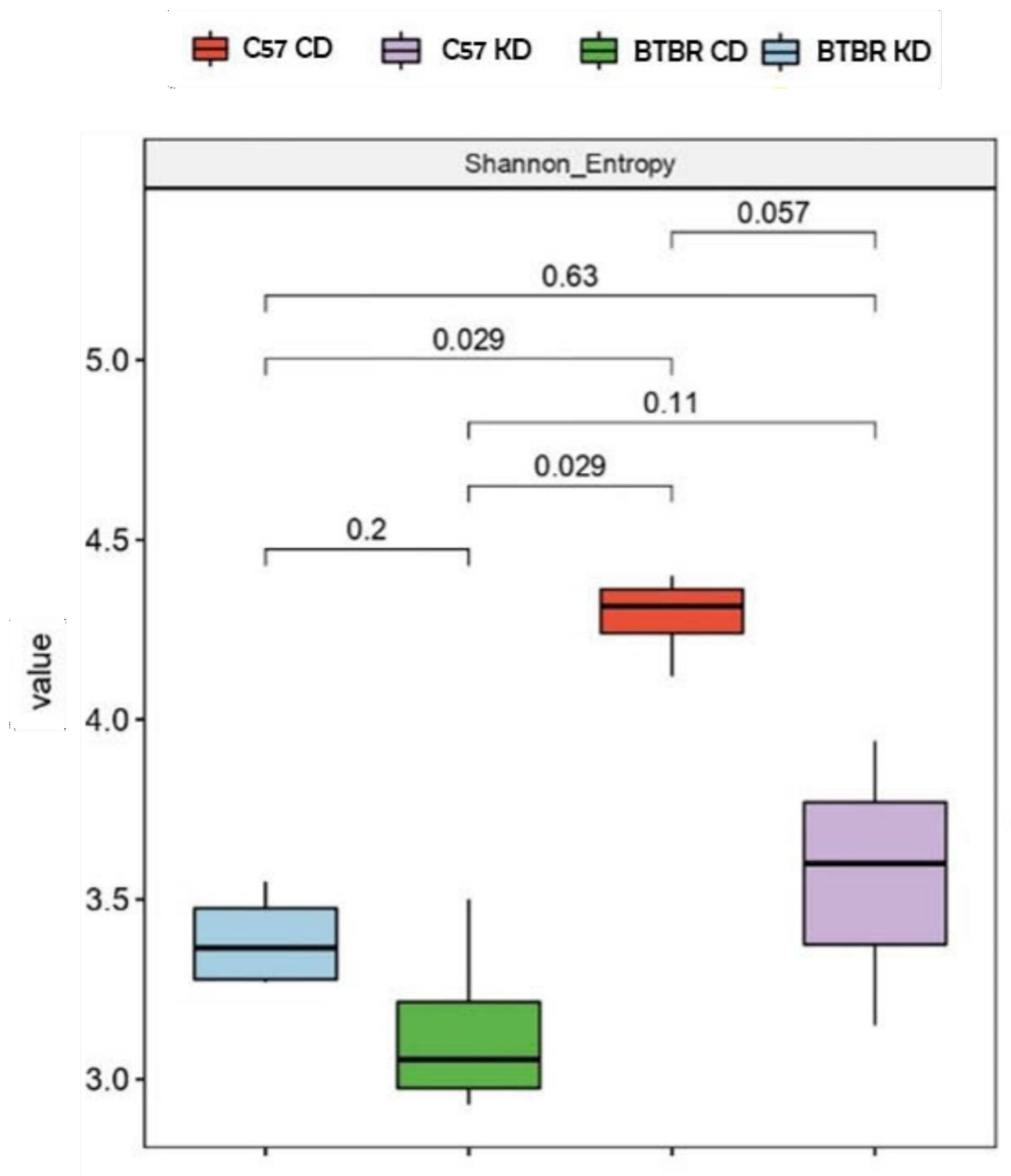


Fig. 1.8 Impatto della KD sull' α -diversità. L ' α -diversità è stata stimata utilizzando l'entropia di Shannon sia nei topi BTBR che nei topi C57 alimentati con dieta standard (CD) o chetogenica (KD) (n = 6/gruppo). Analisi statistica: PERMANOVA con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi.

Anche a livello del Genere sono emerse significative differenze tra i gruppi sperimentali (Fig. 1.11). La percentuale di *Lactobacillus* è risultata notevolmente più elevata nei topi BTBR CD (44%) rispetto ai topi C57 CD (7%). Tuttavia, il trattamento con la KD ha provocato un'inversione di questa anomalia, riportando i livelli di *Lactobacillus* nei topi BTBR a un valore del 5%, in linea con quanto osservato nel ceppo neurotipico. Al

contrario, i generi *Akkermansia* e *Blautia* hanno mostrato notevoli incrementi nei gruppi KD, rispetto a quelli CD. Più in dettaglio, il genere *Akkermansia* è risultato significativamente più abbondante nei topi BTBR (1%) e C57 (6%) alimentati con KD rispetto ai BTBR (0.04%) e ai C57 (0.05%) alimentati con CD. Similmente, il genere *Blautia* è aumentato significativamente nei gruppi BTBR (7%) e C57 (6%) alimentati con KD, rispetto ai BTBR (0.3%) e ai C57 (0.7%) alimentati con CD.

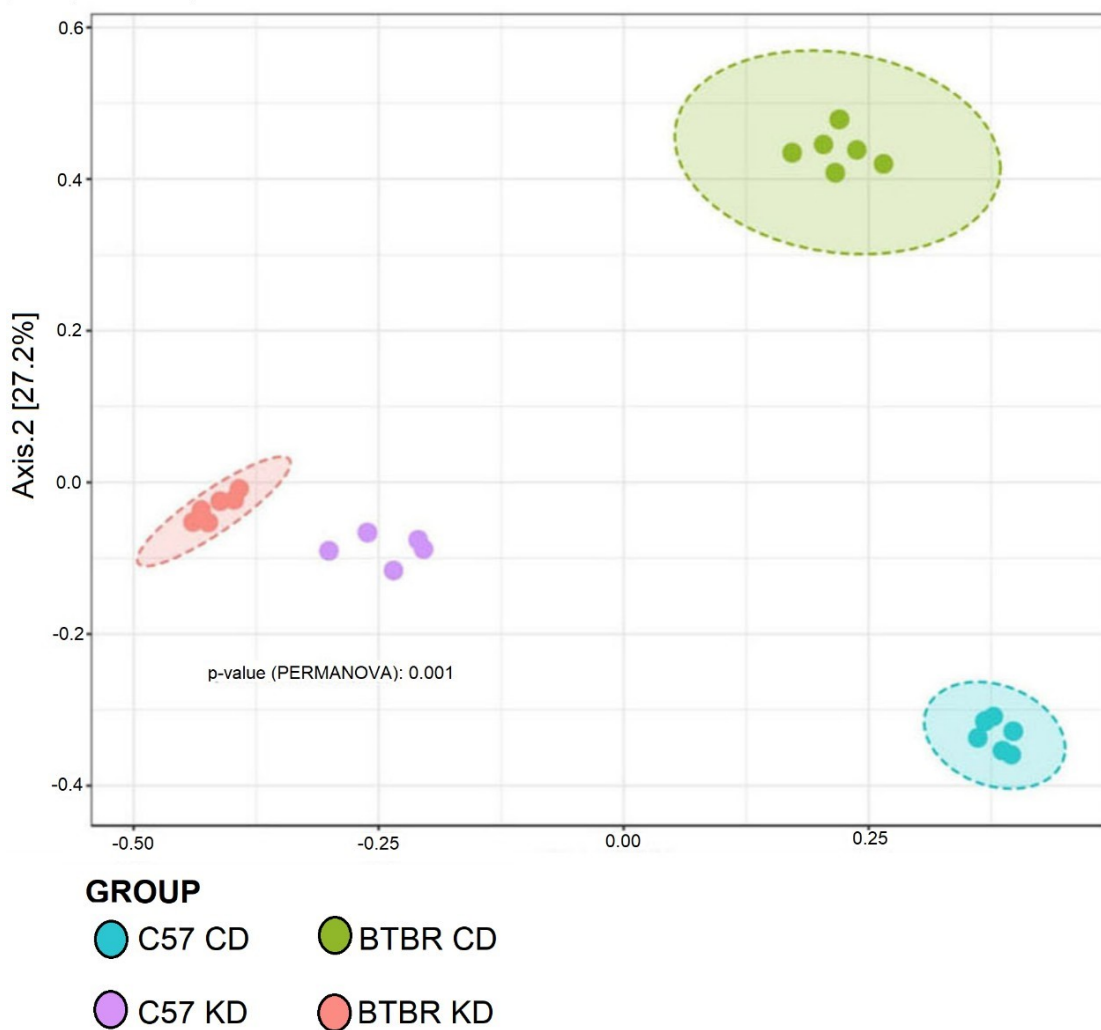


Fig. 1.9 Impatto della KD sulla β -diversità. L'Analisi delle Coordinate Principali (PCoA) per la β -diversità è stata effettuata sia nei topi BTBR che nei topi C57 alimentati con dieta standard (CD) o chetogenica (KD) ($n = 6/\text{gruppo}$). Analisi statistica: PERMANOVA con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi.

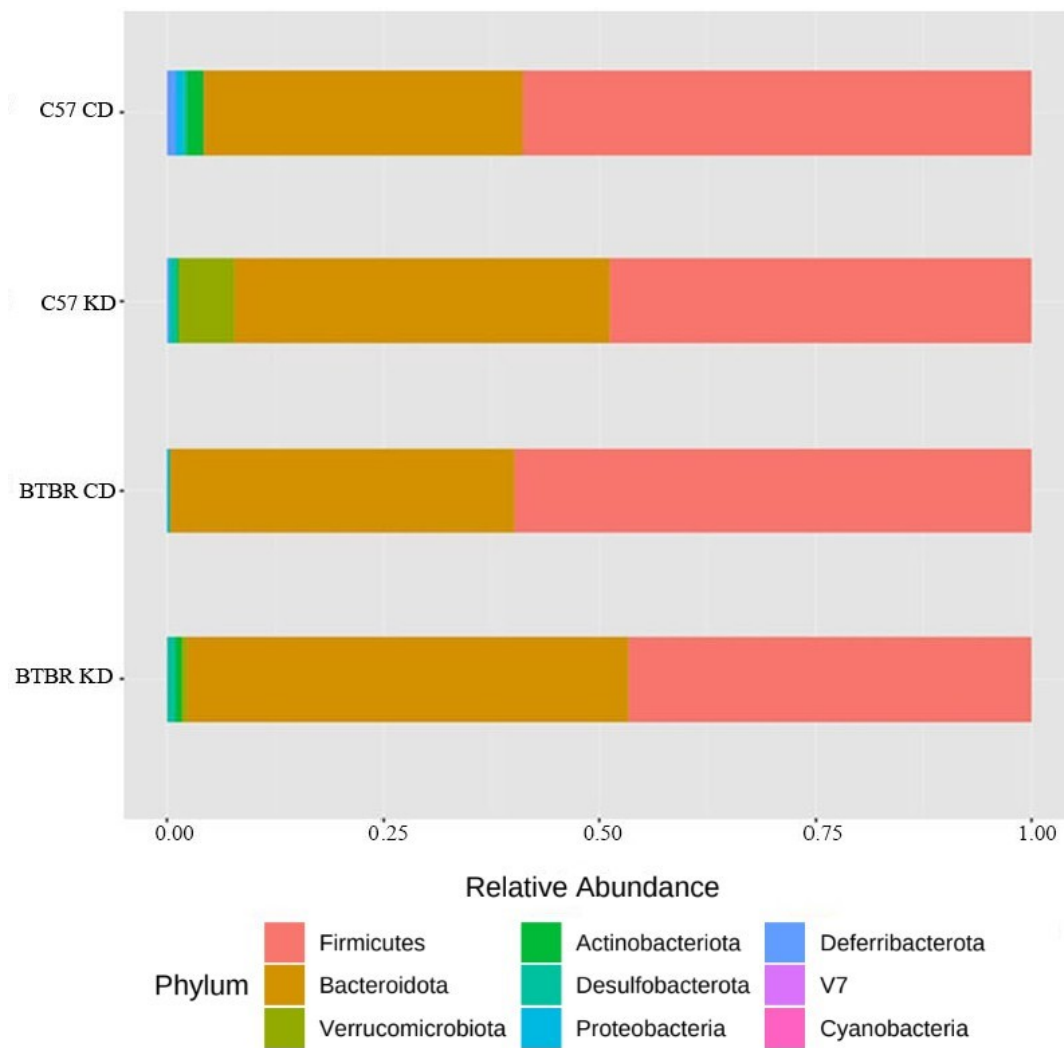


Fig. 1.10 Impatto della KD sulla composizione del microbiota a livello del Phylum. L'abbondanza relativa a livello del Phylum nei topi BTBR e nei topi C57 alimentati con dieta standard (CD) o chetogenica (KD).

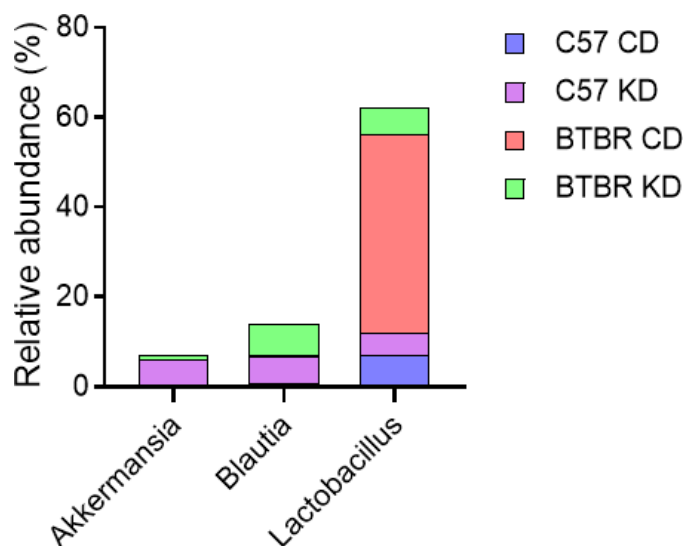
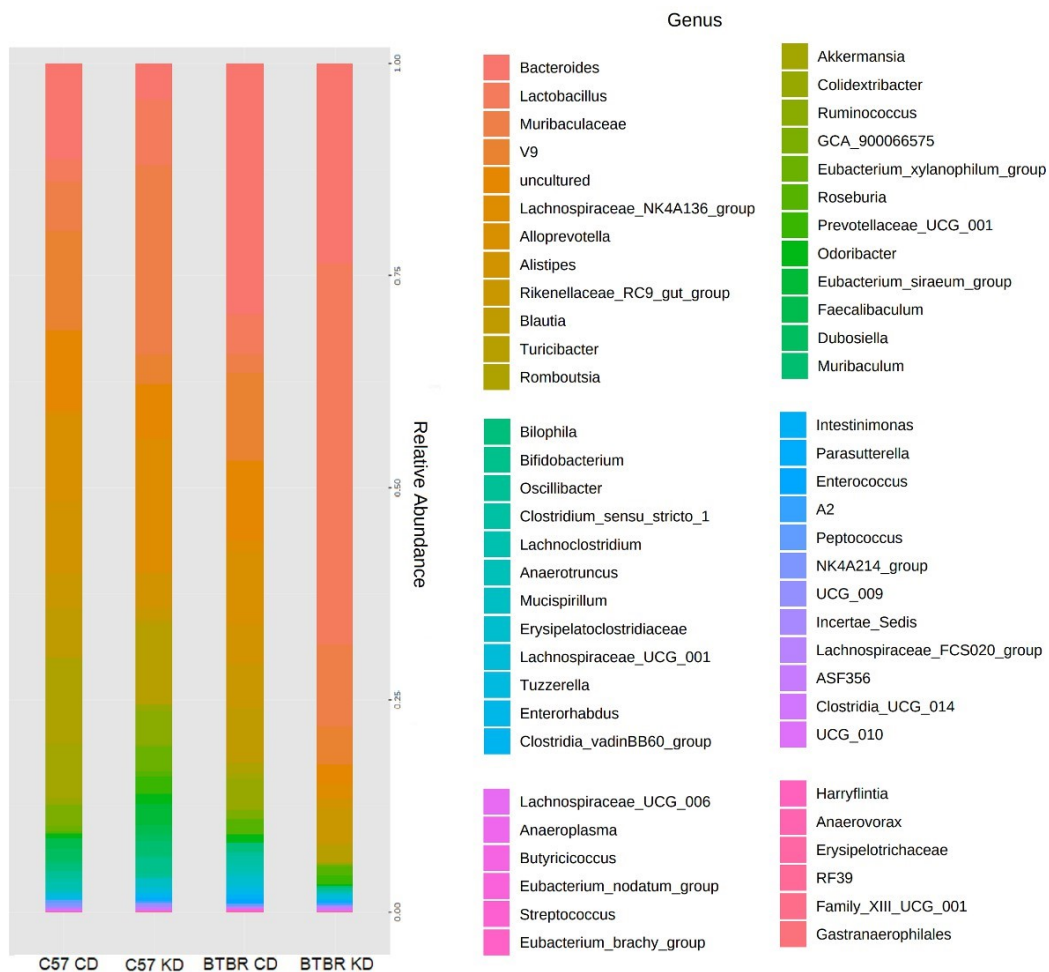


Fig. 1.11 Impatto della KD sulla composizione del microbiota a livello del Genere. L'abbondanza relativa a livello del Genere nei topi BTBR e nei topi C57 alimentati con dieta standard (CD) o chetogenica (KD).

RISULTATI RELATIVI ALLA PARTE I-B

1.5 Effetti dei ceppi di *Lactobacillus* sulle attività comportamentali

In questa fase, è stato valutato l'effetto di ciascun trattamento di *Lattobacilli* sull'interazione sociale, sulle abilità motorie e sul comportamento ansioso nei BTBR.

I topi BTBR, a cui era stata somministrata solo una soluzione fisiologica allo 0.9% (controllo), hanno manifestato evidenti deficit sociali nel TCT, come evidenziato dalla simile quantità di tempo trascorso nella camera con lo stimolo sociale (stranger, Fig.1.12a) e con la sola gabbietta vuota (novel object) e dalla simile quantità di tempo spesa ad interagire con lo stranger e con il novel object (Fig.1.12b). Tuttavia, quattro dei cinque probiotici utilizzati, ovvero, L1, L2, L3 e L4 hanno aumentato significativamente il tempo di permanenza (L1: $p < 0.05$; L2: $p < 0.001$; L3: $p < 0.01$; L4: $p < 0.01$) e il tempo di esplorazione verso lo stranger (L1: $p < 0.05$; L2: $p < 0.001$; L3: $p < 0.05$; L4: $p < 0.01$) dei topi BTBR, suggerendo il recupero dell'abilità sociale compromessa. A contrario, la somministrazione di L5 ha contribuito ad aumentare i deficit sociali, incrementando, seppur non in modo significativo, l'interazione con il novel object (Fig.1.12).

Nel contesto dell'OFT, è stato osservato un forte incremento del tempo di immobilità nel gruppo L4 ($F_{(5,41)} = 2.574$, $p = 0.04$; L5? vs NaCl: $p < 0.05$; Fig.1.13b), che ha indicato un impatto sostanziale di questo probiotico sulle abilità motorie, nonostante l'assenza di differenze statisticamente significative nella distanza percorsa ($F_{(5,42)} = 0.8444$, $p = 0.53$; Fig.1.13a). Un risultato significativo è emerso anche in relazione alla fotofobia ($F_{(5,42)} = 7.710$, $p < 0.001$; Fig.1.13c). Nei gruppi trattati con i ceppi di *Lactobacillus* L3, L4 ed L5 si è verificato un peggioramento evidente rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.05$ rispettivamente), manifestato dall'aumento significativo del tempo trascorso vicino alle pareti e dalla tendenza ad evitare l'area aperta e illuminata (Fig. 1.13c). Al contrario, sebbene non in modo significativo, si è osservato un miglioramento della fotofobia nei topi trattati con il ceppo L2 (Fig.1.13c). L'analisi del self-grooming, effettuato per valutare l'effetto del trattamento sui comportamenti ripetitivi, non ha fornito differenze statisticamente significative tra i BTBR di controllo e quelli trattati, sebbene in questi ultimi, rispetto ai primi, sia possibile notare una tendenza al decremento di questo parametro ($F_{(5, 42)} = 0.3057$, $p = 0.91$; Fig.1.13d). Dall'analisi condotta mediante il software ANY-maze che ha generato delle Heatmaps si possono osservare i punti dell'arena maggiormente esplorati (Figura 1.14). La distribuzione delle posizioni dell'arena più frequentemente visitate durante il test risulta essere più omogenea nei topi

trattati con L2, se confrontata con quella dei topi controllo. Al contrario, nei topi trattati con L3, L4 ed L5, si osserva una notevole riduzione di questa omogeneità.

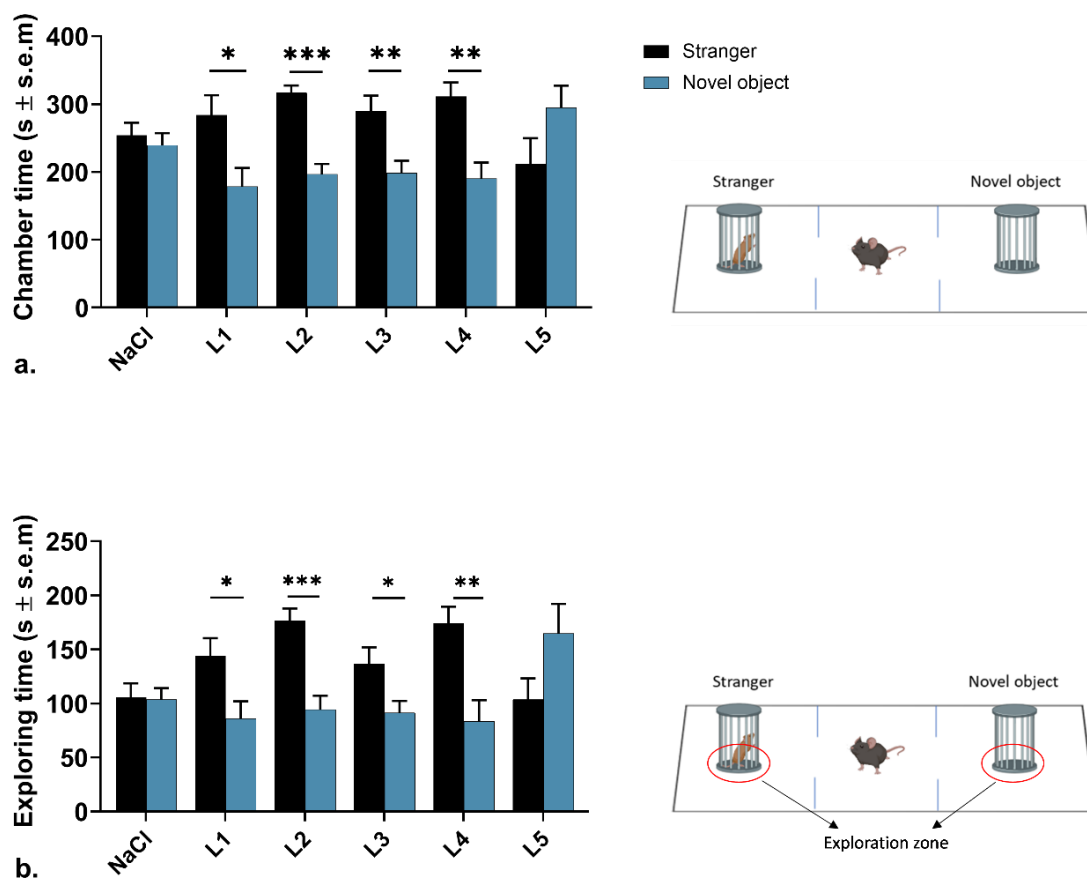


Fig. 1.12 Effetti dei ceppi di *Lactobacillus* sul comportamento sociale. Il tempo trascorso in ciascuna stanza laterale (a) e il tempo di esplorazione con lo stranger/novel object (b) sono stati valutati nel Three Chamber test (TCT), sia per i topi BTBR di controllo (0.9% NaCl) che per quelli trattati con i diversi ceppi di *Lactobacillus* (Strain # L1. *L. salivarius* - LS7892; Strain # L2. *L. gasseri* - LG6410; Strain # L3. *L. plantarum* - LP14D; Strain # L4. *L. reuteri* -LR92; Strain # L5. *L. camelliae* - LC LMG 24277) (n=8-9/gruppo). I parametri sono stati calcolati come tempo medio (\pm s.e.m.) rispetto alla durata totale del test (600 s). Analisi statistica: t-test: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

L'analisi EPM, condotta per ottenere una visione più approfondita e completa dell'attività dei probiotici sul comportamento legato all'ansia, ha evidenziato un effetto sul tempo trascorso nei bracci elevati e aperti, rispetto a quelli chiusi $F_{(5,41)} = 5.053$, $p=0.001$; Fig. 1.15a). In particolare, un aumento significativo per il gruppo L1 (L1 vs NaCl: $p<0.05$), e non significativo ma comunque osservabile per il gruppo L2, si è verificato nel tempo trascorso nei bracci aperti rispetto a quelli chiusi (Fig.1.15a). Un andamento simile è stato

osservato anche per il numero di ingressi nei bracci aperti, rispetto a quelli chiusi, seppur non sia stata registrata nessuna differenza statisticamente significativa ($F_{(5, 41)} = 1.421$, $p=0.24$; Fig. 1.15b). In accordo con questi risultati, l'analisi delle Heatmaps mostra una maggiore uniformità spaziale tra bracci aperti e chiusi nei topi trattati con L1 e L2, se confrontata con quella dei topi di controllo. Al contrario, questa maggiore coerenza spaziale non si riscontra nei topi trattati con L3, L4 ed L5 (Fig.1.16).

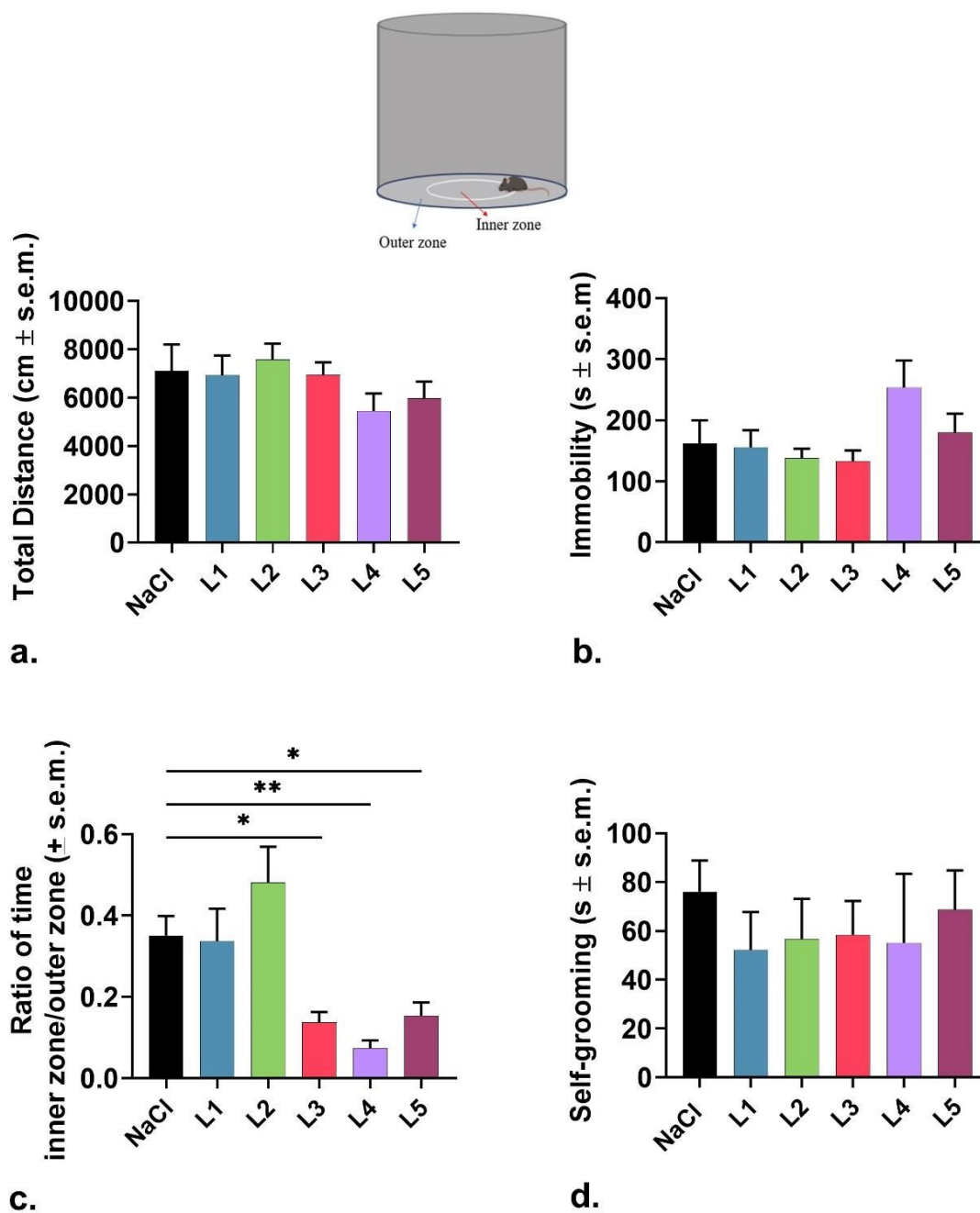


Fig. 1.13: Effetti comportamentali dei ceppi di *Lactobacillus* nell'Open Field Test (OFT). La distanza totale espressa in $\text{cm} \pm \text{s.e.m.}$ (a) e il tempo di immobilità espresso in $\text{s} \pm \text{s.e.m.}$ (b) sono stati utilizzati per valutare le abilità motorie. Il rapporto tra il tempo trascorso nella zona interna rispetto a quella esterna (c) è stato utilizzato per valutare i livelli di ansia. Infine, il tempo di self-grooming espresso in $\text{s} \pm \text{s.e.m.}$ (d) è stato quantificato per valutare gli effetti sul comportamento ripetitivo. Le analisi sono state condotte nei topi BTBR di controllo (0.9% NaCl) e in quelli trattati con diversi ceppi di *Lactobacillus* (# L1. *L. salivarius* - LS7892; # L2. *L. gasseri* - LG6410; # L3. *L. plantarum* - LP14D; # L4. *L. reuteri* - LR92; # L5. *L. camelliae* - LC LMG 24277) ($n=8-9/\text{gruppo}$). Analisi statistica: one-way ANOVA con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come indicato nei Materiali e Metodi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

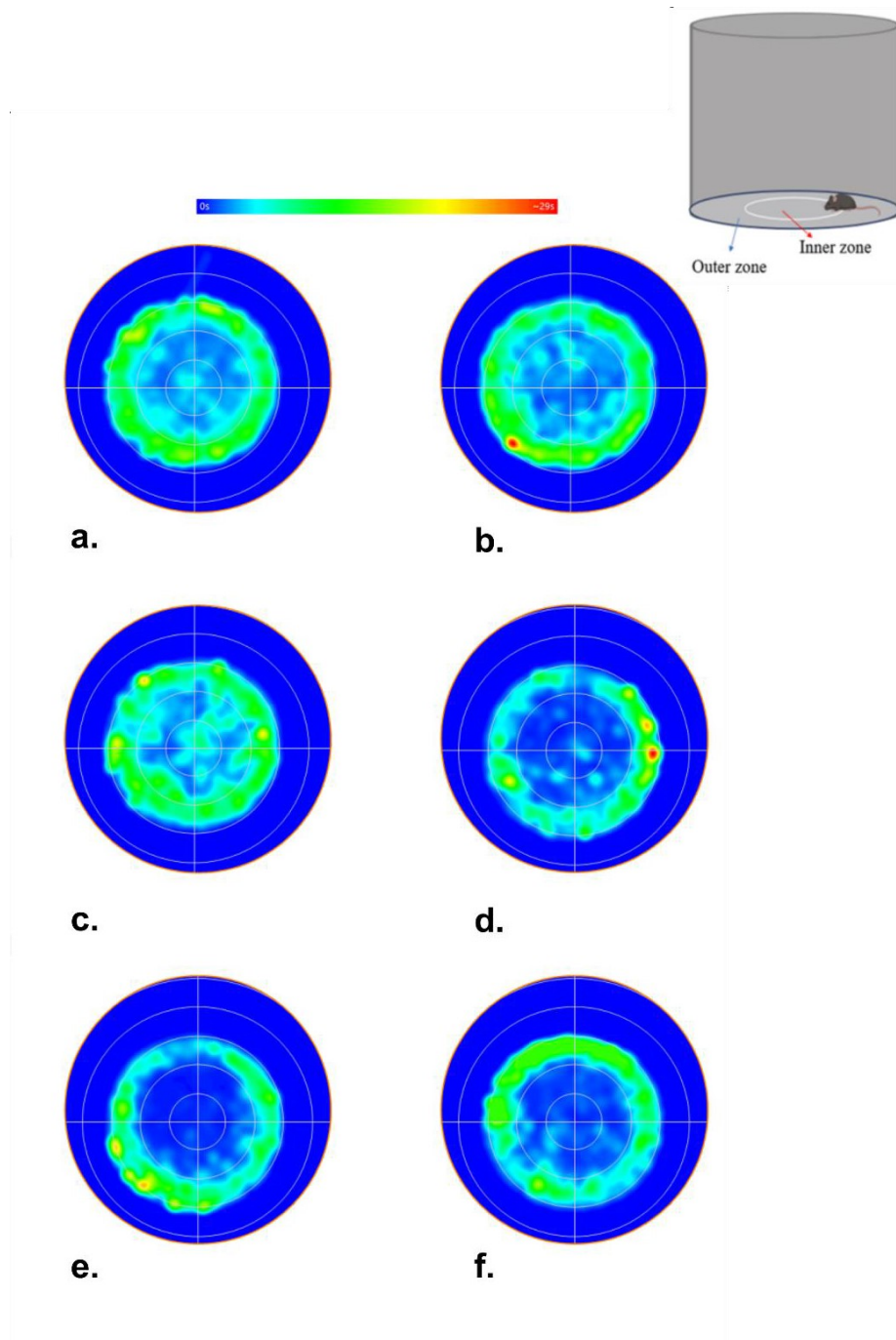


Fig. 1.15 Heatmaps dell'OFT. Ciascun grafico presenta una mappa termica media di ciascun gruppo sperimentale, rappresentando l'intera durata del test e utilizzando la scala indicata di seguito. Analisi video: software Any-MAZE (versione 7.20). a). NaCl; b) # L1. *L. salivarius* - LS7892; c) # L2. *L. gasseri* - LG6410; d) # L3. *L. plantarum* - LP14D; e) # L4. *L. reuteri* -LR92; f) # L5. *L. camelliae* - LC LMG 24277).

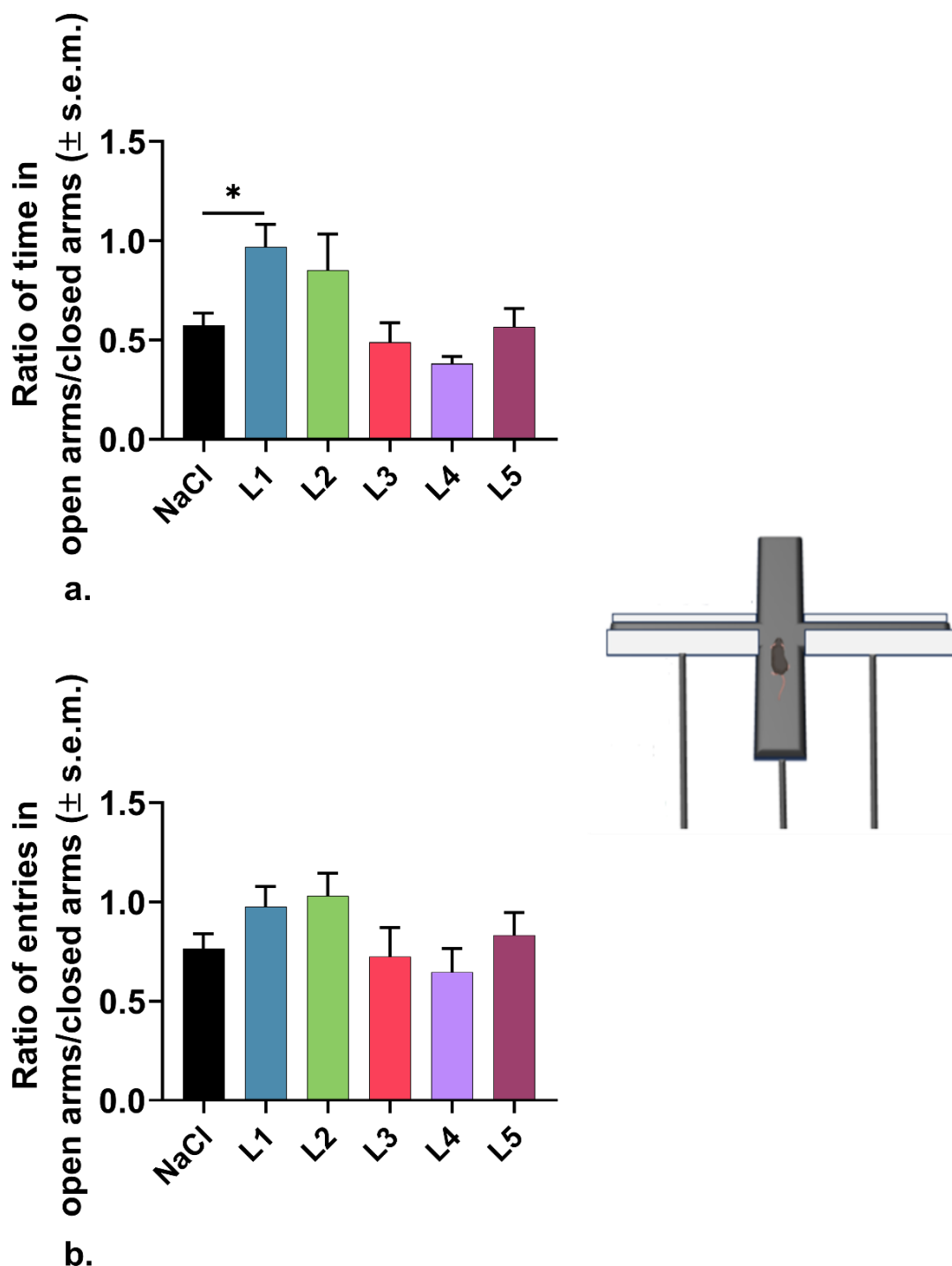


Figura 1.15: Effetti dei ceppi di *Lactobacillus* sul comportamento ansioso nell'Elevated Plus Maze (EPM). a) Il rapporto tra il tempo trascorso nei bracci aperti rispetto a quelli chiusi e b) il rapporto tra il numero di ingressi nei bracci aperti rispetto a quelli chiusi sono stati valutati nei topi BTBR di controllo (0.9% NaCl) e in quelli trattati con diversi ceppi di *Lactobacillus* (# L1. *L. salivarius* - LS7892; # L2. *L. gasseri* - LG6410; # L3. *L. plantarum* - LP14D; # L4. *L. reuteri* -LR92; Ceppo # L5. *L. camelliae* - LC LMG 24277) (n=8-9/gruppo). Analisi statistica: one-way ANOVA con test post-hoc di Bonferroni per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come indicato nei Materiali e Metodi. * $p < 0.05$.

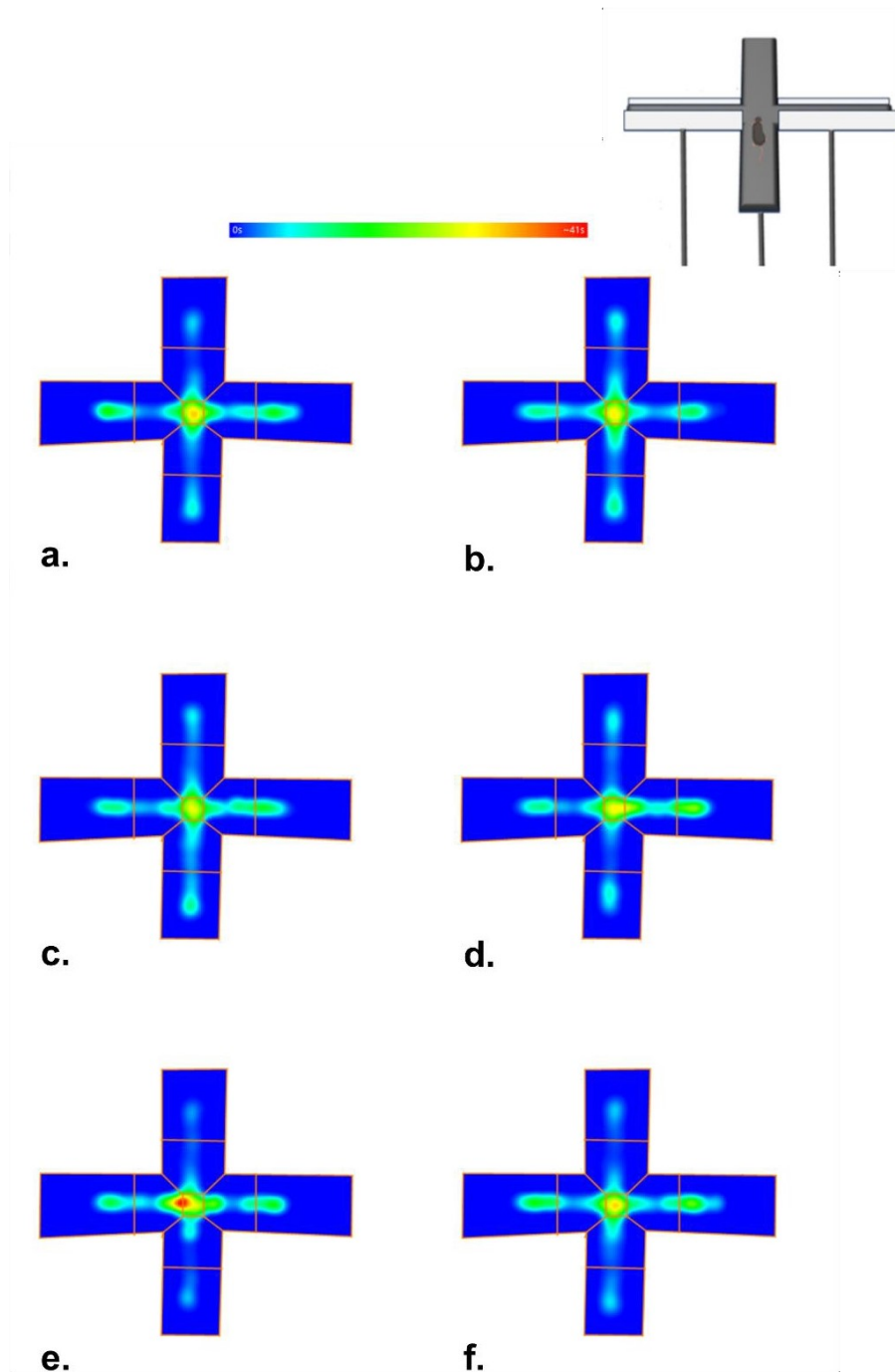


Fig. 1.16 Heatmaps dell'EPM. Ciascun grafico presenta una mappa termica media di ciascun gruppo sperimentale, rappresentando l'intera durata del test e utilizzando la scala indicata di seguito. Analisi video: software Any-MAZE (versione 7.20). a) NaCl; b) # L1. *L. salivarius* - LS7892; c) # L2. *L. gasseri* - LG6410; d) # L3. *L. plantarum* - LP14D; e) # L4. *L. reuteri* -LR92; f) # L5. *L. camelliae* - LC LMG 24277).

1.6 Effetti dei ceppi di *Lactobacillus* su ossitocina e immunoglobuline reattive all'ossitocina

Per valutare gli effetti dei *Lattobacilli* sull'ossitocina, sono stati esaminati i livelli plasmatici di questo peptide e delle Ig ad esso reattive.

In particolare, sono state osservate variazioni significative nei livelli di IgG libere reattive per l'ossitocina ($KW_{(5,40)} < 0.001$), risultando tendenzialmente più elevate nel gruppo L4 e più basse nel gruppo L5 (Fig.1.17a). Mentre i livelli totali di IgG reattive per l'ossitocina, ottenuti mediante la separazione di eventuali complessi immuno-peptidici, sono risultati tendenzialmente più alte nel gruppo L2 e più basse nel gruppo L4 ed L5 ($KW_{(5,40)} = 0.008$; Fig.1.17b). Analogamente, nei livelli delle IgM sono state osservate delle tendenze all'incremento nel gruppo L4 ed L5, che però non hanno raggiunto il livello di significatività statistica stabilito ($KW_{(5,40)} = 0.55$; Fig.1.17c).

Similmente a quanto osservato per le Ig, i trattamenti non sono stati in grado di produrre variazioni significative nei livelli di ossitocina plasmatica ($KW_{(5,40)} = 0.64$; Fig.1.17d). Tuttavia, è interessante notare che nei gruppi trattati con i probiotici L1, L3 e L4 è stata osservata una tendenza all'aumento dei livelli di ossitocina plasmatica, rispetto ai BTBR di controllo (Fig.1.17d).

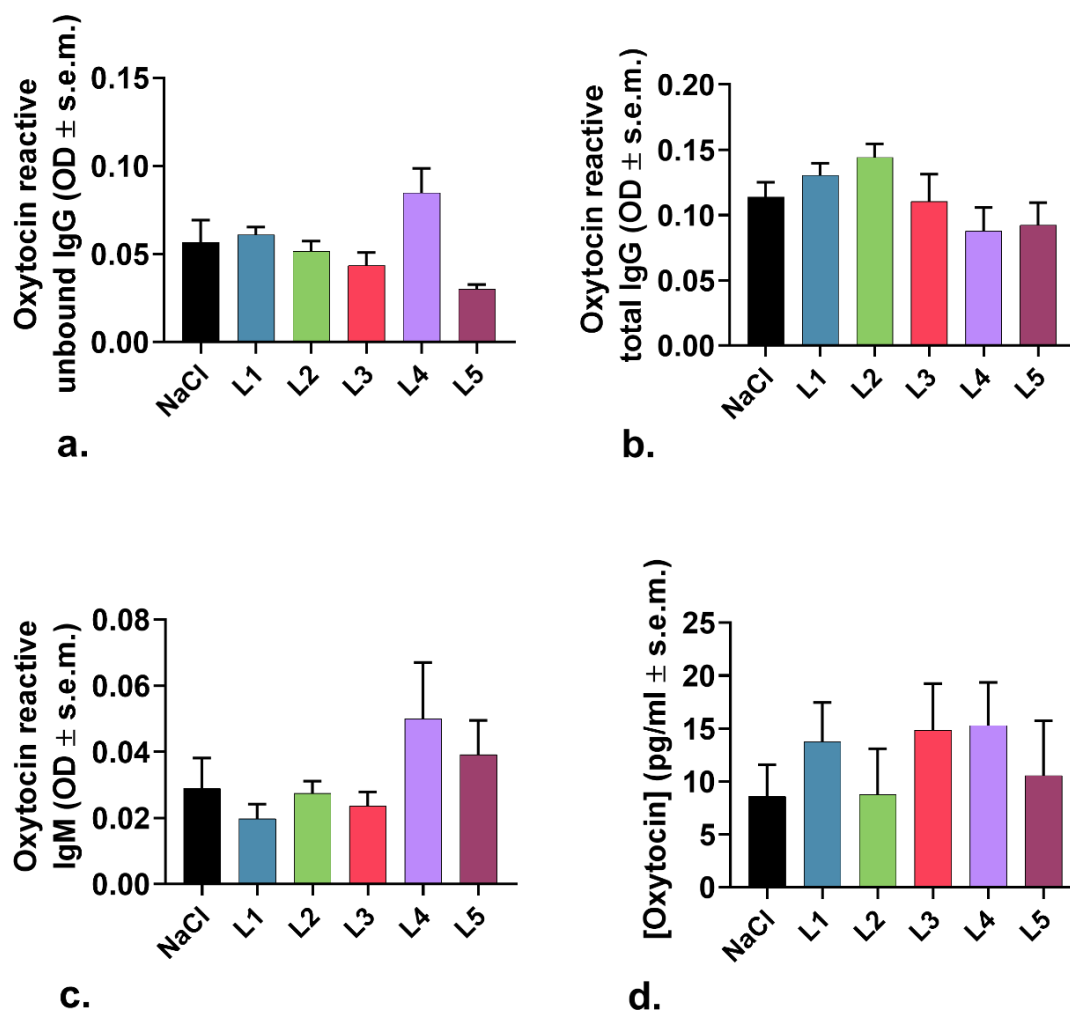


Fig.1.17 Effetti dei ceppi di *Lactobacillus* sulle immunoglobuline (Ig) reattive per l'ossitocina e sui livelli di ossitocina. I livelli plasmatici delle a) IgG libere, b) IgG totali e c) delle IgM reattive per l'ossitocina espresse come OD \pm s.e.m. e d) di ossitocina espressi come pg/ml (\pm s.e.m.) sono stati valutati nei topi BTBR di controllo (0.9% NaCl) e in quelli trattati con diversi ceppi di *Lactobacillus* (# L1. *L. salivarius* - LS7892; # L2. *L. gasseri* - LG6410; # L3. *L. plantarum* - LP14D; # L4. *L. reuteri* -LR92; Ceppo # L5. *L. camelliae* - LC LMG 24277). Analisi statistica: Kruskal-Wallis test con test post-hoc di Dunn per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come indicato nei Materiali e Metodi.

RISULTATI RELATIVI ALLA PARTE II

1.7 Analisi immunocolorimetrica al confocale

Successivamente, l'attenzione è stata focalizzata sulle caratteristiche morfologiche dei neuroni PFC e HIP, esaminati in condizioni standard e di chetosi. Le analisi sono state condotte tramite microscopio confocale durante lo stadio di sviluppo DIV 21 e 28. I risultati rivelano un pattern eterogeneo nella distribuzione di specifici antigeni neuronali, utilizzati come marcatori per il differenziamento cellulare complessivo (β -tubulina), gli elementi assonici (GAP43; Syn) e quelli nucleari (DAPI).

Nei topi C57 sia a DIV 21 (Fig.1.18a) che a DIV 28 (Fig.1.19a) i neuroni PFC mostrano una rete ben sviluppata e assoni definiti, evidenziati dall'espressione della β -tubulina, Syn e GAP43. La struttura nucleare è altresì ben visibile in entrambi gli stadi di sviluppo. L'analisi combinata dei segnali fluorescenti offre una panoramica completa della complessità della rete neuronale in queste condizioni.

Al contrario, a DIV 21 nei neuroni BTBR coltivati in condizioni standard si evidenzia una diminuzione del segnale della β -tubulina, indicativo di una minore organizzazione del citoscheletro. La quasi assenza di Syn, associata a un indebolimento del segnale di GAP43, suggerisce possibili alterazioni nei processi di formazione e stabilità sinaptica nonché di plasticità neuronale (Fig.1.18b). Tale scenario persiste anche a DIV 28, con una marcata riduzione dell'espressione di Syn e GAP43 (Fig.1.19b).

È interessante notare nei neuroni BTBR, coltivati in condizioni di chetosi a DIV 21 (Fig.1.18c) e 28 (Fig.1.19c) un'organizzazione neuronale simile a quella dei C57. In particolare, si nota un citoscheletro più definito attraverso l'espressione della β -tubulina, insieme a una rete ben sviluppata di elementi sinaptici, evidenziata da segnali più marcati di Syn e GAP43 piuttosto che nei neuroni BTBR cresciuti in condizioni standard (Fig.1.18b; Fig.1.19b).

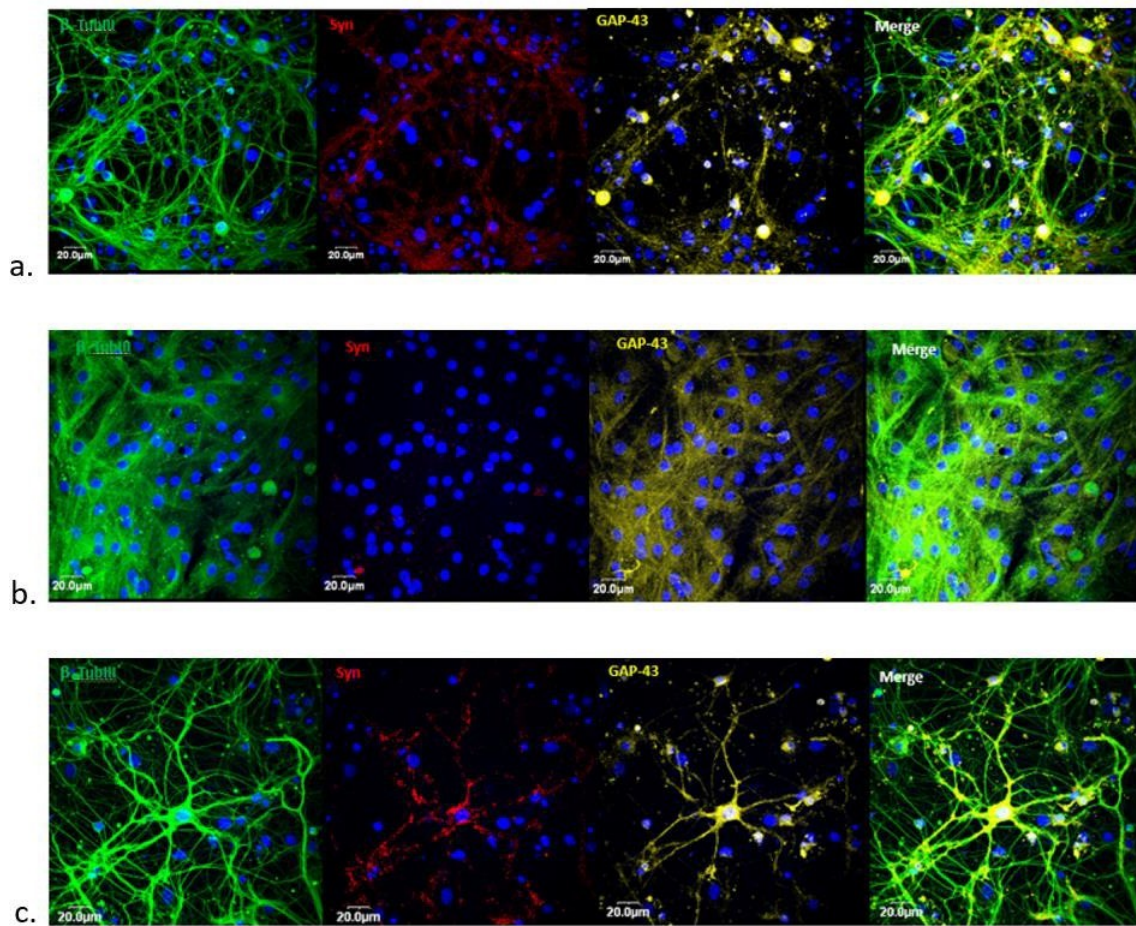


Fig.1.18 Immagini al confocale di neuroni PFC a 21 giorni di coltura. Rappresentazione dei neuroni provenienti da topi a) C57 coltivati in condizioni standard, b) BTBR coltivati in condizioni normali e c) BTBR coltivati in condizioni di chetosi nel sistema a membrana. Le cellule sono marcate per β -Tubulina III (verde), sinaptofisina (rosso), GAP-43 (giallo) e nuclei (DAPI; blu).

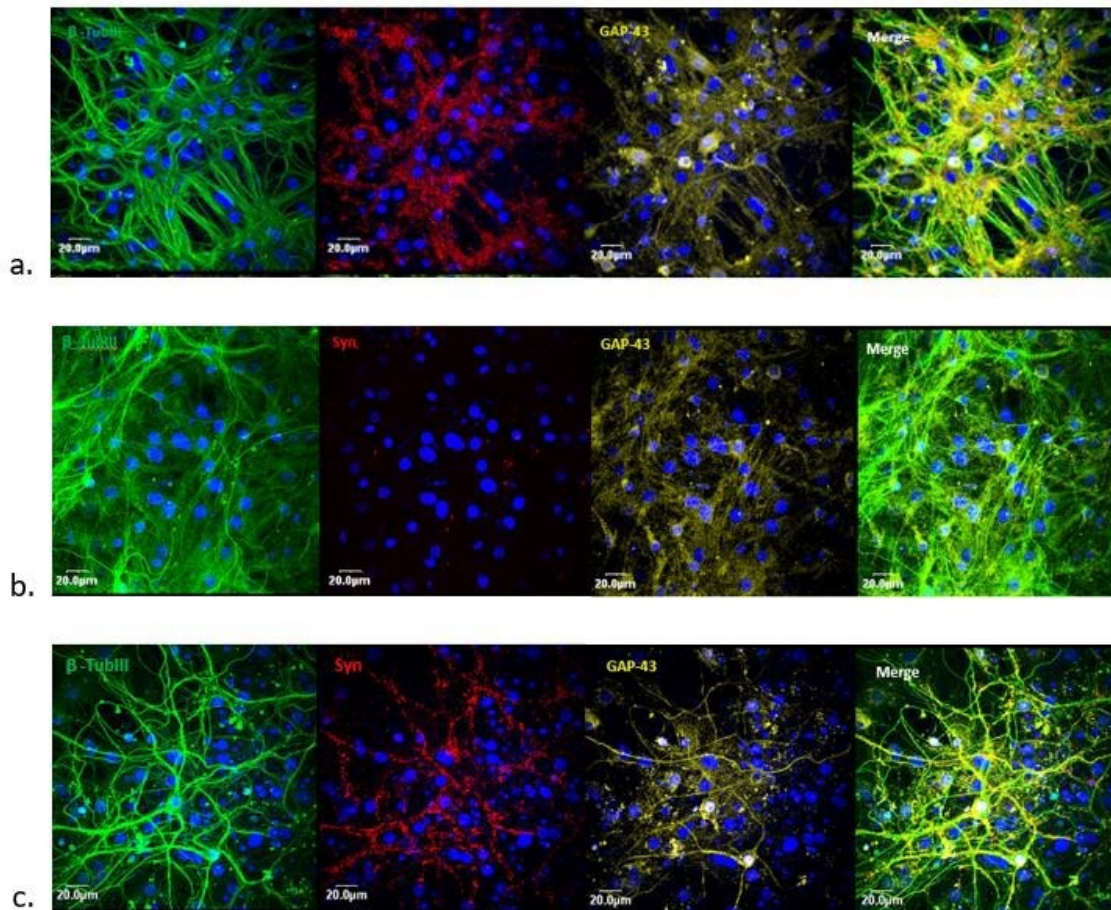


Fig.1.19 Immagini al confocale di neuroni PFC a 28 giorni di coltura. Rappresentazione dei neuroni provenienti da topi a) C57 coltivati in condizioni standard, b) BTBR coltivati in condizioni normali e c) BTBR coltivati in condizioni di chetosi nel sistema a membrana. Le cellule sono marcate per β -Tubulina III (verde), sinaptofisina (rosso), GAP-43 (giallo) e nuclei (DAPI; blu).

Nei neuroni HIP dei BTBR, coltivati nelle condizioni standard, si evidenzia a DIV 21 (Fig.1.20b) un significativo indebolimento nei segnali di Syn e GAP-43, se confrontati ai neuroni di controllo C57 (Fig.1.20a), indicando un possibile deficit nell'organizzazione sinaptica e assonale, nonostante l'organizzazione citoscheletrica non mostri divergenze evidenti. Al contrario, i neuroni BTBR sottoposti a condizioni di chetosi (Fig.1.20c) non mostrano differenze sostanziali rispetto a quelli in condizioni standard (Fig. 1.20b), suggerendo una notevole similitudine nella complessità neuronale.

Nel passaggio al DIV 28, le differenze a livello citoscheletrico e sinaptico si accentuano. Nei neuroni BTBR (Fig.1.21b) in condizioni standard, in linea con le osservazioni nei neuroni prefrontali, emerge una ridotta organizzazione citoscheletrica vs C57 (Fig.1.21a), accompagnata da una significativa diminuzione del segnale di GAP-43. Ciò suggerisce possibili compromissioni nella struttura assonale e sinaptica. Al contrario, la condizione

di chetosi nei neuroni HIP dei BTBR (Fig.1.21c) ha determinato un netto miglioramento sia nell'organizzazione citoscheletrica che sinaptica, riportando la complessità neuronale a livelli simili a quelli osservati nei C57 (Fig1.21a).

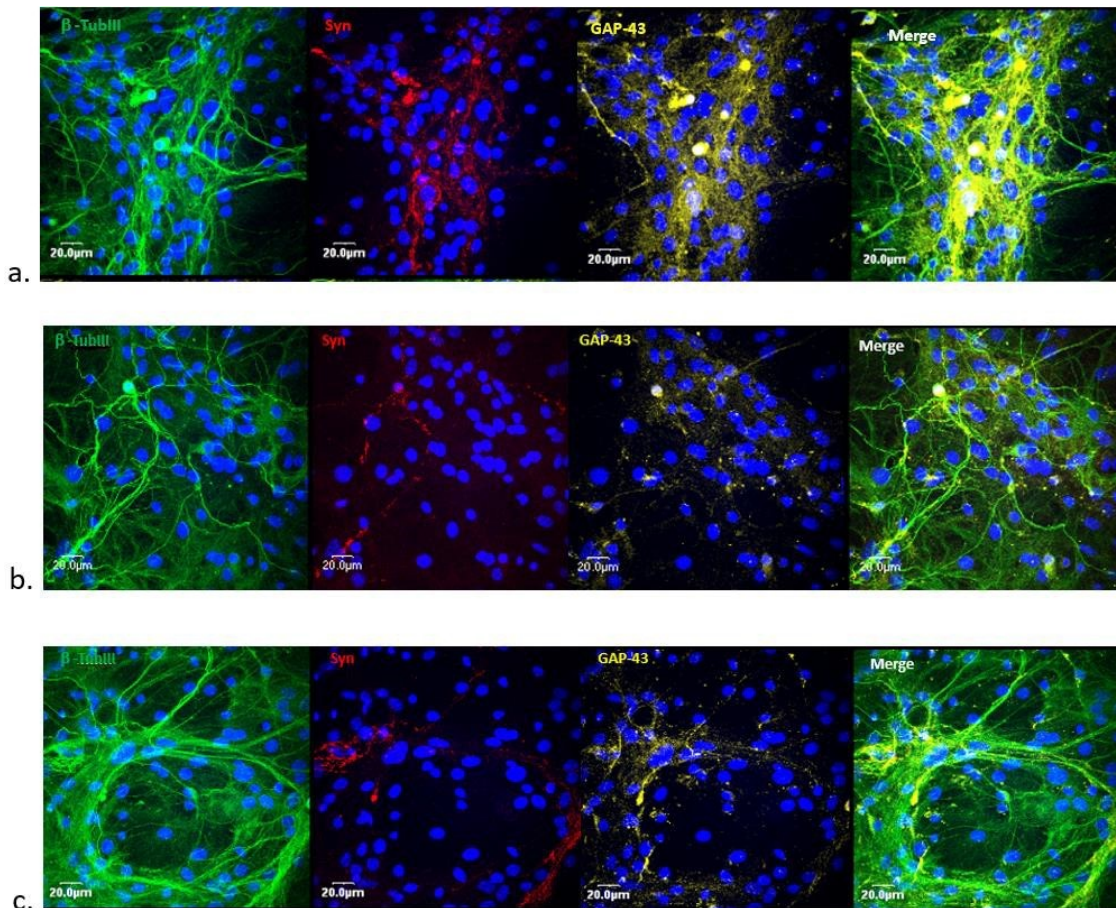


Fig.1.20 Immagini al confocale di neuroni HIP a 21 giorni di coltura. Rappresentazione dei neuroni provenienti da topi a) C57 coltivati in condizioni standard, b) BTBR coltivati in condizioni normali e c) BTBR coltivati in condizioni di chetosi nel sistema a membrana. Le cellule sono marcate per β -Tubulina III (verde), sinaptofisina (rosso), GAP-43 (giallo) e nuclei (DAPI; blu).

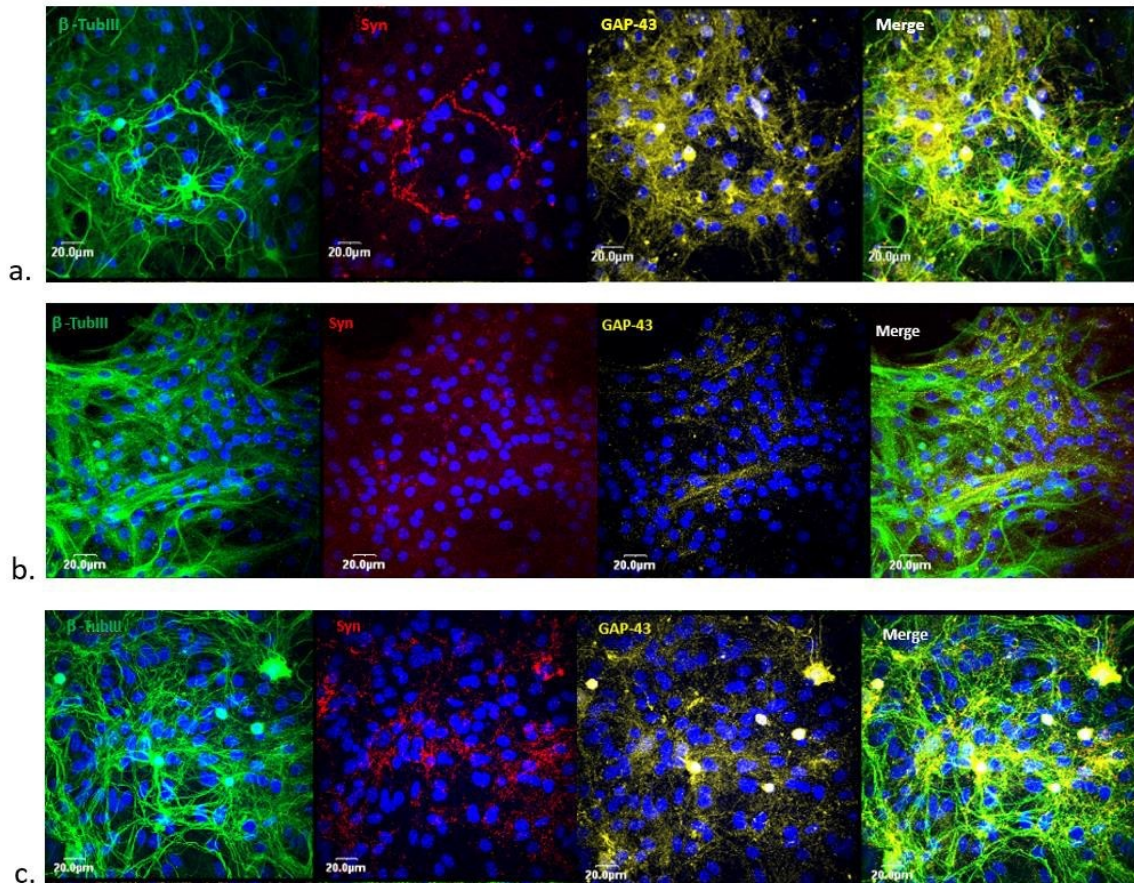


Fig.1.21 Immagini al confocale di neuroni HIP a 28 giorni di coltura. Rappresentazione dei neuroni provenienti da topi a) C57 coltivati in condizioni standard, b) BTBR coltivati in condizioni normali e c) BTBR coltivati in condizioni di chetosi nel sistema a membrana. Le cellule sono marcate per β -Tubulina III (verde), sinaptofisina (rosso), GAP-43 (giallo) e nuclei (DAPI; blu).

1.8 Analisi metabolica

L'attività metabolica delle cellule neuronali, sia dei topi C57 che BTBR, è stata valutata misurando i livelli del BDNF al DIV-7, 21 e 28. In condizioni basali, i livelli di BDNF nei neuroni PFC dei BTBR sono risultati significativamente inferiori sia al DIV 7 ($p < 0.05$) che, in modo più marcato, al DIV 21 ($p < 0.001$) e 28 ($p < 0.01$) rispetto ai C57 (Fig. 1.22a). In modo simile, i livelli di BDNF nell' HIP sono risultati più bassi al DIV 7 ($p < 0.001$) e 21 ($p < 0.05$) nei BTBR rispetto ai C57 (Fig. 1.22b). Al contrario, al DIV 28 è emerso un andamento opposto, con livelli tendenzialmente più elevati nei neuroni HIP dei BTBR, rispetto ai C57 (Fig. 1.22b).

La condizione di chetosi ha prodotto un aumento significativo ed efficace dei livelli di BDNF, osservato sia nei neuroni PFC ($p < 0.001$; Fig. 1.23a) che in quelli HIP ($p < 0.001$; Fig. 1.23b) al DIV 21. Tuttavia, al DIV 28, le differenze nei livelli di BDNF dei neuroni

PFC (Fig. 1.23a) e HIP (Fig. 1.23b) sono state meno pronunciate, sia nelle condizioni standard che in quelle di chetosi.

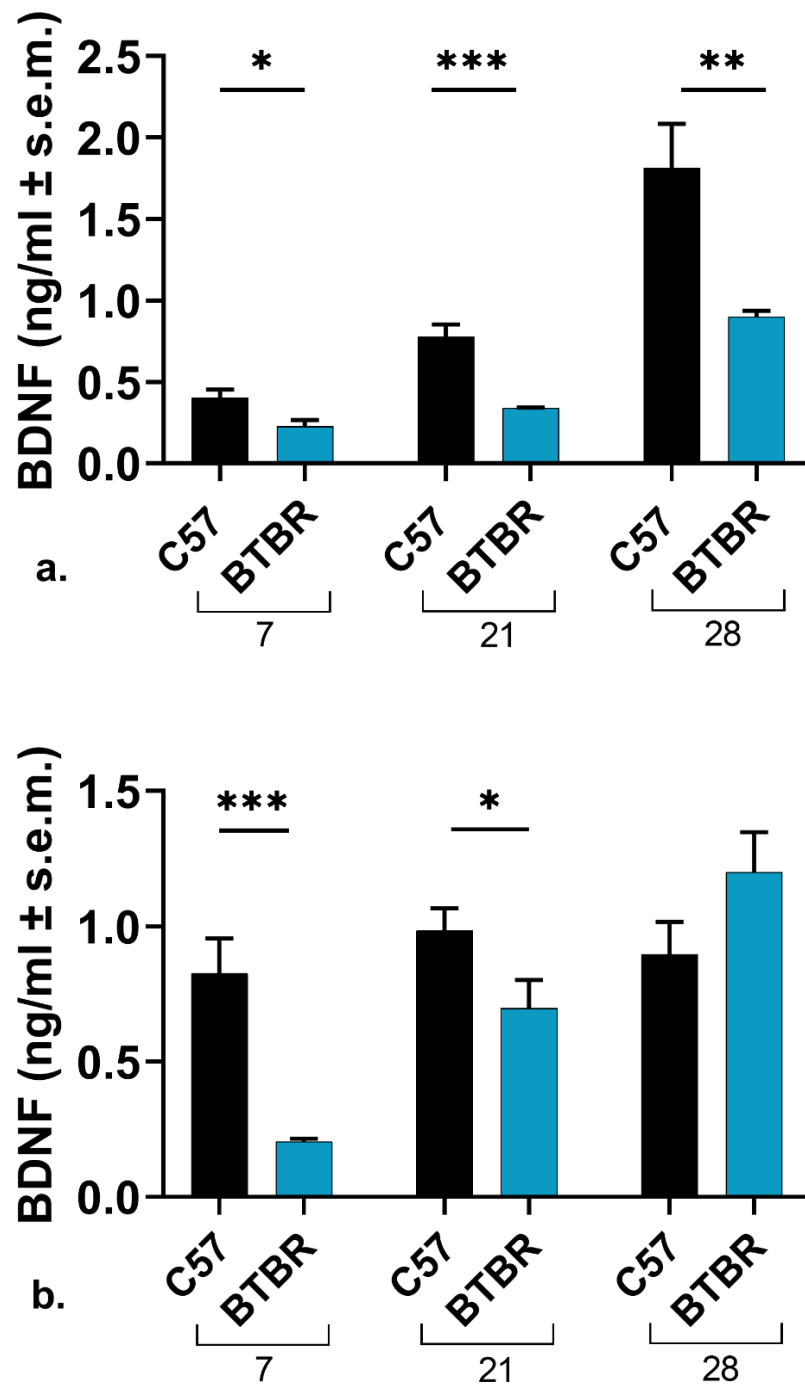


Fig.1.22 Livelli di BDNF secreti dai neuroni PFC (a) e HIP in condizioni basali (b). I dati sono espressi in ng/ml (\pm s.e.m.) al DIV 7, DIV 21 e DIV 28, sia nei topi C57 che BTBR. Analisi statistica: t-test per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

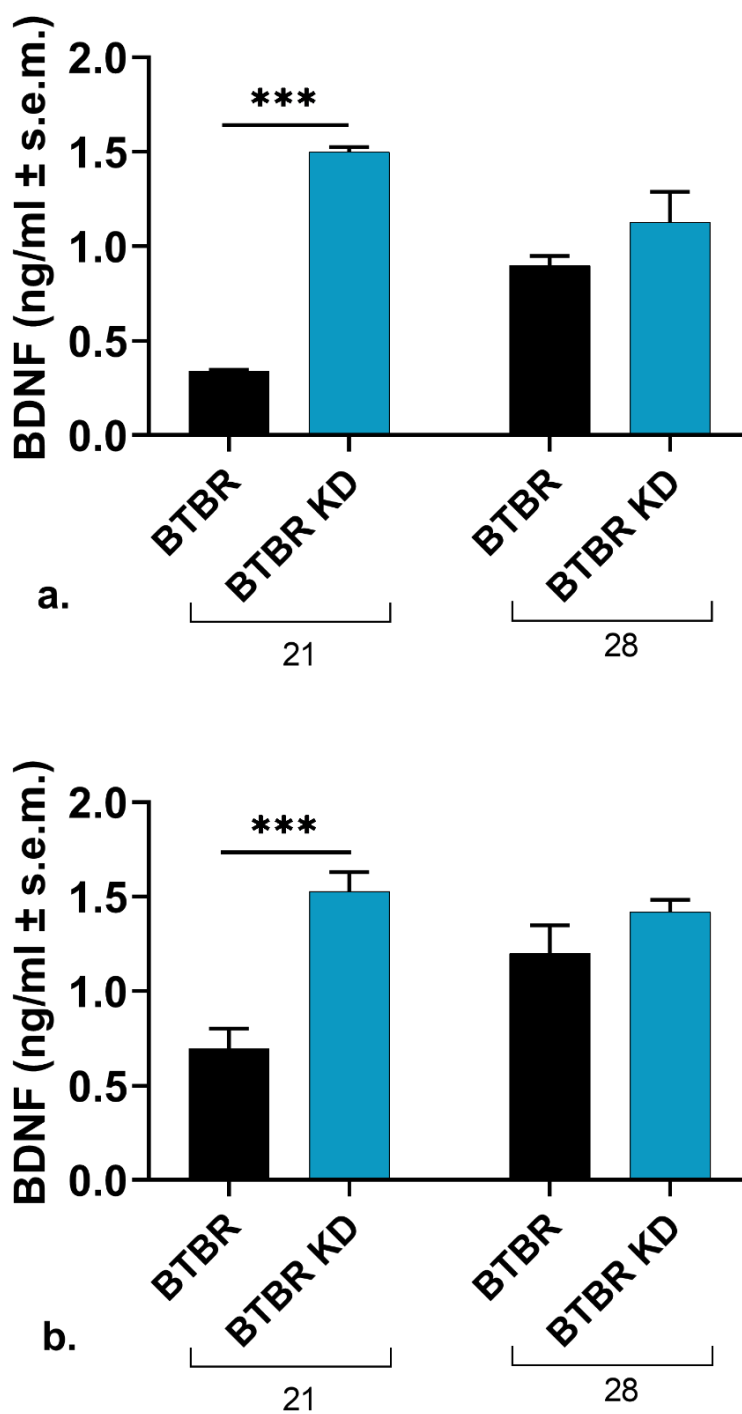


Fig.1.23 Livelli di BDNF secreti dai neuroni PFC (a) e HIP (b). I dati sono espressi in ng/ml (\pm s.e.m.) al DIV 21 e DIV 28 nei neuroni dei BTBR in condizioni basali e di chetosi (BTBR KD). Analisi statistica: t-test per confrontare due variabili quando $P < 0.05$, come riportato nei Materiali e Metodi. *** $p < 0.001$.

DISCUSSIONE

A causa dell'immagine illusoria che ancora si ha dell'eziopatogenesi dell'ASD, un considerevole numero di pazienti non riceve terapie adeguate (Baribeau et al., 2022). L'autismo, con il suo quadro molecolare complesso, presenta notevoli difficoltà nella formulazione di chiare definizioni dei processi patologici che lo sottendono, costituendo così una sfida significativa nell'ambito della ricerca scientifica. Questo progetto di dottorato si è proposto di contribuire ad una maggiore comprensione della fisiopatologia dell'ASD, valutandone i principali aspetti comportamentali, le dinamiche molecolari, la correlazione con il microbiota intestinale, e i possibili approcci terapeutici, nello specifico l'impatto della KD.

L'analisi comportamentale, condotta mediante specifici test, ha confermato l'effetto modulatore della KD sull'esecuzione di alcuni core-symptoms comportamentali. Come già evidenziato in studi precedenti, i topi BTBR hanno mostrato comportamenti simili ai sintomi principali dell'autismo, tra cui deficit sociali e comportamenti ripetitivi pronunciati (Arakawa, 2021; Higuchi et al., 2023). Nel corso dell'indagine condotta in vivo, la KD ha invertito i deficit sociali nei topi BTBR, come indicato dall'aumento significativo del tempo dedicato all'esplorazione e all'interazione con lo stimolo sociale, insieme alla normalizzazione del SI ai livelli del ceppo neurotipico di controllo (C57). In conformità a questi risultati, recentemente è stato suggerito che il trattamento con KD, protratto per 4 settimane, possa rappresentare un'interessante strategia terapeutica per il recupero prolungato dei deficit sociali, in quanto uno dei principali corpi chetonici, ovvero il 3HB, potrebbe agire come inibitore endogeno delle istone deacetilasi, favorendo il ripristino dell'acetilazione istonica nella PFC (Qin et al., 2022). L'efficacia positiva della KD non si è però limitata esclusivamente all'ambito dell'interazione sociale, ma ha esteso il suo impatto anche al comportamento eccessivo di auto-grooming, che nei roditori si configura come una manifestazione fenotipica di comportamenti ripetitivi e stereotipati (Arakawa, 2021). Tali risultati sono coerenti con studi precedenti che hanno evidenziato la capacità della KD di ridurre comportamenti analoghi a quelli osservati nell'ASD (Ruskin et al., 2017), consolidando così la sua plausibile efficacia come approccio nutrizionale per il miglioramento dei sintomi diagnostici dell'autismo.

L'effetto della KD è stato studiato, oltre che sui sintomi "core", anche su alterazioni comportamentali secondarie, essendo quest'ultime molto comuni nell'ASD. È stato infatti interessante notare un miglioramento delle performance cognitive nei topi C57, con un completo rovesciamento dei deficit nei topi BTBR. Questi risultati sono in linea con studi in cui le alterazioni cognitive sono state attenuate, proprio grazie ad interventi

dietetici con KD sia nell'uomo (Desli et al., 2022; Grochowska, K. e Przeliorz, A., 2022) che nei roditori (Xu et al., 2022) in diverse condizioni neurologiche e neurodegenerative. Al contrario, i dati riguardanti i comportamenti simil-ansiosi nei topi BTBR sono eterogenei e, in alcuni casi, oggetto di controversie a seconda del tipo di paradigma comportamentale impiegato (Chao et al., 2018; Sen et al., 2022). Tuttavia, va notato che i topi BTBR presentano livelli più elevati di ormoni dello stress e ciò potrebbe contribuire a spiegarne le incongruenze nei dati relativi ai livelli di ansia (Meyza and Blanchard, 2017). Nel presente studio, i topi BTBR non hanno mostrato differenze, rispetto ai C57, né nel tempo trascorso nella camera luminosa né nel numero di transizioni, anche dopo il trattamento con KD. Tuttavia, nei BTBR trattati è stato registrato un significativo incremento del tempo impiegato per entrare per la prima volta nella zona buia, dimostrando molto probabilmente una riduzione della loro risposta neofobica. Tale riduzione, è stata però meno evidente, rispetto ai C57, indicando che i topi BTBR mostrano un'ansia indotta da novità simile alla selettività alimentare e alla neofobia dei bambini con ASD (Rodrigues et al., 2023).

È importante considerare che le anomalie comportamentali sono frequentemente correlate a stati infiammatori e, sebbene l'infiammazione sia un meccanismo di difesa primario dei tessuti, una sua risposta aberrante può esacerbare i processi di guarigione e peggiorare ulteriormente le condizioni neurologiche. In effetti, nel corso delle malattie neurodegenerative, si osserva un'infiammazione cronica del sistema nervoso a seguito di un rilascio abbondante di citochine pro-infiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF- α da parte di microglia e astrociti iperattivi (Kwon et al., 2020). Anche nel nostro caso, è stato osservato un elevato profilo di citochine pro-infiammatorie nella PFC e nell'HIP, così come nel plasma dei BTBR; ciò è in linea con studi precedenti (Zhao et al., 2021; Theoharides et al., 2016), rafforzando così il coinvolgimento di tali fattori come potenziali biomarcatori per la diagnosi e il trattamento dell'ASD. In particolare, è stato già dimostrato che queste citochine sono legate alla degradazione proteica, alla disfunzione mitocondriale, ai difetti nel trasporto assonale e all'apoptosi, tutti fattori che hanno un impatto negativo sulle funzioni neuronali interferendo con percorsi associati alla socialità e all'attività cognitiva (Kanellopoulos et al., 2020; McFadden et al., 2019). In aggiunta, le cellule immunitarie e le citochine periferiche possono attraversare la barriera emato-encefalica contribuendo alla neuroinfiammazione e alla neurodegenerazione (Takata et al., 2021). La somministrazione della KD ha ridotto i livelli aberranti di IL-1 β , IL-6 e TNF- α , sia nelle aree cerebrali che nel plasma dei topi BTBR. Tali risultati sembrano

suggerire che il trattamento con KD potrebbe svolgere un ruolo cruciale negli stati infiammatori dell'ASD, orchestrando presumibilmente un programma di neuroprotezione simile a quanto riscontrato durante eventi ischemici (Sethuraman et al., 2022). Ipotesi ulteriormente supportata e avvalorata da uno studio che ha recentemente riportato che il 3HB possa fungere da potenziale agente antiinfiammatorio nelle malattie neurodegenerative, agendo attraverso il recettore accoppiato a proteina G 109A e disattivando il complesso dell'inflammasoma nella microglia (Jayashankar et al., 2023). È noto come lo stress ossidativo sia una caratteristica chiave di molte malattie neurologiche, incluso l'ASD, durante il quale si associa ad un aumento dei ROS e a una riduzione della capacità antiossidante (Liu et al., 2022). Non sorprende quindi che, nel corso della seguente indagine, siano stati osservati aumenti significativi nei livelli di TBARS, insieme a una diminuzione dell'attività della SOD sia nella PFC che nell'HIP dei BTBR. Queste alterazioni emergono come fattori rilevanti, in quanto potrebbero attivare vie di segnalazione intracellulari responsabili delle aberrazioni comportamentali e dell'infiammazione che, come già riportato, è risultata essere molto elevata a livello cerebrale e periferico nei BTBR. Infatti, concentrazioni elevate di ROS possono creare circoli viziosi, mantenendo un'elevata secrezione di citochine e chemochine pro-infiammatorie, specialmente in regioni cerebrali associate all'ASD, come la PFC e l'HIP (Liu et al., 2022). Questi risultati confermano l'azione antiossidante di questa dieta, analogamente a quanto si osserva nelle malattie neurodegenerative. L'azione antiossidante della KD è stata, infatti, già comprovata nel ritardare l'insorgenza delle malattie neurodegenerative legate all'età, attraverso un programma neuroprotettivo che include effetti antiossidanti, antinfiammatori e di miglioramento nel metabolismo energetico (Kovács et al., 2021). Elemento prominente in questo contesto è proprio il BHB, il principale corpo chetonico derivante dalla KD. Questo composto emerge come un regolatore cruciale, inibendo l'inflammasoma nelle cellule mieloidi e svolgendo così un ruolo chiave nei processi infiammatori legati all'età (Goldberg et al. 2023). La KD, tuttavia, non si limita a questa azione. Infatti, attivando l'ossidazione degli acidi grassi nel fegato, induce la formazione di acetil-CoA nei mitocondri, avviando la produzione di corpi chetonici. Questi giocano un ruolo fondamentale nel migliorare il metabolismo energetico, attraverso un aumento della produzione di ATP e una normalizzazione della funzione mitocondriale, mediata dalla stimolazione della loro biogenesi e dalla riduzione dello stress ossidativo. I benefici, in una catena causale, contribuiscono a mitigare la morte neuronale. Va sottolineato, inoltre, che i corpi chetonici esercitano un'azione di

regolazione sui neurotrasmettitori, inibiscono l'attivazione della via di segnalazione di mTOR e influenzano la composizione del microbiota intestinale (Li et al. 2021). Per cui, vista la complessità di interazione della KD, emerge con chiarezza l'utilità di condurre approfondimenti specifici su questi meccanismi nel contesto dell'autismo.

Relativamente all'ultima condizione menzionata, l'intervento dietetico con la KD si è dimostrato utile nel determinare anche una significativa modulazione della composizione del microbiota intestinale nei topi BTBR. Da una prima osservazione, la KD ha influenzato l' α diversità, riducendo la diversità microbica nei topi C57 e aumentandola nei topi BTBR. In aggiunta, la KD ha alterato la β diversità in entrambi i ceppi, riducendo notevolmente la separazione nel clustering e dimostrando la sua capacità di modificare le strutture della comunità biologica nell'intestino. In questo contesto, particolarmente rilevanti sono i dati ottenuti a livello tassonomico che hanno evidenziato, sia nei BTBR che nei C57, un significativo aumento dei batteri appartenenti al genere *Akkermansia* e *Blautia* in seguito all'assunzione della KD. Questo aumento potrebbe essere la chiave per comprendere l'andamento opposto che è stato osservato nell' α diversità tra i due ceppi di topi coinvolti. In genere, la disbiosi si accompagna a una riduzione della diversità del microbiota (Kim et al., 2020), ed effettivamente nei BTBR è risultata significativamente ridotta rispetto ai C57. Tuttavia, la KD ha migliorato l' α diversità nei BTBR, mentre nei C57 pur riducendola, si è registrato un aumento dei batteri *Akkermansia* e *Blautia*. Tale fenomeno, influenzando la composizione complessiva del microbiota, potrebbe giustificare la riduzione nel ceppo neurotipico. Pertanto, i batteri *Akkermansia* e *Blautia* hanno dimostrato svolgere funzioni neuromodulatrici positive con conseguenti effetti sul comportamento. Ad esempio, è stato dimostrato che la somministrazione del ceppo *Blautia stercoris* MRx0006 è in grado di migliorare gli esiti comportamentali rilevanti per l'ASD, tra cui la socialità e i comportamenti stereotipati (Sen et al., 2022). Inoltre, *Akkermansia*, aumentando la produzione di acido chinurenico, sembra contribuire al miglioramento cognitivo (Kaviyarasan et al., 2022). *Akkermansia* è stato anche segnalato come alleviatore dell'infiammazione sistemica, riducendo la concentrazione di marcatori pro-infiammatori e incrementando la produzione di acidi grassi a catena corta, principalmente acetato e propionato, essenziali per la comunicazione intestino-cervello e per il mantenimento dell'omeostasi (Akhtar et al., 2022). Contestualmente, l'analisi tassonomica ha indicato che i livelli di *Lactobacillus* erano notevolmente più alti nei topi del ceppo BTBR rispetto a quelli del ceppo C57 e che l'implementazione della KD ha completamente neutralizzato questa differenza. Tale osservazione è consistente con i dati

di letteratura che riportano un'eccedenza di *Lactobacillus* sia nel microbiota intestinale dei pazienti affetti da ASD che nei modelli animali (Alamoudi et al., 2022; Avolio et al., 2022). I *Lactobacillus* sono generalmente riconosciuti per i loro benefici come probiotici, ciononostante vi sono evidenze che li correlano a fenomeni di stress ossidativo e a impatti negativi sul sistema immunitario (Lee et al., 2021; Zegarra-Ruiz et al., 2018). Inoltre, la KD è stata associata a un aumento nell'abbondanza di *Lactobacilli* (Kaviyarasan et al., 2022), in contrasto con quanto osservato nei topi BTBR durante la presente indagine. Questi risultati sottolineano la complessità dell'interazione tra il microbiota intestinale e la fisiologia degli organismi evidenziando, in questo contesto specifico, l'importanza di comprendere il ruolo di ceppi specifici nella comunicazione intestino-cervello.

A tale scopo, lo studio condotto presso l'Università di Rouen ha fornito ulteriori dettagli su questa dinamica. La somministrazione dei ceppi batterici *L. salivarius* - LS7892, *L. gasseri* - LG6410, *L. plantarum* - LP14D, *L. reuteri* - LR92, e *L. camelliae* - LC LMG 24277, ha prodotto impatti differenziati sul comportamento dei topi BTBR. La somministrazione intragastrica dei ceppi *L. salivarius* - LS7892 e *L. gasseri* - LG6410 ha migliorato l'interazione sociale nei topi BTBR. Inoltre, mentre LS7892 ha mantenuto pressoché stabile il livello di ansia, LG6410 ha manifestato effetti positivi sull'ansia. In contrasto, i ceppi LP14D e LR92 hanno prodotto benefici nell'interazione sociale, ma hanno mostrato effetti avversi sull'ansia. Da notare che LC LMG 24277 non solo ha peggiorato l'interazione sociale ma ha anche influenzato negativamente i livelli di ansia. Questa diversità tra i ceppi riflette osservazioni precedenti di risposte differenziate, anche all'interno di batteri appartenenti allo stesso genere. Ciò sottolinea l'importanza di esaminare dettagliatamente l'azione di ceppi specifici al fine di acquisire una comprensione completa dei loro impatti sulle risposte fisiologiche dell'organismo ospite. Ad esempio, l'utilizzo di ceppi specifici di *L. salivarius* e di *L. gasseri*, già documentato in bibliografia, modula positivamente i livelli di interazione sociale e di ansia (Pochakom et al., 2022; Nishida et al., 2019). Similmente, alcuni ceppi di *L. plantarum* e *L. reuteri*, in studi preclinici, hanno migliorato l'interazione sociale e, in contrasto con quanto osservato per quelli utilizzati in questo studio, ridotto i livelli di ansia (Guo et al., 2022; Sun et al., 2021; Sgritta et al., 2019; Mackos et al., 2013).

Di conseguenza, le variazioni comportamentali sembrano essere strettamente correlate alla capacità dei batteri intestinali di modulare i meccanismi molecolari coinvolti nelle risposte biologiche. In particolare, la loro influenza sull'ossitocina, un neuropeptide fondamentale per la regolazione del comportamento sociale e per l'attenuazione

dell'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, si configura come un punto focale, soprattutto considerando l'importanza di tali aspetti nell'autismo (De Cagna et al., 2019; Bernaerts et al., 2020). Il trattamento con LS7892 ha esercitato effetti positivi nei topi BTBR, evidenziando miglioramenti sia nel comportamento sociale che nei livelli di ansia. Questi risultati, combinati con il potenziale aumento dell'ossitocina e delle IgG reattive ad essa, suggeriscono una possibile connessione tra l'azione di LS7892, la modulazione dell'ossitocina e le risposte comportamentali osservate nei BTBR. Questo quadro complessivo apre la strada a un'interessante linea di indagine, suggerendo che il ceppo batterico LS7892 potrebbe esercitare il suo impatto positivo attraverso un meccanismo che coinvolge la regolazione dell'ossitocina e delle relative IgG. Questa ipotesi è supportata dalla recente scoperta dell'influenza delle IgG sull'interazione dell'ossitocina con il suo recettore, con conseguente impatto sul comportamento aggressivo (Henning Værøy et al., 2023). Inoltre, l'identificazione dell'origine antigenica delle IgG reattive ai neuropeptidi nelle proteine prodotte dai batteri del microbiota intestinale e la capacità dei *Lactobacilli* di produrre molecole segnalatrici che favoriscono il rilascio di ossitocina forniscono ulteriori elementi a favore di questa connessione (Tennoune et al., 2014; Varian et al., 2017).

L'analisi in vitro ha fornito dettagli rilevanti, sia dal punto di vista morfologico che metabolico. Nei neuroni dei BTBR, coltivati in condizioni standard, si sono manifestati segni di una compromessa maturazione neuronale, evidenziati da un citoscheletro e una rete sinaptica meno organizzati nelle regioni della PFC e dell'HIP. Questi risultati sono in linea con il concetto secondo cui le modifiche morfologiche e strutturali nelle cellule neuronali conducono ad anomalie neuroanatomiche, più o meno visibili, presenti nei disturbi dello sviluppo neurologico, compreso l'autismo (Falougy et al., 2019). L'osservazione di un citoscheletro meno organizzato nei neuroni dei BTBR sottolinea l'importanza di tali alterazioni, essendo esso direttamente coinvolto nella crescita neuronale. Durante questa fase, le membrane cellulari si espandono e il citoscheletro subisce una riorganizzazione, facilitando l'allungamento delle estensioni neuronali e la formazione di connessioni sinaptiche (Dent et al., 2011). La riorganizzazione del citoscheletro neuronale è implicata in diverse attività cognitive e comportamentali e le sue alterazioni possono contribuire allo sviluppo di sintomi autistici (Liaci et al., 2021; Muñoz-Castañeda et al., 2018; Lasser et al., 2018). In aggiunta, diverse evidenze scientifiche collegano la disfunzione della tubulina all'aumento del rischio di malattie neuropsichiatriche tra cui il disturbo depressivo, la schizofrenia e l'epilessia (Rodrigues-

Amorim et al., 2020; Singh et al., 2020; Schröter et al., 2022). Ne deriva che le alterazioni delle proteine e delle vie di segnalazione coinvolte nell'organizzazione citoscheletrica potrebbero svolgere un ruolo significativo nell'autismo e nelle comorbilità psichiatriche ad esso associate (Gaśowska-Dobrowolska et al., 2021).

È interessante notare che nei neuroni dei topi BTBR, accanto alle alterazioni citoscheletriche, sono state osservate variazioni nell'intensità di segnale di GAP 43, che regola la crescita neuritica e la plasticità sinaptica, e della Syn, coinvolta nella formazione delle vescicole sinaptiche (Qiang et al., 2022; Sóki et al., 2022). Ciò potrebbe suggerire la possibilità di una correlazione reciproca tra tali alterazioni. Tale ipotesi è supportata dal fatto che 1. il citoscheletro è intimamente interconnesso con queste proteine, influenzando la formazione e la stabilità delle sinapsi e regolando la distribuzione delle proteine sinaptiche; 2. la dinamica del citoscheletro è, a sua volta, modulata dalle proteine sinaptiche che interagiscono con i filamenti di actina e microtubuli per regolarne l'organizzazione e la funzione (Dutta et al., 2021; Parato e Bartolini, 2021). Inoltre, la riduzione di GAP 43 ha dimostrato provocare un aumento dell'eccitazione neuronale che è correlata all'iperattività e a comportamenti simili all'autismo (Zaccaria et al., 2010). Le alterazioni di GAP43 sono anche associate alla gravità della demenza nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer (Qiang et al., 2022). In aggiunta, le evidenze attuali provenienti da studi recenti su modelli murini indicano i deficit della Syn come un indicatore fondamentale dei cambiamenti sinaptici comunemente riscontrati nell'autismo, che sono strettamente interconnessi con i neuroni e la plasticità strutturale (Traetta et al., 2021; Tripathi et al., 2024). Conseguentemente, lo studio di tali correlazioni potrebbe contribuire a comprendere meglio i meccanismi sottostanti alle alterazioni neurologiche osservate nell'ASD.

La chetosi ha influenzato positivamente la morfologia cellulare, migliorando l'organizzazione citoscheletrica e sinaptica sia nei neuroni HIP che PFC dei BTBR. Questo miglioramento potrebbe avere ricadute favorevoli sui meccanismi legati ai neurotrasmettitori e agli ioni, contribuendo così a promuovere una migliore omeostasi neuronale e facilitando l'acquisizione di un modello e un'organizzazione simili a quelli osservati nei neuroni del ceppo neurotipico (Gzielo et al., 2019). Ipotesi che trova supporto nei risultati di uno studio clinico nel quale è stato osservato che gli interventi dietetici favorevoli all'utilizzo di corpi chetonici, associati all'incremento dell'energia disponibile, contribuiscono in modo significativo alla stabilizzazione della rete neuronale, emergendo così come potenziali modulatori nella configurazione della rete cerebrale

(Mujica-Parodi et al., 2020). Anche nel nostro caso, quindi, questa stabilizzazione potrebbe essere attribuita proprio all'effetto della KD sul metabolismo energetico dell'ATP, con conseguente aumento dell'efficienza energetica a livello mitocondriale.

Nel contesto della neuroplasticità, i fattori neurotrofici, con particolare riferimento al BDNF, assumono un ruolo centrale nella regolazione del comportamento, sia in situazioni normali che patologiche (Nasrolahi et al., 2022). Il BDNF, ampiamente distribuito nel sistema nervoso centrale, riveste un ruolo cruciale nella neurogenesi, sinaptogenesi, tutela neuronale e regolazione delle dinamiche mnemoniche (Ilchibaeva et al., 2023; Colucci-D'Amato et al., 2020). Nell'ambito di questo studio, sono state riscontrate variazioni significative nei livelli di BDNF nei neuroni delle regioni cerebrali d'interesse, rispetto al ceppo neurotipico. In particolare, si è evidenziata una riduzione dei livelli di BDNF nei neuroni della PFC nei diversi stadi di sviluppo. Nei neuroni dell'HIP, invece, è stata osservata una dinamica differente, con una netta diminuzione al DIV 7 e 21, seguita da un tendenziale aumento al DIV 28. Aumenti, riduzioni o assenza di differenze nei livelli di BDNF, sono stati osservati sia nei pazienti affetti che nei modelli animali (Han et al., 2022; Robinson-Agramonte et al., 2022; Reim e Schmeisser, 2017). In aggiunta, differenze nei livelli del BDNF sono state riscontrate anche tra diverse aree cerebrali, come riportato in uno studio che ha evidenziato la down-regulation di diverse varianti di splicing dell'mRNA di questa neurotrofina nella neocorteccia, ma non nell'HIP di un modello roditore di autismo (Zunino et al., 2016). Questa variabilità, sia in termini di regione cerebrale che di dinamica temporale, potrebbe essere un elemento chiave nell'interpretare l'eterogeneità dei fenotipi clinici osservata nella sindrome in questione. Tale ipotesi trova conferma in uno studio preclinico, il quale ha documentato una risposta differenziale del BDNF, in relazione alla gravità del deficit neurocomportamentale (Kasarpalkar et al., 2014).

La condizione di chetosi ha determinato un significativo aumento nei livelli di BDNF nei neuroni HIP e PFC dei BTBR. Questi risultati sono in linea con le evidenze che suggeriscono che il BDNF sia un mediatore chiave delle risposte adattative del cervello e dei sistemi periferici agli stimoli bioenergetici (Marosi e Mattson, 2014). Inoltre, l'effetto "up-modulante" della condizione di chetosi osservato sul BDNF nei BTBR potrebbe derivare dall'influenza del BHB sulla respirazione mitocondriale e sul fattore di trascrizione "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer delle cellule B" (NF- κ B). Ciò può indirettamente contribuire all'aumento della sintesi del fattore neurotrofico BDNF attraverso l'attivazione dell'istone acetiltransferasi p300/EP300, come suggerito da studi

precedenti (Marosi et al., 2016). Pertanto, l'up-modulazione del BDNF indotta dalla chetosi potrebbe aver contribuito ai miglioramenti morfologici osservati in termini di complessità della rete neuronale.

CONCLUSIONI

In sintesi, la KD si è configurata come un approccio multifunzionale nell'ambito dell'ASD, favorendo effetti antinfiammatori sia a livello periferico che cerebrale mediante la significativa modulazione di importanti citochine pro-infiammatorie e dello stress ossidativo, grazie alle sue capacità antiossidanti e alla riduzione della perossidazione lipidica. Inoltre, la KD ha influenzato la composizione del microbiota intestinale, aumentando l'abbondanza relativa di batteri associati ad effetti neuroprotettivi e normalizzando i livelli aberranti dei *Lactobacilli* nei BTBR. Questi effetti potrebbero riflettersi nei risultati positivi osservati a livello comportamentale e molecolare, rimarcando l'importanza di considerare l'interazione tra l'asse intestino-cervello e l'ASD. A supporto di ciò, lo screening di 5 ceppi di *Lactobacilli* ha mostrato impatti differenziati sul comportamento, sottolineando la necessità di esaminare la diversità del microbiota nel contesto dell'autismo e indicando il ceppo LS7892 come un ottimo candidato per la gestione della sintomatologia di questa sindrome. Inoltre, l'analisi in vitro ha rivelato una rete neuronale compromessa nei BTBR, evidenziando interazioni tra cambiamenti citoscheletrici e regolazione sinaptica, insieme a importanti dinamiche nell'espressione del BDNF. È degno di nota che la chetosi abbia agito in modo significativo come modulatore della rete neuronale, orchestrando e stabilizzando le connessioni neuronali ad una configurazione simile a quella osservata nei neuroni del ceppo neurotipico e aumentando significativamente i livelli del BDNF. Questa scoperta offre nuove prospettive per la comprensione delle basi fisiopatologiche dell'ASD dimostrando, al contempo, l'azione della chetosi nella riorganizzazione neuronale.

In conclusione, il presente progetto di ricerca ha fornito evidenze consistenti sull'efficacia della chetosi nel mitigare sia i sintomi che le alterazioni molecolari associate all'ASD nel modello BTBR. Contestualmente, ha contribuito a rivelare nuovi dettagli molecolari fondamentali, offrendo basi solide per lo sviluppo di nuove terapie nell'ambito di questa sindrome.

Tuttavia, emerge la necessità di ulteriori approfondimenti. I limiti della mia ricerca includono la mancanza di un'analisi dettagliata dei pathways sottostanti gli effetti

antinfiammatori della KD, così come la mancata valutazione della barriera intestinale, della BBB e del profilo metabolomico. Inoltre, sarebbe auspicabile monitorare gli effetti benefici a lungo termine. Questi aspetti risultano cruciali per comprendere appieno le connessioni tra la KD e i sintomi dell'autismo, nonché gli aspetti molecolari legati alla sindrome stessa. Di conseguenza, coerentemente con i risultati ottenuti, suggerisco che futuri studi si concentrino su questi aspetti. Inoltre, una prospettiva promettente da esplorare è l'utilizzo di supplementi e approcci dietetici, volti a simulare la chetosi, integrando probiotici, prebiotici o simbiotici. Tale strategia, come evidenziato da uno studio recente, ha ridotto significativamente le crisi epilettiche nei topi, ritardandone l'insorgenza, rispetto a quelli che seguono solo la KD o una dieta normale. In particolare, il simbiotico utilizzato non solo ha influenzato positivamente il profilo lipidico, con una riduzione dei livelli di trigliceridi e colesterolo, ma ha anche portato ad un aumento dei livelli di GABA (Eor et al., 2021). Questi risultati suggeriscono che un approccio integrato, basato su una chetosi simulata e sull'uso mirato di modulatori del microbiota intestinale, potrebbe potenziare gli effetti della KD e al contempo ridurre gli effetti collaterali legati alla sua poca tollerabilità, rappresentando una potenziale strategia per lo sviluppo di terapie efficaci per l'ASD.

BIBLIOGRAFIA

- Abruzzo, P. M., Matté, A., Bolotta, A., Federti, E., Ghezzi, A., Guarnieri, T., Marini, M., Posar, A., Siciliano, A., De Franceschi, L., & Visconti, P. (2019). Plasma peroxiredoxin changes and inflammatory cytokines support the involvement of neuro-inflammation and oxidative stress in Autism Spectrum Disorder. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 332. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2076-z>
- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 76(3), 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Ahmad, S. F., Ansari, M. A., Nadeem, A., Bakheet, S. A., Al-Ayadhi, L. Y., & Attia, S. M. (2019). Elevated IL-16 expression is associated with development of immune dysfunction in children with autism. *Psychopharmacology*, 236(2), 831–838. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5120-4>
- Ahn, Y., Narous, M., Tobias, R., Rho, J. M., & Mychasiuk, R. (2014a). The ketogenic diet modifies social and metabolic alterations identified in the prenatal valproic acid model of autism spectrum disorder. *Developmental Neuroscience*, 36(5), 371–380. <https://doi.org/10.1159/000362645>
- Ait-Bali, Y., Ba-M'hamed, S., Gambarotta, G., Sassoè-Pognetto, M., Giustetto, M., & Bennis, M. (2020). Pre- and postnatal exposure to glyphosate-based herbicide causes behavioral and cognitive impairments in adult mice: Evidence of cortical and hippocampal dysfunction. *Archives of Toxicology*, 94(5), 1703–1723. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02677-7>
- Akhtar, M., Chen, Y., Ma, Z., Zhang, X., Shi, D., Khan, J. A., & Liu, H. (2022). Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 8, 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.11.005>
- Alamoudi, M. U., Hosie, S., Shindler, A. E., Wood, J. L., Franks, A. E., & Hill-Yardin, E. L. (2022). Comparing the Gut Microbiome in Autism and Preclinical Models: A Systematic Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 905841. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.905841>
- Ali, A., Vasileva, S., Langguth, M., Alexander, S., Cui, X., Whitehouse, A., McGrath, J. J., & Eyles, D. (2019). Developmental Vitamin D Deficiency Produces Behavioral

Phenotypes of Relevance to Autism in an Animal Model. *Nutrients*, 11(5), 1187. <https://doi.org/10.3390/nu11051187>

Ali, Z. A., Yasseen, A. A., McAllister, K. A., Al-Dujaili, A., Al-Karaquilly, A. J., & Jumaah, A. S. (2022). SNP-PCR genotyping links alterations in the GABAA receptor (GABRG3: Rs208129) and RELN (rs73670) genes to autism spectrum disorder among paediatric Iraqi Arabs. *Molecular Biology Reports*, 49(7), 6019–6028. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07388-z>

Al-Mamari, W., Idris, A. B., Al-Zadjali, A. A., Jalees, S., Murthi, S., Al-Jabri, M., Gabr, A., & Fombonne, E. (2021). Parental Age and the Risk of Autism Spectrum Disorder in Oman: A case-control study. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 21(3), 465–471. <https://doi.org/10.18295/squmj.4.2021.024>

Almehmadi, K. A., Tsilioni, I., & Theoharides, T. C. (2020). Increased Expression of miR-155p5 in Amygdala of Children With Autism Spectrum Disorder. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 13(1), 18–23. <https://doi.org/10.1002/aur.2205>

Alò, R., Olivito, I., Fazzari, G., Zizza, M., Di Vito, A., Avolio, E., Mandalà, M., Bruno, R., Barni, T., Canonaco, M., & Facciolo, R. M. (2021). Correlation of distinct behaviors to the modified expression of cerebral Shank1,3 and BDNF in two autistic animal models. *Behavioural Brain Research*, 404, 113165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113165>

Al-Otaish, H., Al-Ayadhi, L., Bjørklund, G., Chirumbolo, S., Urbina, M. A., & El-Ansary, A. (2018). Relationship between absolute and relative ratios of glutamate, glutamine and GABA and severity of autism spectrum disorder. *Metabolic Brain Disease*, 33(3), 843–854. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0186-6>

Andreasen, J. J., Tobiasen, B. B., Jensen, R. C., Boye, H., Jensen, T. K., Bilenberg, N., Andersen, M. S., & Glintborg, D. (2023). Maternal cortisol in 3rd trimester is associated with traits of neurodevelopmental disorder in offspring. *Odense Child Cohort. Psychoneuroendocrinology*, 154, 106293. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2023.106293>

Ang, Q. Y., Alexander, M., Newman, J. C., Tian, Y., Cai, J., Upadhyay, V., Turnbaugh, J. A., Verdin, E., Hall, K. D., Leibel, R. L., Ravussin, E., Rosenbaum, M., Patterson, A. D., & Turnbaugh, P. J. (2020). Ketogenic Diets Alter the Gut Microbiome Resulting in

Decreased Intestinal Th17 Cells. *Cell*, 181(6), 1263-1275.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.027>

Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>

Arakawa, H. (2021). Implication of the social function of excessive self-grooming behavior in BTBR T+Itpr3tf/J mice as an idiopathic model of autism. *Physiology & Behavior*, 237, 113432. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113432>

Arrant, A. E., Schramm-Sapyta, N. L., & Kuhn, C. M. (2013). Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behavioural Brain Research*, 256, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.035>

Atia, A. A., Ashour, R. H., Zaki, M. M., Rahman, K. M., & Ramadan, N. M. (2023). The comparative effectiveness of metformin and risperidone in a rat model of valproic acid-induced autism, Potential role for enhanced autophagy. *Psychopharmacology*, 240(6), 1313–1332. <https://doi.org/10.1007/s00213-023-06371-1>

Avolio, E., Olivito, I., Rosina, E., Romano, L., Angelone, T., De Bartolo, A., Scimeca, M., Bellizzi, D., D'Aquila, P., Passarino, G., Alò, R., Facciolo, R. M., Bagni, C., De Lorenzo, A., & Canonaco, M. (2022). Modifications of Behavior and Inflammation in Mice Following Transplant with Fecal Microbiota from Children with Autism. *Neuroscience*, 498, 174–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.06.038>

Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. N. (2016). Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(10), 1321. <https://doi.org/10.3390/molecules21101321>

Bal, V. H., Kim, S.-H., Fok, M., & Lord, C. (2019). Autism spectrum disorder symptoms from ages 2 to 19 years: Implications for diagnosing adolescents and young adults. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 12(1), 89–99. <https://doi.org/10.1002/aur.2004>

Baribeau, D., Vorstman, J., & Anagnostou, E. (2022). Novel treatments in autism spectrum disorder. *Current Opinion in Psychiatry*, 35(2), 101–110. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000775>

- Baron-Cohen, S. (2002). The extreme male brain theory of autism. *Trends in Cognitive Sciences*, 6(6), 248–254. [https://doi.org/10.1016/s1364-6613\(02\)01904-6](https://doi.org/10.1016/s1364-6613(02)01904-6)
- Baron-Cohen, S., Auyeung, B., Nørgaard-Pedersen, B., Hougaard, D. M., Abdallah, M. W., Melgaard, L., Cohen, A. S., Chakrabarti, B., Ruta, L., & Lombardo, M. V. (2015). Elevated fetal steroidogenic activity in autism. *Molecular Psychiatry*, 20(3), 369–376. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.48>
- Baron-Cohen, S., Murphy, L., Chakrabarti, B., Craig, I., Mallya, U., Lakatošová, S., Rehnstrom, K., Peltonen, L., Wheelwright, S., Allison, C., Fisher, S. E., & Warrier, V. (2014). A genome wide association study of mathematical ability reveals an association at chromosome 3q29, a locus associated with autism and learning difficulties: A preliminary study. *PloS One*, 9(5), e96374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096374>
- Baron-Cohen, S., Tsompanidis, A., Auyeung, B., Nørgaard-Pedersen, B., Hougaard, D. M., Abdallah, M., Cohen, A., & Pohl, A. (2020). Foetal oestrogens and autism. *Molecular Psychiatry*, 25(11), 2970–2978. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0454-9>
- Barry, D., Ellul, S., Watters, L., Lee, D., Haluska, R., & White, R. (2018). The ketogenic diet in disease and development. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 68, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.04.005>
- Barth, C., & Bishop, N. (2014). Autism: Comparative Genomics and Interactomics. In V. B. Patel, V. R. Preedy, & C. R. Martin (Eds.), *Comprehensive Guide to Autism* (pp. 2853–2880). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4788-7_173
- Barua, S., Chadman, K. K., Kuizon, S., Buenaventura, D., Stapley, N. W., Ruocco, F., Begum, U., Guariglia, S. R., Brown, W. T., & Junaid, M. A. (2014). Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. *PloS One*, 9(7), e101674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101674>
- Barzegar, M., Afghan, M., Tarmahi, V., Behtari, M., Rahimi Khamaneh, S., & Raeisi, S. (2021). Ketogenic diet: Overview, types, and possible anti-seizure mechanisms. *Nutritional Neuroscience*, 24(4), 307–316. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1627769>
- Basciani, S., Camajani, E., Contini, S., Persichetti, A., Risi, R., Bertoldi, L., Strigari, L., Prossomariti, G., Watanabe, M., Mariani, S., Lubrano, C., Genco, A., Spera, G., & Gnassi,

- L. (2020). Very-Low-Calorie Ketogenic Diets With Whey, Vegetable, or Animal Protein in Patients With Obesity: A Randomized Pilot Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 105(9), dgaa336. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa336>
- Beard, C. M., Panser, L. A., & Katusic, S. K. (2011). Is excess folic acid supplementation a risk factor for autism? *Medical Hypotheses*, 77(1), 15–17. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.03.013>
- Bejerot, S., Eriksson, J. M., Bonde, S., Carlström, K., Humble, M. B., & Eriksson, E. (2012). The extreme male brain revisited: Gender coherence in adults with autism spectrum disorder. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 201, 116–123. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.111.097899>
- Belica, I., Janšáková, K., Celušáková, H., Kopčíková, M., Polónyiová, K., Rašková, B., Vidošovičová, M., Ostatníková, D., & Babinská, K. (2023). Plasma cytokine concentrations of children with autism spectrum disorder and neurotypical siblings. *Cytokine*, 170, 156333. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156333>
- Bernaerts, S., Boets, B., Bosmans, G., Steyaert, J., & Alaerts, K. (2020). Behavioral effects of multiple-dose oxytocin treatment in autism: A randomized, placebo-controlled trial with long-term follow-up. *Molecular Autism*, 11(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13229-020-0313-1>
- Bhandari, R., Paliwal, J. K., & Kuhad, A. (2020). Neuropsychopathology of Autism Spectrum Disorder: Complex Interplay of Genetic, Epigenetic, and Environmental Factors. *Advances in Neurobiology*, 24, 97–141. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30402-7_4
- Biamino, E., Di Gregorio, E., Belligni, E. F., Keller, R., Riberi, E., Gandione, M., Calcia, A., Mancini, C., Giorgio, E., Cavalieri, S., Pappi, P., Talarico, F., Fea, A. M., De Rubeis, S., Cirillo Silengo, M., Ferrero, G. B., & Brusco, A. (2016). A novel 3q29 deletion associated with autism, intellectual disability, psychiatric disorders, and obesity. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 171B(2), 290–299. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32406>

- Bivona, G., Gambino, C. M., Iacolino, G., & Ciaccio, M. (2019). Vitamin D and the nervous system. *Neurological Research*, 41(9), 827–835. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1622872>
- Błażewicz, A., & Grabrucker, A. M. (2022). Metal Profiles in Autism Spectrum Disorders: A Crosstalk between Toxic and Essential Metals. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 308. <https://doi.org/10.3390/ijms24010308>
- Bobrowski-Khoury, N., Ramaekers, V. T., Sequeira, J. M., & Quadros, E. V. (2021). Folate Receptor Alpha Autoantibodies in Autism Spectrum Disorders: Diagnosis, Treatment and Prevention. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8), 710. <https://doi.org/10.3390/jpm11080710>
- Bölte, S., Girdler, S., & Marschik, P. B. (2019). The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 76(7), 1275–1297. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2988-4>
- Bonetto, G., Kamen, Y., Evans, K. A., & Káradóttir, R. T. (2020). Unraveling Myelin Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 156. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00156>
- Bonnet-Brilhault, F. (2017). [Autism: An early neurodevelopmental disorder]. *Archives De Pediatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie*, 24(4), 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2017.01.014>
- Bougeard, C., Picarel-Blanchot, F., Schmid, R., Campbell, R., & Buitelaar, J. (2021). Prevalence of Autism Spectrum Disorder and Co-morbidities in Children and Adolescents: A Systematic Literature Review. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 744709. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.744709>
- Bozdagi, O., Tavassoli, T., & Buxbaum, J. D. (2013). Insulin-like growth factor-1 rescues synaptic and motor deficits in a mouse model of autism and developmental delay. *Molecular Autism*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-9>
- Bragin, E., Chatzimichali, E. A., Wright, C. F., Hurles, M. E., Firth, H. V., Bevan, A. P., & Swaminathan, G. J. (2014). DECIPHER: Database for the interpretation of phenotype-linked plausibly pathogenic sequence and copy-number variation. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D993–D1000. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt937>

- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L. G., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B., & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, 6(263), 263ra158. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
- Careaga, M., Schwartz, J., & Ashwood, P. (2015). Inflammatory profiles in the BTBR mouse: How relevant are they to autism spectrum disorders? *Brain, Behavior, and Immunity*, 43, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.006>
- Carter, M., Casey, S., O’Keeffe, G. W., Gibson, L., & Murray, D. M. (2021). Mid-gestation cytokine profiles in mothers of children affected by autism spectrum disorder: A case-control study. *Scientific Reports*, 11(1), 22315. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01662-z>
- Castro, K., Baronio, D., Perry, I. S., Riesgo, R. D. S., & Gottfried, C. (2017). The effect of ketogenic diet in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Nutritional Neuroscience*, 20(6), 343–350. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2015.1133029>
- Cekici, H., & Sanlier, N. (2019). Current nutritional approaches in managing autism spectrum disorder: A review. *Nutritional Neuroscience*, 22(3), 145–155. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1358481>
- Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US), & Office on Smoking and Health (US). (2010). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General*. Centers for Disease Control and Prevention (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/>
- Chadman, K. K. (2017). Animal models for autism in 2017 and the consequential implications to drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(12), 1187–1194. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1383982>
- Chao, O. Y., Yunger, R., & Yang, Y.-M. (2018). Behavioral assessments of BTBR T+Itpr3tf/J mice by tests of object attention and elevated open platform: Implications for an animal model of psychiatric comorbidity in autism. *Behavioural Brain Research*, 347, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.03.014>

- Chauhan, A., Sahu, J. K., Jaiswal, N., Kumar, K., Agarwal, A., Kaur, J., Singh, S., & Singh, M. (2019). Prevalence of autism spectrum disorder in Indian children: A systematic review and meta-analysis. *Neurology India*, 67(1), 100–104. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.253970>
- Chen, O., Tahmazian, I., Ferrara, H. J., Hu, B., & Chomiak, T. (2020). The early overgrowth theory of autism spectrum disorder: Insight into convergent mechanisms from valproic acid exposure and translational models. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 173, 275–300. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.04.014>
- Chen, S., Li, Z., He, Y., Zhang, F., Li, H., Liao, Y., Wei, Z., Wan, G., Xiang, X., Hu, M., Xia, K., Chen, X., & Tang, J. (2015). Elevated mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells is associated with childhood autism. *BMC Psychiatry*, 15, 50. <https://doi.org/10.1186/s12888-015-0432-y>
- Chen, W.-X., Liu, B., Zhou, L., Xiong, X., Fu, J., Huang, Z.-F., Tan, T., Tang, M., Wang, J., & Tang, Y.-P. (2022). De novo mutations within metabolism networks of amino acid/protein/energy in Chinese autistic children with intellectual disability. *Human Genomics*, 16(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40246-022-00427-7>
- Chen, Y., Chen, J., Xing, Z., Peng, C., & Li, D. (2023). Autophagy in Neuroinflammation: A Focus on Epigenetic Regulation. *Aging and Disease*. <https://doi.org/10.14336/AD.2023.0718-1>
- Chen, Z., Maqbool, J., Sajid, F., Hussain, G., & Sun, T. (2021). Human gut microbiota and its association with pathogenesis and treatments of neurodegenerative diseases. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104675. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104675>
- Cheng, S., Ma, X., Geng, S., Jiang, X., Li, Y., Hu, L., Li, J., Wang, Y., & Han, X. (2018). Fecal Microbiota Transplantation Beneficially Regulates Intestinal Mucosal Autophagy and Alleviates Gut Barrier Injury. *mSystems*, 3(5), e00137-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00137-18>
- Cheroni, C., Caporale, N., & Testa, G. (2020). Autism spectrum disorder at the crossroad between genes and environment: Contributions, convergences, and interactions in ASD developmental pathophysiology. *Molecular Autism*, 11(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13229-020-00370-1>

- Chiarotti, F., & Venerosi, A. (2020). Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates Since 2014. *Brain Sciences*, 10(5), 274. <https://doi.org/10.3390/brainsci10050274>
- Cieślik, M., Gassowska-Dobrowolska, M., Zawadzka, A., Frontczak-Baniewicz, M., Gewartowska, M., Dominiak, A., Czapski, G. A., & Adamczyk, A. (2020). The Synaptic Dysregulation in Adolescent Rats Exposed to Maternal Immune Activation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 555290. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.555290>
- Clements, C. C., Wenger, T. L., Zoltowski, A. R., Bertollo, J. R., Miller, J. S., de Marchena, A. B., Mitteer, L. M., Carey, J. C., Yerys, B. E., Zackai, E. H., Emanuel, B. S., McDonald-McGinn, D. M., & Schultz, R. T. (2017). Critical region within 22q11.2 linked to higher rate of autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, 8, 58. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0171-7>
- Colucci-D'Amato, L., Speranza, L., & Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7777. <https://doi.org/10.3390/ijms21207777>
- Coretti, L., Cristiano, C., Florio, E., Scala, G., Lama, A., Keller, S., Cuomo, M., Russo, R., Pero, R., Paciello, O., Mattace Raso, G., Meli, R., Coccozza, S., Calignano, A., Chiariotti, L., & Lembo, F. (2017). Sex-related alterations of gut microbiota composition in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, 7, 45356. <https://doi.org/10.1038/srep45356>
- Crider, A., Thakkar, R., Ahmed, A. O., & Pillai, A. (2014). Dysregulation of estrogen receptor beta (ER β), aromatase (CYP19A1), and ER co-activators in the middle frontal gyrus of autism spectrum disorder subjects. *Molecular Autism*, 5(1), 46. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-46>
- Cristiano, C., Volpicelli, F., Crispino, M., Lacivita, E., Russo, R., Leopoldo, M., Calignano, A., & Perrone-Capano, C. (2022). Behavioral, Anti-Inflammatory, and Neuroprotective Effects of a Novel FPR2 Agonist in Two Mouse Models of Autism. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(2), 161. <https://doi.org/10.3390/ph15020161>
- Cupaioli, F. A., Fallerini, C., Mencarelli, M. A., Perticaroli, V., Filippini, V., Mari, F., Renieri, A., & Mezzelani, A. (2021). Autism Spectrum Disorders: Analysis of Mobile

Elements at 7q11.23 Williams-Beuren Region by Comparative Genomics. *Genes*, 12(10), 1605. <https://doi.org/10.3390/genes12101605>

D'Amato, A., Di Cesare Mannelli, L., Lucarini, E., Man, A. L., Le Gall, G., Branca, J. J. V., Ghelardini, C., Amedei, A., Bertelli, E., Regoli, M., Pacini, A., Luciani, G., Gallina, P., Altera, A., Narbad, A., Gulisano, M., Hoyles, L., Vauzour, D., & Nicoletti, C. (2020). Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity- and neurotransmission-related proteins in young recipients. *Microbiome*, 8(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00914-w>

D'Mello, S. R. (2019). Regulation of Central Nervous System Development by Class I Histone Deacetylases. *Developmental Neuroscience*, 41(3–4), 149–165. <https://doi.org/10.1159/000505535>

da Silva, P. R., do Nascimento Gonzaga, T. K. S., Maia, R. E., & da Silva, B. A. (2022). Ionic Channels as Potential Targets for the Treatment of Autism Spectrum Disorder: A Review. *Current Neuropharmacology*, 20(10), 1834–1849. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210809102547>

Dachtler, J., Glasper, J., Cohen, R. N., Ivorra, J. L., Swiffen, D. J., Jackson, A. J., Harte, M. K., Rodgers, R. J., & Clapcote, S. J. (2014). Deletion of α -neurexin II results in autism-related behaviors in mice. *Translational Psychiatry*, 4(11), e484. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.123>

Damianidou, E., Mouratidou, L., & Kyrousi, C. (2022). Research models of neurodevelopmental disorders: The right model in the right place. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 1031075. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1031075>

Davoli-Ferreira, M., Thomson, C. A., & McCoy, K. D. (2021). Microbiota and Microglia Interactions in ASD. *Frontiers in Immunology*, 12, 676255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.676255>

De Bartolo, L., Morelli, S., Piscioneri, A., Lopez, L. C., Favia, P., d'Agostino, R., & Drioli, E. (2007). Novel membranes and surface modification able to activate specific cellular responses. *Biomolecular Engineering*, 24(1), 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.07.001>

De Cagna, F., Fusar-Poli, L., Damiani, S., Rocchetti, M., Giovanna, G., Mori, A., Politi, P., & Brondino, N. (2019). The Role of Intranasal Oxytocin in Anxiety and Depressive Disorders: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience: The Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.9758/cpn.2019.17.1.1>

De Gaetano, A., Gibellini, L., Zanini, G., Nasi, M., Cossarizza, A., & Pinti, M. (2021). Mitophagy and Oxidative Stress: The Role of Aging. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(5), 794. <https://doi.org/10.3390/antiox10050794>

DeFilippis, M. (2018). Depression in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder. *Children (Basel, Switzerland)*, 5(9), 112. <https://doi.org/10.3390/children5090112>

Dell'Osso, L., Massoni, L., Battaglini, S., Cremone, I. M., Carmassi, C., & Carpita, B. (2022). Biological correlates of altered circadian rhythms, autonomic functions and sleep problems in autism spectrum disorder. *Annals of General Psychiatry*, 21(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12991-022-00390-6>

Dent, E. W., Gupton, S. L., & Gertler, F. B. (2011). The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), a001800. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001800>

Desli, E., Spilioti, M., Evangeliou, A., Styllas, F., Magkos, F., & Dalamaga, M. (2022). The Efficacy and Safety of Ketogenic Diets in Drug-Resistant Epilepsy in Children and Adolescents: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Current Nutrition Reports*, 11(2), 102–116. <https://doi.org/10.1007/s13668-022-00405-4>

Di, J., Li, J., O'Hara, B., Alberts, I., Xiong, L., Li, J., & Li, X. (2020). The role of GABAergic neural circuits in the pathogenesis of autism spectrum disorder. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 80(2), 73–85. <https://doi.org/10.1002/jdn.10005>

Domingues, V. F., Nasuti, C., Piangerelli, M., Correia-Sá, L., Ghezzi, A., Marini, M., Abruzzo, P. M., Visconti, P., Giustozzi, M., Rossi, G., & Gabbianelli, R. (2016). Pyrethroid Pesticide Metabolite in Urine and Microelements in Hair of Children Affected by Autism Spectrum Disorders: A Preliminary Investigation. *International Journal of*

- Environmental Research and Public Health, 13(4), 388.
<https://doi.org/10.3390/ijerph13040388>
- Donohue, M. R., Childs, A. W., Richards, M., & Robins, D. L. (2019). Race influences parent report of concerns about symptoms of autism spectrum disorder. *Autism: The International Journal of Research and Practice*, 23(1), 100–111.
<https://doi.org/10.1177/1362361317722030>
- Düking, T., Spieth, L., Berghoff, S. A., Piepkorn, L., Schmidke, A. M., Mitkovski, M., Kannaiyan, N., Hosang, L., Scholz, P., Shaib, A. H., Schneider, L. V., Hesse, D., Ruhwedel, T., Sun, T., Linhoff, L., Trevisiol, A., Köhler, S., Pastor, A. M., Misgeld, T., ... Saher, G. (2022). Ketogenic diet uncovers differential metabolic plasticity of brain cells. *Science Advances*, 8(37), eabo7639. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo7639>
- Durkin, M. S., Maenner, M. J., Baio, J., Christensen, D., Daniels, J., Fitzgerald, R., Imm, P., Lee, L.-C., Schieve, L. A., Van Naarden Braun, K., Wingate, M. S., & Yeargin-Allsopp, M. (2017). Autism Spectrum Disorder Among US Children (2002-2010): Socioeconomic, Racial, and Ethnic Disparities. *American Journal of Public Health*, 107(11), 1818–1826.
<https://doi.org/10.2105/AJPH.2017.304032>
- Dutta, P., Bharti, P., Kumar, J., & Maiti, S. (2021). Role of actin cytoskeleton in the organization and function of ionotropic glutamate receptors. *Current Research in Structural Biology*, 3, 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2021.10.001>
- Dyńska, D., Kowalcze, K., & Paziewska, A. (2022). The Role of Ketogenic Diet in the Treatment of Neurological Diseases. *Nutrients*, 14(23), 5003.
<https://doi.org/10.3390/nu14235003>
- Edith, L.-H., & Prieto, J. (2008). A Microscopic Study of Language-Related Cortex in Autism. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4.
<https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2008.130.145>
- Eissa, N., Al-Houqani, M., Sadeq, A., Ojha, S. K., Sasse, A., & Sadek, B. (2018). Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 304. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00304>
- El-Rashidy, O., El-Baz, F., El-Gendy, Y., Khalaf, R., Reda, D., & Saad, K. (2017). Ketogenic diet versus gluten free casein free diet in autistic children: A case-control study. *Metabolic Brain Disease*, 32(6), 1935–1941. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0088-z>

- Elsayed, N. S., Aston, P., Bayanagari, V. R., & Shukla, S. K. (2022). The gut microbiome molecular mimicry piece in the multiple sclerosis puzzle. *Frontiers in Immunology*, 13, 972160. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.972160>
- Eor, J. Y., Son, Y. J., Kim, J.-Y., Kang, H.-C., Youn, S. E., Kim, J. H., & Kim, S. H. (2021). Neuroprotective effect of both synbiotics and ketogenic diet in a pentylenetetrazol-induced acute seizure murine model. *Epilepsy Research*, 174, 106668. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2021.106668>
- Evangelidou, A., Vlachonikolis, I., Mihailidou, H., Spilioti, M., Skarpalezou, A., Makaronas, N., Prokopiou, A., Christodoulou, P., Liapi-Adamidou, G., Helidonis, E., Sbyrakis, S., & Smeitink, J. (2003). Application of a ketogenic diet in children with autistic behavior: Pilot study. *Journal of Child Neurology*, 18(2), 113–118. <https://doi.org/10.1177/08830738030180020501>
- Faber, S., Zinn, G. M., Kern, J. C., & Kingston, H. M. S. (2009). The plasma zinc/serum copper ratio as a biomarker in children with autism spectrum disorders. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 14(3), 171–180. <https://doi.org/10.1080/13547500902783747>
- Falougy, H. E., Filova, B., Ostatnikova, D., Bacova, Z., & Bakos, J. (2019). Neuronal morphology alterations in autism and possible role of oxytocin. *Endocrine Regulations*, 53(1), 46–54. <https://doi.org/10.2478/enr-2019-0006>
- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., & Thuras, P. D. (2009). GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 39(2), 223–230. <https://doi.org/10.1007/s10803-008-0646-7>
- Feinberg, J. I., Schrott, R., Ladd-Acosta, C., Newschaffer, C. J., Hertz-Picciotto, I., Croen, L. A., Daniele Fallin, M., Feinberg, A. P., & Volk, H. E. (2023). Epigenetic changes in sperm are associated with paternal and child quantitative autistic traits in an autism-enriched cohort. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02046-7>
- Feng, W., Liu, J., Cheng, H., Zhang, D., Tan, Y., & Peng, C. (2022). Dietary compounds in modulation of gut microbiota-derived metabolites. *Frontiers in Nutrition*, 9, 939571. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.939571>
- Ferrante, M., Barone, R., Fazio, A., Zerbo, S., Margherita, V., Rizzo, R., Fichera, G., & Fiore, M. (2015). Prevalence and age at diagnosis of Autism Spectrum Disorder in south

Italy, 2004–2014: Maria Fiore. *European Journal of Public Health*, 25(suppl_3), ckv175.099. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckv175.099>

Fetissov, S. O. (2011). Neuropeptide autoantibodies assay. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 789, 295–302. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-310-3_19

Fetissov, S. O., Averina, O. V., & Danilenko, V. N. (2019). Neuropeptides in the microbiota-brain axis and feeding behavior in autism spectrum disorder. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 61, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.10.030>

Filippone, A., Esposito, E., Mannino, D., Lyssenko, N., & Praticò, D. (2022). The contribution of altered neuronal autophagy to neurodegeneration. *Pharmacology & Therapeutics*, 238, 108178. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108178>

FLEISS, B., STOLP, H., MEZGER, V., & GRESSENS, P. (2024). 52—Central Nervous System Development. In C. A. Gleason & T. Sawyer (Eds.), *Avery's Diseases of the Newborn* (Eleventh Edition) (pp. 781-786.e2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-82823-9.00052-0>

Frye, R. E., Cakir, J., Rose, S., Palmer, R. F., Austin, C., Curtin, P., & Arora, M. (2021). Mitochondria May Mediate Prenatal Environmental Influences in Autism Spectrum Disorder. *Journal of Personalized Medicine*, 11(3), 218. <https://doi.org/10.3390/jpm11030218>

Frye, R. E., Sreenivasula, S., & Adams, J. B. (2011). Traditional and non-traditional treatments for autism spectrum disorder with seizures: An on-line survey. *BMC Pediatrics*, 11, 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-11-37>

Fung, L. K., Flores, R. E., Gu, M., Sun, K. L., James, D., Schuck, R. K., Jo, B., Park, J. H., Lee, B. C., Jung, J. H., Kim, S. E., Saggar, M., Sacchet, M. D., Warnock, G., Khalighi, M. M., Spielman, D., Chin, F. T., & Hardan, A. Y. (2021). Thalamic and prefrontal GABA concentrations but not GABAA receptor densities are altered in high-functioning adults with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 26(5), 1634–1646. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0756-y>

Gabis, L. V., Attia, O. L., Goldman, M., Barak, N., Tefera, P., Shefer, S., Shaham, M., & Lerman-Sagie, T. (2022). The myth of vaccination and autism spectrum. *European*

Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society, 36, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2021.12.011>

Galvez-Contreras, A. Y., Zarate-Lopez, D., Torres-Chavez, A. L., & Gonzalez-Perez, O. (2020). Role of Oligodendrocytes and Myelin in the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder. *Brain Sciences*, 10(12), 951. <https://doi.org/10.3390/brainsci10120951>

Gandal, M. J., Haney, J. R., Parikshak, N. N., Leppa, V., Ramaswami, G., Hartl, C., Schork, A. J., Appadurai, V., Buil, A., Werge, T. M., Liu, C., White, K. P., CommonMind Consortium, PsychENCODE Consortium, iPSYCH-BROAD Working Group, Horvath, S., & Geschwind, D. H. (2018). Shared molecular neuropathology across major psychiatric disorders parallels polygenic overlap. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6376), 693–697. <https://doi.org/10.1126/science.aad6469>

Gao, Y., Duque-Wilckens, N., Aljazi, M. B., Wu, Y., Moeser, A. J., Mias, G. I., Robison, A. J., & He, J. (2021). Loss of histone methyltransferase ASH1L in the developing mouse brain causes autistic-like behaviors. *Communications Biology*, 4(1), 756. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02282-z>

García-Ortiz, M. V., de la Torre-Aguilar, M. J., Morales-Ruiz, T., Gómez-Fernández, A., Flores-Rojas, K., Gil-Campos, M., Martin-Borreguero, P., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., & Perez-Navero, J. L. (2021). Analysis of Global and Local DNA Methylation Patterns in Blood Samples of Patients With Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Pediatrics*, 9, 685310. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.685310>

García-Serna, A. M., & Morales, E. (2020). Neurodevelopmental effects of prenatal vitamin D in humans: Systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 25(10), 2468–2481. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0357-9>

Garrido, N., Cruz, F., Egea, R. R., Simon, C., Sadler-Riggelman, I., Beck, D., Nilsson, E., Ben Maamar, M., & Skinner, M. K. (2021). Sperm DNA methylation epimutation biomarker for paternal offspring autism susceptibility. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00995-2>

Gąssowska-Dobrowolska, M., Kolasa-Wołoskiuk, A., Cieślik, M., Dominiak, A., Friedland, K., & Adamczyk, A. (2021). Alterations in Tau Protein Level and Phosphorylation State in the Brain of the Autistic-Like Rats Induced by Prenatal Exposure

to Valproic Acid. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3209. <https://doi.org/10.3390/ijms22063209>

Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., Mahajan, M., Manaa, D., Pawitan, Y., Reichert, J., Ripke, S., Sandin, S., Sklar, P., Svantesson, O., Reichenberg, A., Hultman, C. M., Devlin, B., Roeder, K., & Buxbaum, J. D. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics*, 46(8), 881–885. <https://doi.org/10.1038/ng.3039>

Ghosh, S., Whitley, C. S., Haribabu, B., & Jala, V. R. (2021). Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 11(5), 1463–1482. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.02.007>

Giroto, F., Scott, L., Avchalumov, Y., Harris, J., Iannattone, S., Drummond-Main, C., Tobias, R., Bello-Espinosa, L., Rho, J. M., Davidsen, J., Teskey, G. C., & Colicos, M. A. (2013). High dose folic acid supplementation of rats alters synaptic transmission and seizure susceptibility in offspring. *Scientific Reports*, 3, 1465. <https://doi.org/10.1038/srep01465>

Giusi, G., Facciolo, R. M., Rende, M., Alò, R., Di Vito, A., Salerno, S., Morelli, S., De Bartolo, L., Drioli, E., & Canonaco, M. (2009). Distinct alpha subunits of the GABAA receptor are responsible for early hippocampal silent neuron-related activities. *Hippocampus*, 19(11), 1103–1114. <https://doi.org/10.1002/hipo.20584>

Goines, P. E., Croen, L. A., Braunschweig, D., Yoshida, C. K., Grether, J., Hansen, R., Kharrazi, M., Ashwood, P., & Van de Water, J. (2011). Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. *Molecular Autism*, 2, 13. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-2-13>

Goldberg, E. L., Letian, A., Dlugos, T., Leveau, C., & Dixit, V. D. (2023). Innate immune cell-intrinsic ketogenesis is dispensable for organismal metabolism and age-related inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, 299(3), 103005. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103005>

Golia, M. T., Poggini, S., Alboni, S., Garofalo, S., Ciano Albanese, N., Viglione, A., Ajmone-Cat, M. A., St-Pierre, A., Brunello, N., Limatola, C., Branchi, I., & Maggi, L. (2019). Interplay between inflammation and neural plasticity: Both immune activation

and suppression impair LTP and BDNF expression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 81, 484–494. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.003>

Golovina, E., Fadason, T., Lints, T. J., Walker, C., Vickers, M. H., & O’Sullivan, J. M. (2021). Understanding the impact of SNPs associated with autism spectrum disorder on biological pathways in the human fetal and adult cortex. *Scientific Reports*, 11(1), 15867. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95447-z>

Gómora-García, J. C., Montiel, T., Hüttenrauch, M., Salcido-Gómez, A., García-Velázquez, L., Ramiro-Cortés, Y., Gomora, J. C., Castro-Obregón, S., & Massieu, L. (2023). Effect of the Ketone Body, D-β-Hydroxybutyrate, on Sirtuin2-Mediated Regulation of Mitochondrial Quality Control and the Autophagy-Lysosomal Pathway. *Cells*, 12(3), 486. <https://doi.org/10.3390/cells12030486>

Graciarena, M., Seiffe, A., Nait-Oumesmar, B., & Depino, A. M. (2018). Hypomyelination and Oligodendroglial Alterations in a Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 517. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00517>

Grochowska, K., & Przeliorz, A. (2022). The Effect of the Ketogenic Diet on the Therapy of Neurodegenerative Diseases and Its Impact on Improving Cognitive Functions. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 12(2), 100–106. <https://doi.org/10.1159/000524331>

Gu, F., Chauhan, V., Kaur, K., Brown, W. T., LaFauci, G., Wegiel, J., & Chauhan, A. (2013). Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Translational Psychiatry*, 3(9), e299. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.68>

Guo, M., Li, R., Wang, Y., Ma, S., Zhang, Y., Li, S., Zhang, H., Liu, Z., You, C., & Zheng, H. (2022). *Lactobacillus plantarum* ST-III modulates abnormal behavior and gut microbiota in a mouse model of autism spectrum disorder. *Physiology & Behavior*, 257, 113965. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113965>

Gzielo, K., Soltys, Z., Rajfur, Z., & Setkiewicz, Z. K. (2019). The Impact of the Ketogenic Diet on Glial Cells Morphology. A Quantitative Morphological Analysis. *Neuroscience*, 413, 239–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.009>

- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L. A., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J. K., & Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of General Psychiatry*, 68(11), 1095–1102. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76>
- Han, Y. M. Y., Cheung, W. K. Y., Wong, C. K., Sze, S. L., Cheng, T. W. S., Yeung, M. K., & Chan, A. S. (2017). Distinct Cytokine and Chemokine Profiles in Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Immunology*, 8, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00011>
- Han, Y. M. Y., Yau, S.-Y., Chan, M. M. Y., Wong, C.-K., & Chan, A. S. (2022). Altered Cytokine and BDNF Levels in Individuals with Autism Spectrum Disorders. *Brain Sciences*, 12(4), 460. <https://doi.org/10.3390/brainsci12040460>
- Haro, D., Marrero, P. F., & Relat, J. (2019). Nutritional Regulation of Gene Expression: Carbohydrate-, Fat- and Amino Acid-Dependent Modulation of Transcriptional Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1386. <https://doi.org/10.3390/ijms20061386>
- Harrop, C., Gulsrud, A., & Kasari, C. (2015). Does Gender Moderate Core Deficits in ASD? An Investigation into Restricted and Repetitive Behaviors in Girls and Boys with ASD. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 45(11), 3644–3655. <https://doi.org/10.1007/s10803-015-2511-9>
- Havdahl, A., Niarchou, M., Starnawska, A., Uddin, M., van der Merwe, C., & Warrier, V. (2021). Genetic contributions to autism spectrum disorder. *Psychological Medicine*, 51(13), 2260–2273. <https://doi.org/10.1017/S0033291721000192>
- Hawks, Z. W., & Constantino, J. N. (2020). Neuropsychiatric ‘Comorbidity’ as Causal Influence in Autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 59(2), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2019.07.008>
- He, J. L., Oeltzschner, G., Mikkelsen, M., Deronda, A., Harris, A. D., Crocetti, D., Wodka, E. L., Mostofsky, S. H., Edden, R. A. E., & Puts, N. A. J. (2021). Region-specific elevations of glutamate + glutamine correlate with the sensory symptoms of autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, 11(1), 411. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01525-1>

- He, X., Tu, Y., Song, Y., Yang, G., & You, M. (2022). The relationship between pesticide exposure during critical neurodevelopment and autism spectrum disorder: A narrative review. *Environmental Research*, 203, 111902. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111902>
- Hegdekar, N., Sarkar, C., Bustos, S., Ritzel, R. M., Hanscom, M., Ravishankar, P., Philkana, D., Wu, J., Loane, D. J., & Lipinski, M. M. (2023). Inhibition of autophagy in microglia and macrophages exacerbates innate immune responses and worsens brain injury outcomes. *Autophagy*, 19(7), 2026–2044. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2167689>
- Herbert, M. R., & Buckley, J. A. (2013). Autism and dietary therapy: Case report and review of the literature. *Journal of Child Neurology*, 28(8), 975–982. <https://doi.org/10.1177/0883073813488668>
- Herlemann, D. P. R., Lundin, D., Labrenz, M., Jürgens, K., Zheng, Z., Aspeborg, H., & Andersson, A. F. (2013). Metagenomic de novo assembly of an aquatic representative of the verrucomicrobial class Spartobacteria. *mBio*, 4(3), e00569-00512. <https://doi.org/10.1128/mBio.00569-12>
- Higuchi, Y., Tachigori, S.-I., & Arakawa, H. (2023). Faded neural projection from the posterior bed nucleus of the stria terminalis to the lateral habenula contributes to social signaling deficit in male BTBR mice as a mouse model of autism. *Psychoneuroendocrinology*, 149, 106004. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2022.106004>
- Higuchi, Y., Tada, T., Nakachi, T., & Arakawa, H. (2023). Serotonergic circuit dysregulation underlying autism-related phenotypes in BTBR mouse model of autism. *Neuropharmacology*, 237, 109634. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109634>
- Hindiyeh, N. A., Zhang, N., Farrar, M., Banerjee, P., Lombard, L., & Aurora, S. K. (2020). The Role of Diet and Nutrition in Migraine Triggers and Treatment: A Systematic Literature Review. *Headache*, 60(7), 1300–1316. <https://doi.org/10.1111/head.13836>
- Hirota, T., & King, B. H. (2023). Autism Spectrum Disorder: A Review. *JAMA*, 329(2), 157–168. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.23661>
- Hong, T., Falcone, C., Dufour, B., Amina, S., Castro, R. P., Regalado, J., Pearson, W., Noctor, S. C., & Martínez-Cerdeño, V. (2020). GABAAR α 2 is Decreased in the Axon

Initial Segment of Pyramidal Cells in Specific Areas of the Prefrontal Cortex in Autism. *Neuroscience*, 437, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.04.025>

Hranilovic, D., Blazevic, S., Stefulj, J., & Zill, P. (2016). DNA Methylation Analysis of HTR2A Regulatory Region in Leukocytes of Autistic Subjects. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 9(2), 204–209. <https://doi.org/10.1002/aur.1519>

Hu, V. W., Frank, B. C., Heine, S., Lee, N. H., & Quackenbush, J. (2006). Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes. *BMC Genomics*, 7, 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-118>

Hu, Z., Yang, Y., Zhao, Y., Yu, H., Ying, X., Zhou, D., Zhong, J., Zheng, Z., Liu, J., Pan, R., Zhang, W., Cheng, F., & Duan, S. (2018). APOE hypermethylation is associated with autism spectrum disorder in a Chinese population. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(6), 4749–4754. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6069>

Hu, Z., Ying, X., Huang, L., Zhao, Y., Zhou, D., Liu, J., Zhong, J., Huang, T., Zhang, W., Cheng, F., & Duan, S. (2020). Association of human serotonin receptor 4 promoter methylation with autism spectrum disorder. *Medicine*, 99(4), e18838. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018838>

Huang, H., Zhang, D., Weng, Y., Delaney, K., Tang, Z., Yan, C., Qi, S., Peng, C., Cole, P. A., Roeder, R. G., & Zhao, Y. (2021). The regulatory enzymes and protein substrates for the lysine β -hydroxybutyrylation pathway. *Science Advances*, 7(9), eabe2771. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe2771>

Huang, Y., Huang, X., Ebstein, R. P., & Yu, R. (2021). Intranasal oxytocin in the treatment of autism spectrum disorders: A multilevel meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 122, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.12.028>

Hughes, H. K., R J Moreno, null, & Ashwood, P. (2023). Innate immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder (ASD). *Brain, Behavior, and Immunity*, 108, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.12.001>

Hviid, A., Hansen, J. V., Frisch, M., & Melbye, M. (2019). Measles, Mumps, Rubella Vaccination and Autism: A Nationwide Cohort Study. *Annals of Internal Medicine*, 170(8), 513–520. <https://doi.org/10.7326/M18-2101>

- Iglesias-Vázquez, L., Van Ginkel Riba, G., Arija, V., & Canals, J. (2020). Composition of Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 12(3), 792. <https://doi.org/10.3390/nu12030792>
- Ilchibaeva, T., Tsybko, A., Lipnitskaya, M., Eremin, D., Milutinovich, K., Naumenko, V., & Popova, N. (2023). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Mechanisms of Autistic-like Behavior in BTBR Mice: Crosstalk with the Dopaminergic Brain System. *Biomedicines*, 11(5), 1482. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051482>
- Inga Jácome, M. C., Morales Chacòn, L. M., Vera Cuesta, H., Maragoto Rizo, C., Whilby Santiesteban, M., Ramos Hernandez, L., Noris García, E., González Fragueta, M. E., Fernandez Verdecia, C. I., Vegas Hurtado, Y., Siniscalco, D., Gonçalves, C. A., & Robinson-Agramonte, M. de L. A. (2016). Peripheral Inflammatory Markers Contributing to Comorbidities in Autism. *Behavioral Sciences (Basel, Switzerland)*, 6(4), 29. <https://doi.org/10.3390/bs6040029>
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y.-H., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., ... Wigler, M. (2012). De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron*, 74(2), 285–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.009>
- Iovene, M. R., Bombace, F., Maresca, R., Sapone, A., Iardino, P., Picardi, A., Marotta, R., Schiraldi, C., Siniscalco, D., Serra, N., de Magistris, L., & Bravaccio, C. (2017). Intestinal Dysbiosis and Yeast Isolation in Stool of Subjects with Autism Spectrum Disorders. *Mycopathologia*, 182(3–4), 349–363. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0068-6>
- Jain, S., Maheshwari, A., & Jain, S. K. (2022). Maternal Nutrition and Fetal/Infant Development. *Clinics in Perinatology*, 49(2), 313–330. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2022.02.005>
- Jamain, S., Radyushkin, K., Hammerschmidt, K., Granon, S., Boretius, S., Varoqueaux, F., Ramanantsoa, N., Gallego, J., Ronnenberg, A., Winter, D., Frahm, J., Fischer, J., Bourgeron, T., Ehrenreich, H., & Brose, N. (2008). Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1710–1715. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711555105>

- Janecka, M., Mill, J., Basson, M. A., Goriely, A., Spiers, H., Reichenberg, A., Schalkwyk, L., & Fernandes, C. (2017). Advanced paternal age effects in neurodevelopmental disorders-review of potential underlying mechanisms. *Translational Psychiatry*, 7(1), e1019. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.294>
- Jaramillo, T. C., Liu, S., Pettersen, A., Birnbaum, S. G., & Powell, C. M. (2014). Autism-related neuroligin-3 mutation alters social behavior and spatial learning. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 7(2), 264–272. <https://doi.org/10.1002/aur.1362>
- Jayashankar, S. S., Tajul Arifin, K., & Nasaruddin, M. L. (2023). β -Hydroxybutyrate Regulates Activated Microglia to Alleviate Neurodegenerative Processes in Neurological Diseases: A Scoping Review. *Nutrients*, 15(3), 524. <https://doi.org/10.3390/nu15030524>
- Jensen, N. J., Wodschow, H. Z., Nilsson, M., & Rungby, J. (2020). Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8767. <https://doi.org/10.3390/ijms21228767>
- Jesudasan, S. J. B., Gupta, S. J., Churchward, M. A., Todd, K. G., & Winship, I. R. (2021). Inflammatory Cytokine Profile and Plasticity of Brain and Spinal Microglia in Response to ATP and Glutamate. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 634020. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.634020>
- Jia, J., Zhao, T., Liu, Z., Liang, Y., Li, F., Li, Y., Liu, W., Li, F., Shi, S., Zhou, C., Yang, H., Liao, Z., Li, Y., Zhao, H., Zhang, J., Zhang, K., Kan, M., Yang, S., Li, H., ... Cummings, J. (2023). Association between healthy lifestyle and memory decline in older adults: 10 year, population based, prospective cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 380, e072691. <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-072691>
- Jiang, Y.-H., & Ehlers, M. D. (2013). Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron*, 78(1), 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.016>
- John, S., & Jaeggi, A. V. (2021). Oxytocin levels tend to be lower in autistic children: A meta-analysis of 31 studies. *Autism: The International Journal of Research and Practice*, 25(8), 2152–2161. <https://doi.org/10.1177/13623613211034375>
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants:

Chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97(10), 2499–2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>

Jones, C., Barrera, I., Brothers, S., Ring, R., & Wahlestedt, C. (2017). Oxytocin and social functioning. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(2), 193–201. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/cjones>

Ju, Y., & Tam, K. Y. (2022). Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 17(3), 543–549. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320970>

Jure, R. (2018). Autism Pathogenesis: The Superior Colliculus. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 1029. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01029>

Kaat, A. J., Shui, A. M., Ghods, S. S., Farmer, C. A., Esler, A. N., Thurm, A., Georgiades, S., Kanne, S. M., Lord, C., Kim, Y. S., & Bishop, S. L. (2021). Sex differences in scores on standardized measures of autism symptoms: A multisite integrative data analysis. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 62(1), 97–106. <https://doi.org/10.1111/jcpp.13242>

Kaminski, V. de L., Michita, R. T., Ellwanger, J. H., Veit, T. D., Schuch, J. B., Riesgo, R. D. S., Roman, T., & Chies, J. A. B. (2023). Exploring potential impacts of pregnancy-related maternal immune activation and extracellular vesicles on immune alterations observed in autism spectrum disorder. *Heliyon*, 9(5), e15593. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15593>

Kanellopoulos, A. K., Mariano, V., Spinazzi, M., Woo, Y. J., McLean, C., Pech, U., Li, K. W., Armstrong, J. D., Giangrande, A., Callaerts, P., Smit, A. B., Abrahams, B. S., Fiala, A., Achsel, T., & Bagni, C. (2020). Aralar Sequesters GABA into Hyperactive Mitochondria, Causing Social Behavior Deficits. *Cell*, 180(6), 1178-1197.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.044>

Kang, Q.-Q., Li, X., Tong, G.-L., Fan, Y.-L., & Shi, L. (2021). Magnetic resonance spectroscopy features of the thalamus and the cerebellum and their association with clinical features in children with autism spectrum disorder: A prospective study. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 23(12), 1250–1255. <https://doi.org/10.7499/j.issn.1008-8830.2108137>

- Karimi, P., Kamali, E., Mousavi, S. M., & Karahmadi, M. (2017). Environmental factors influencing the risk of autism. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 22, 27. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.200272>
- Karras, S. N., Wagner, C. L., & Castracane, V. D. (2018). Understanding vitamin D metabolism in pregnancy: From physiology to pathophysiology and clinical outcomes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 86, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.10.001>
- Kasarpalkar, N. J., Kothari, S. T., & Dave, U. P. (2014). Brain-Derived Neurotrophic Factor in children with Autism Spectrum Disorder. *Annals of Neurosciences*, 21(4), 129–133. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210403>
- Kaviyarasan, S., Chung Sia, E. L., Retinasamy, T., Arulsamy, A., & Shaikh, M. F. (2022). Regulation of gut microbiome by ketogenic diet in neurodegenerative diseases: A molecular crosstalk. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 1015837. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1015837>
- Kazdoba, T. M., Leach, P. T., & Crawley, J. N. (2016). Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. *Genes, Brain, and Behavior*, 15(1), 7–26. <https://doi.org/10.1111/gbb.12256>
- Kechin, A., Boyarskikh, U., Kel, A., & Filipenko, M. (2017). cutPrimers: A New Tool for Accurate Cutting of Primers from Reads of Targeted Next Generation Sequencing. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 24(11), 1138–1143. <https://doi.org/10.1089/cmb.2017.0096>
- Khachadourian, V., Mahjani, B., Sandin, S., Kolevzon, A., Buxbaum, J. D., Reichenberg, A., & Janecka, M. (2023). Comorbidities in autism spectrum disorder and their etiologies. *Translational Psychiatry*, 13(1), 71. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02374-w>
- Khalifa, D., Shahin, O., Salem, D., & Raafat, O. (2019). Serum glutamate was elevated in children aged 3-10 years with autism spectrum disorders when they were compared with controls. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 108(2), 295–299. <https://doi.org/10.1111/apa.14477>
- Khanbabaei, M., Hughes, E., Ellegood, J., Qiu, L. R., Yip, R., Dobry, J., Murari, K., Lerch, J. P., Rho, J. M., & Cheng, N. (2019). Precocious myelination in a mouse model

of autism. *Translational Psychiatry*, 9(1), 251. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0590-7>

Khodosevich, K., & Sellgren, C. M. (2023). Neurodevelopmental disorders-high-resolution rethinking of disease modeling. *Molecular Psychiatry*, 28(1), 34–43. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01876-1>

Kim, B., & Lee, W.-W. (2021). Regulatory Role of Zinc in Immune Cell Signaling. *Molecules and Cells*, 44(5), 335–341. <https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0061>

Kim, H., Keifer, C. M., Rodriguez-Seijas, C., Eaton, N. R., Lerner, M. D., & Gadov, K. D. (2018). Structural hierarchy of autism spectrum disorder symptoms: An integrative framework. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 59(1), 30–38. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12698>

Kim, H., Lim, C.-S., & Kaang, B.-K. (2016). Neuronal mechanisms and circuits underlying repetitive behaviors in mouse models of autism spectrum disorder. *Behavioral and Brain Functions: BBF*, 12(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12993-016-0087-y>

Kim, H.-J., Cho, M.-H., Shim, W. H., Kim, J. K., Jeon, E.-Y., Kim, D.-H., & Yoon, S.-Y. (2017). Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Molecular Psychiatry*, 22(11), 1576–1584. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.103>

Kim, M.-H., Yun, K. E., Kim, J., Park, E., Chang, Y., Ryu, S., Kim, H.-L., & Kim, H.-N. (2020). Gut microbiota and metabolic health among overweight and obese individuals. *Scientific Reports*, 10(1), 19417. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76474-8>

Klei, L., McClain, L. L., Mahjani, B., Panayidou, K., De Rubeis, S., Grahnat, A.-C. S., Karlsson, G., Lu, Y., Melhem, N., Xu, X., Reichenberg, A., Sandin, S., Hultman, C. M., Buxbaum, J. D., Roeder, K., & Devlin, B. (2021). How rare and common risk variation jointly affect liability for autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, 12(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13229-021-00466-2>

Knox, E. G., Aburto, M. R., Tessier, C., Nagpal, J., Clarke, G., O’Driscoll, C. M., & Cryan, J. F. (2022). Microbial-derived metabolites induce actin cytoskeletal rearrangement and protect blood-brain barrier function. *iScience*, 25(12), 105648. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105648>

- Kodak, T., & Bergmann, S. (2020). Autism Spectrum Disorder: Characteristics, Associated Behaviors, and Early Intervention. *Pediatric Clinics of North America*, 67(3), 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2020.02.007>
- Kojima, M., Matsui, K., & Mizui, T. (2019). BDNF pro-peptide: Physiological mechanisms and implications for depression. *Cell and Tissue Research*, 377(1), 73–79. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03034-6>
- Kovács, Z., Brunner, B., & Ari, C. (2021). Beneficial Effects of Exogenous Ketogenic Supplements on Aging Processes and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*, 13(7), 2197. <https://doi.org/10.3390/nu13072197>
- Krauter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019a). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1916, 69–74. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4
- Krauter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019b). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1916, 99–103. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9
- Kuwano, Y., Kamio, Y., Kawai, T., Katsuura, S., Inada, N., Takaki, A., & Rokutan, K. (2011). Autism-associated gene expression in peripheral leucocytes commonly observed between subjects with autism and healthy women having autistic children. *PloS One*, 6(9), e24723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024723>
- Kwon, H. S., & Koh, S.-H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
- Lai, M.-C., Lombardo, M. V., Suckling, J., Ruigrok, A. N. V., Chakrabarti, B., Ecker, C., Deoni, S. C. L., Craig, M. C., Murphy, D. G. M., Bullmore, E. T., MRC AIMS Consortium, & Baron-Cohen, S. (2013). Biological sex affects the neurobiology of autism. *Brain: A Journal of Neurology*, 136(Pt 9), 2799–2815. <https://doi.org/10.1093/brain/awt216>
- Lan, Z., Tachibana, R. O., & Kanno, K. (2023). Chronic exposure of female mice to selective serotonin reuptake inhibitors during lactation induces vocal behavior deficits in pre-weaned offspring. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 230, 173606. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2023.173606>

- Landrigan, P. J. (2010). What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Current Opinion in Pediatrics*, 22(2), 219–225. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328336eb9a>
- LaSalle, J. M. (2023). Epigenomic signatures reveal mechanistic clues and predictive markers for autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 28(5), 1890–1901. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01917-9>
- Lasheras, I., Real-López, M., & Santabárbara, J. (2023). Prevalence of gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A meta-analysis. *Anales De Pediatría*, 99(2), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2023.07.003>
- Lasser, M., Tiber, J., & Lowery, L. A. (2018). The Role of the Microtubule Cytoskeleton in Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 165. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00165>
- Leader, G., Abberton, C., Cunningham, S., Gilmartin, K., Grudzien, M., Higgins, E., Joshi, L., Whelan, S., & Mannion, A. (2022). Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Nutrients*, 14(7), 1471. <https://doi.org/10.3390/nu14071471>
- Lee, H., Thacker, S., Sarn, N., Dutta, R., & Eng, C. (2019). Constitutional mislocalization of Pten drives precocious maturation in oligodendrocytes and aberrant myelination in model of autism spectrum disorder. *Translational Psychiatry*, 9(1), 13. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0364-7>
- Lee, J. H., Espinera, A. R., Chen, D., Choi, K.-E., Caslin, A. Y., Won, S., Pecoraro, V., Xu, G.-Y., Wei, L., & Yu, S. P. (2016). Neonatal inflammatory pain and systemic inflammatory responses as possible environmental factors in the development of autism spectrum disorder of juvenile rats. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0575-x>
- Lee, R. W. Y., Corley, M. J., Pang, A., Arakaki, G., Abbott, L., Nishimoto, M., Miyamoto, R., Lee, E., Yamamoto, S., Maunakea, A. K., Lum-Jones, A., & Wong, M. (2018). A modified ketogenic gluten-free diet with MCT improves behavior in children with autism spectrum disorder. *Physiology & Behavior*, 188, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.006>

- Lewerissa, E. I., Nadif Kasri, N., & Linda, K. (2024). Epigenetic regulation of autophagy-related genes: Implications for neurodevelopmental disorders. *Autophagy*, 20(1), 15–28. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2250217>
- Li, H., Malyar, R. M., Zhai, N., Wang, H., Liu, K., Liu, D., Pan, C., Gan, F., Huang, K., Miao, J., & Chen, X. (2019). Zinc supplementation alleviates OTA-induced oxidative stress and apoptosis in MDCK cells by up-regulating metallothioneins. *Life Sciences*, 234, 116735. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116735>
- Li, J., Xu, X., Liu, J., Zhang, S., Tan, X., Li, Z., Zhang, J., & Wang, Z. (2022). Decoding microRNAs in autism spectrum disorder. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 30, 535–546. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.11.005>
- Li, Q., Liang, J., Fu, N., Han, Y., & Qin, J. (2021). A Ketogenic Diet and the Treatment of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Pediatrics*, 9, 650624. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.650624>
- Li, Y.-A., Chen, Z.-J., Li, X.-D., Gu, M.-H., Xia, N., Gong, C., Zhou, Z.-W., Yasin, G., Xie, H.-Y., Wei, X.-P., Liu, Y.-L., Han, X.-H., Lu, M., Xu, J., & Huang, X.-L. (2022). Epidemiology of autism spectrum disorders: Global burden of disease 2019 and bibliometric analysis of risk factors. *Frontiers in Pediatrics*, 10, 972809. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.972809>
- Li, Z., Zhu, Y.-X., Gu, L.-J., & Cheng, Y. (2021). Understanding autism spectrum disorders with animal models: Applications, insights, and perspectives. *Zoological Research*, 42(6), 800–824. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.251>
- Liaci, C., Camera, M., Caslini, G., Rando, S., Contino, S., Romano, V., & Merlo, G. R. (2021). Neuronal Cytoskeleton in Intellectual Disability: From Systems Biology and Modeling to Therapeutic Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6167. <https://doi.org/10.3390/ijms22116167>
- Liao, X., Liu, Y., Fu, X., & Li, Y. (2020). Postmortem Studies of Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Molecular Neurobiology*, 57(8), 3424–3438. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01976-5>
- Lim, C.-S., Kim, H., Yu, N.-K., Kang, S. J., Kim, T., Ko, H.-G., Lee, J., Yang, J.-E., Ryu, H.-H., Park, T., Gim, J., Nam, H. J., Baek, S. H., Wegener, S., Schmitz, D., Boeckers, T. M., Lee, M. G., Kim, E., Lee, J.-H., ... Kaang, B.-K. (2017). Enhancing inhibitory

synaptic function reverses spatial memory deficits in Shank2 mutant mice. *Neuropharmacology*, 112(Pt A), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.016>

Liu, H.-Y., Liu, S.-M., & Zhang, Y.-Z. (2020). Maternal Folic Acid Supplementation Mediates Offspring Health via DNA Methylation. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 27(4), 963–976. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00161-2>

Liu, J., Liu, C., Gao, Z., Zhou, L., Gao, J., Luo, Y., Liu, T., & Fan, X. (2022). GW4064 Alters Gut Microbiota Composition and Counteracts Autism-Associated Behaviors in BTBR T+tf/J Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 911259. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.911259>

Liu, X., & Takumi, T. (2014). Genomic and genetic aspects of autism spectrum disorder. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(2), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.108>

Liu, X., Lin, J., Zhang, H., Khan, N. U., Zhang, J., Tang, X., Cao, X., & Shen, L. (2022). Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder-Current Progress of Mechanisms and Biomarkers. *Frontiers in Psychiatry*, 13, 813304. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.813304>

Liu, X., Sun, X., Sun, C., Zou, M., Chen, Y., Huang, J., Wu, L., & Chen, W.-X. (2022). Prevalence of epilepsy in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Autism: The International Journal of Research and Practice*, 26(1), 33–50. <https://doi.org/10.1177/13623613211045029>

Lorsung, E., Karthikeyan, R., & Cao, R. (2021). Biological Timing and Neurodevelopmental Disorders: A Role for Circadian Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 642745. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.642745>

Lu, Z., Liu, Z., Mao, W., Wang, X., Zheng, X., Chen, S., Cao, B., Huang, S., Zhang, X., Zhou, T., Zhang, Y., Huang, X., Sun, Q., & Li, J.-D. (2020). Locus-specific DNA methylation of *Mecp2* promoter leads to autism-like phenotypes in mice. *Cell Death & Disease*, 11(2), 85. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2290-x>

Lucchina, L., & Depino, A. M. (2014). Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. *Autism Research: Official Journal of the*

International Society for Autism Research, 7(2), 273–289.
<https://doi.org/10.1002/aur.1338>

Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 126, 55718.
<https://doi.org/10.3791/55718>

Lyall, K., Croen, L., Daniels, J., Fallin, M. D., Ladd-Acosta, C., Lee, B. K., Park, B. Y., Snyder, N. W., Schendel, D., Volk, H., Windham, G. C., & Newschaffer, C. (2017). The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annual Review of Public Health*, 38, 81–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031816-044318>

Lyu, J.-W., Yuan, B., Cheng, T.-L., Qiu, Z.-L., & Zhou, W.-H. (2016). Reciprocal regulation of autism-related genes MeCP2 and PTEN via microRNAs. *Scientific Reports*, 6, 20392. <https://doi.org/10.1038/srep20392>

Maares, M., & Haase, H. (2020). A Guide to Human Zinc Absorption: General Overview and Recent Advances of In Vitro Intestinal Models. *Nutrients*, 12(3), 762.
<https://doi.org/10.3390/nu12030762>

Mackos, A. R., Eubank, T. D., Parry, N. M. A., & Bailey, M. T. (2013). Probiotic *Lactobacillus reuteri* attenuates the stressor-enhanced severity of *Citrobacter rodentium* infection. *Infection and Immunity*, 81(9), 3253–3263. <https://doi.org/10.1128/IAI.00278-13>

Majeed, A. Y., Zulkafli, N. E. S., & Ad'hiah, A. H. (2023). Serum profiles of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in non-hospitalized patients with mild/moderate COVID-19 infection. *Immunology Letters*, 260, 24–34.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2023.06.008>

Malara, M., Lutz, A.-K., Incearap, B., Bauer, H. F., Cursano, S., Volbracht, K., Lerner, J. J., Pandey, R., Delling, J. P., Ioannidis, V., Arévalo, A. P., von Bernhardt, J. E., Schön, M., Bockmann, J., Dimou, L., & Boeckers, T. M. (2022). SHANK3 deficiency leads to myelin defects in the central and peripheral nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 79(7), 371. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04400-4>

Maloney, S. E., Akula, S., Rieger, M. A., McCullough, K. B., Chandler, K., Corbett, A. M., McGowin, A. E., & Dougherty, J. D. (2018). Examining the Reversibility of Long-

- Term Behavioral Disruptions in Progeny of Maternal SSRI Exposure. *eNeuro*, 5(4), ENEURO.0120-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0120-18.2018>
- Maloney, S. E., Rogers, C. E., & Constantino, J. N. (2020). Antidepressants, Pregnancy, and Autism: Setting the Record(s) Straight. *The American Journal of Psychiatry*, 177(6), 479–481. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2020.20040418>
- Manoli, D. S., & State, M. W. (2021). Autism Spectrum Disorder Genetics and the Search for Pathological Mechanisms. *The American Journal of Psychiatry*, 178(1), 30–38. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2020.20111608>
- Mao, X.-Y., Yin, X.-X., Guan, Q.-W., Xia, Q.-X., Yang, N., Zhou, H.-H., Liu, Z.-Q., & Jin, W.-L. (2021). Dietary nutrition for neurological disease therapy: Current status and future directions. *Pharmacology & Therapeutics*, 226, 107861. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107861>
- Margolis, K. G., Cryan, J. F., & Mayer, E. A. (2021). The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology*, 160(5), 1486–1501. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.066>
- Marosi, K., & Mattson, M. P. (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 25(2), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.10.006>
- Marosi, K., Kim, S. W., Moehl, K., Scheibye-Knudsen, M., Cheng, A., Cutler, R., Camandola, S., & Mattson, M. P. (2016). 3-Hydroxybutyrate regulates energy metabolism and induces BDNF expression in cerebral cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 139(5), 769–781. <https://doi.org/10.1111/jnc.13868>
- Marotta, R., Risoleo, M. C., Messina, G., Parisi, L., Carotenuto, M., Vetri, L., & Roccella, M. (2020). The Neurochemistry of Autism. *Brain Sciences*, 10(3), 163. <https://doi.org/10.3390/brainsci10030163>
- Mazahery, H., Camargo, C. A., Conlon, C., Beck, K. L., Kruger, M. C., & von Hurst, P. R. (2016). Vitamin D and Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *Nutrients*, 8(4), 236. <https://doi.org/10.3390/nu8040236>

- McElhanon, B. O., McCracken, C., Karpen, S., & Sharp, W. G. (2014). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A meta-analysis. *Pediatrics*, 133(5), 872–883. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3995>
- McFadden, T., Musaus, M., Nelsen, J. L., Martin, K., Jones, N., Smith, P., Kugler, H., & Jarome, T. J. (2020). Dysregulation of protein degradation in the hippocampus is associated with impaired spatial memory during the development of obesity. *Behavioural Brain Research*, 393, 112787. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112787>
- McKiever, M., Frey, H., & Costantine, M. M. (2020). Challenges in conducting clinical research studies in pregnant women. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 47(4), 287–293. <https://doi.org/10.1007/s10928-020-09687-z>
- Meyza, K. Z., & Blanchard, D. C. (2017). The BTBR mouse model of idiopathic autism—Current view on mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 76(Pt A), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.037>
- Meyza, K. Z., & Blanchard, D. C. (2017). The BTBR mouse model of idiopathic autism—Current view on mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 76(Pt A), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.037>
- Miller, A. H., Haroon, E., Raison, C. L., & Felger, J. C. (2013). Cytokine targets in the brain: Impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depression and Anxiety*, 30(4), 297–306. <https://doi.org/10.1002/da.22084>
- Missler, M., Südhof, T. C., & Biederer, T. (2012). Synaptic cell adhesion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(4), a005694. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005694>
- Modabbernia, A., Velthorst, E., & Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: An evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular Autism*, 8, 13. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>
- Montanari, M., Martella, G., Bonsi, P., & Meringolo, M. (2022). Autism Spectrum Disorder: Focus on Glutamatergic Neurotransmission. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3861. <https://doi.org/10.3390/ijms23073861>
- Montiel-Nava, C., Chacín, J. A., & González-Ávila, Z. (2017). Age of diagnosis of autism spectrum disorder in Latino children: The case of Venezuelan children. *Autism: The*

International Journal of Research and Practice, 21(5), 573–580.
<https://doi.org/10.1177/1362361317701267>

Morais, L. H., Schreiber, H. L., & Mazmanian, S. K. (2021). The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(4), 241–255.
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>

Moreno, H., Borjas, L., Arrieta, A., Sáez, L., Prasad, A., Estévez, J., & Bonilla, E. (1992). [Clinical heterogeneity of the autistic syndrome: A study of 60 families]. *Investigacion Clinica*, 33(1), 13–31.

Moreno-Fuenmayor, H., Borjas, L., Arrieta, A., Valera, V., & Socorro-Candanoza, L. (1996). Plasma excitatory amino acids in autism. *Investigacion Clinica*, 37(2), 113–128.

Moutin, E., Sakkaki, S., Compan, V., Bouquier, N., Giona, F., Areias, J., Goyet, E., Hemonnot-Girard, A.-L., Seube, V., Glasson, B., Benac, N., Chastagnier, Y., Raynaud, F., Audinat, E., Groc, L., Maurice, T., Sala, C., Verpelli, C., & Perroy, J. (2021). Restoring glutamate receptor dynamics at synapses rescues autism-like deficits in Shank3-deficient mice. *Molecular Psychiatry*, 26(12), 7596–7609.
<https://doi.org/10.1038/s41380-021-01230-x>

Mpoulimari, I., & Zintzaras, E. (2022). Synthesis of genetic association studies on autism spectrum disorders using a genetic model-free approach. *Psychiatric Genetics*, 32(3), 91–104. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000316>

Mujica-Parodi, L. R., Amgalan, A., Sultan, S. F., Antal, B., Sun, X., Skiena, S., Lithen, A., Adra, N., Ratai, E.-M., Weistuch, C., Govindarajan, S. T., Strey, H. H., Dill, K. A., Stufflebeam, S. M., Veech, R. L., & Clarke, K. (2020). Diet modulates brain network stability, a biomarker for brain aging, in young adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(11), 6170–6177.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1913042117>

Nagpal, R., Neth, B. J., Wang, S., Craft, S., & Yadav, H. (2019). Modified Mediterranean-ketogenic diet modulates gut microbiome and short-chain fatty acids in association with Alzheimer's disease markers in subjects with mild cognitive impairment. *EBioMedicine*, 47, 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.032>

Nasrolahi, A., Javaherforooshzadeh, F., Jafarzadeh-Gharehzaaddin, M., Mahmoudi, J., Asl, K. D., & Shabani, Z. (2022). Therapeutic potential of neurotrophic factors in

- Alzheimer's Disease. *Molecular Biology Reports*, 49(3), 2345–2357. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06968-9>
- Needham, B. D., Adame, M. D., Serena, G., Rose, D. R., Preston, G. M., Conrad, M. C., Campbell, A. S., Donabedian, D. H., Fasano, A., Ashwood, P., & Mazmanian, S. K. (2021). Plasma and Fecal Metabolite Profiles in Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*, 89(5), 451–462. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.09.025>
- Nevison, C., Blaxill, M., & Zahorodny, W. (2018). California Autism Prevalence Trends from 1931 to 2014 and Comparison to National ASD Data from IDEA and ADDM. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 48(12), 4103–4117. <https://doi.org/10.1007/s10803-018-3670-2>
- Newell, C., Bomhof, M. R., Reimer, R. A., Hittel, D. S., Rho, J. M., & Shearer, J. (2016). Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, 7(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13229-016-0099-3>
- Nguyen, R. L., Medvedeva, Y. V., Ayyagari, T. E., Schmunk, G., & Gargus, J. J. (2018). Intracellular calcium dysregulation in autism spectrum disorder: An analysis of converging organelle signaling pathways. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1865(11 Pt B), 1718–1732. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.003>
- Nisar, S., Bhat, A. A., Masoodi, T., Hashem, S., Akhtar, S., Ali, T. A., Amjad, S., Chawla, S., Bagga, P., Frenneaux, M. P., Reddy, R., Fakhro, K., & Haris, M. (2022). Genetics of glutamate and its receptors in autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 27(5), 2380–2392. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01506-w>
- Nishida, K., Sawada, D., Kuwano, Y., Tanaka, H., & Rokutan, K. (2019). Health Benefits of Lactobacillus gasseri CP2305 Tablets in Young Adults Exposed to Chronic Stress: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients*, 11(8), 1859. <https://doi.org/10.3390/nu11081859>
- Oguro-Ando, A., Zuko, A., Kleijer, K. T. E., & Burbach, J. P. H. (2017a). A current view on contactin-4, -5, and -6: Implications in neurodevelopmental disorders. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 81, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.12.004>
- Ornatowski, W., Lu, Q., Yegambaram, M., Garcia, A. E., Zemskov, E. A., Maltepe, E., Fineman, J. R., Wang, T., & Black, S. M. (2020). Complex interplay between autophagy

and oxidative stress in the development of pulmonary disease. *Redox Biology*, 36, 101679. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101679>

Oron, O., & Elliott, E. (2017). Delineating the Common Biological Pathways Perturbed by ASD's Genetic Etiology: Lessons from Network-Based Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 828. <https://doi.org/10.3390/ijms18040828>

Orzeł, A., Unrug-Bielawska, K., Filipecka-Tyczka, D., Berbeka, K., Zeber-Lubecka, N., Zielińska, M., & Kajdy, A. (2023). Molecular Pathways of Altered Brain Development in Fetuses Exposed to Hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10401. <https://doi.org/10.3390/ijms241210401>

Ousley, O., & Cermak, T. (2014). Autism Spectrum Disorder: Defining Dimensions and Subgroups. *Current Developmental Disorders Reports*, 1(1), 20–28. <https://doi.org/10.1007/s40474-013-0003-1>

Oya, M., Matsuoka, K., Kubota, M., Fujino, J., Tei, S., Takahata, K., Tagai, K., Yamamoto, Y., Shimada, H., Seki, C., Itahashi, T., Aoki, Y. Y., Ohta, H., Hashimoto, R.-I., Sugihara, G., Obata, T., Zhang, M.-R., Suhara, T., Nakamura, M., ... Higuchi, M. (2023). Increased glutamate and glutamine levels and their relationship to astrocytes and dopaminergic transmissions in the brains of adults with autism. *Scientific Reports*, 13(1), 11655. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38306-3>

Page, L. A., Daly, E., Schmitz, N., Simmons, A., Toal, F., Deeley, Q., Ambery, F., McAlonan, G. M., Murphy, K. C., & Murphy, D. G. M. (2006). In vivo 1H-magnetic resonance spectroscopy study of amygdala-hippocampal and parietal regions in autism. *The American Journal of Psychiatry*, 163(12), 2189–2192. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.12.2189>

Pandina, G., Ring, R. H., Bangerter, A., & Ness, S. (2020). Current Approaches to the Pharmacologic Treatment of Core Symptoms Across the Lifespan of Autism Spectrum Disorder. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 29(2), 301–317. <https://doi.org/10.1016/j.chc.2019.12.004>

Pangrazzi, L., Balasco, L., & Bozzi, Y. (2020). Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3293. <https://doi.org/10.3390/ijms21093293>

- Paoli, A., Mancin, L., Bianco, A., Thomas, E., Mota, J. F., & Piccini, F. (2019). Ketogenic Diet and Microbiota: Friends or Enemies? *Genes*, 10(7), 534. <https://doi.org/10.3390/genes10070534>
- Parato, J., & Bartolini, F. (2021). The microtubule cytoskeleton at the synapse. *Neuroscience Letters*, 753, 135850. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135850>
- Peñagarikano, O. (2017). Oxytocin in animal models of autism spectrum disorder. *Developmental Neurobiology*, 77(2), 202–213. <https://doi.org/10.1002/dneu.22449>
- Pérez-Escuredo, J., Van Hée, V. F., Sboarina, M., Falces, J., Payen, V. L., Pellerin, L., & Sonveaux, P. (2016). Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1863(10), 2481–2497. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.013>
- Perini, S., Filosi, M., Italian Autism Network, & Domenici, E. (2023). Candidate biomarkers from the integration of methylation and gene expression in discordant autistic sibling pairs. *Translational Psychiatry*, 13(1), 109. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02407-4>
- Pham, H. H., Sandberg, N., Trinkl, J., & Thayer, J. (2022). Racial and Ethnic Differences in Rates and Age of Diagnosis of Autism Spectrum Disorder. *JAMA Network Open*, 5(10), e2239604. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.39604>
- Pichugina, Y. A., Maksimova, I. V., Berezovskaya, M. A., Afanaseva, N. A., Pichugin, A. B., Dmitrenko, D. V., Timechko, E. E., Salmina, A. B., & Lopatina, O. L. (2022). Salivary oxytocin in autistic patients and in patients with intellectual disability. *Frontiers in Psychiatry*, 13, 969674. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.969674>
- Pietrzak, D., Kasperek, K., Rękawek, P., & Piątkowska-Chmiel, I. (2022). The Therapeutic Role of Ketogenic Diet in Neurological Disorders. *Nutrients*, 14(9), 1952. <https://doi.org/10.3390/nu14091952>
- Pinto, D., Pagnamenta, A. T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T. R., Correia, C., Abrahams, B. S., Almeida, J., Bacchelli, E., Bader, G. D., Bailey, A. J., Baird, G., Battaglia, A., Berney, T., Bolshakova, N., Bölte, S., ... Betancur, C. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, 466(7304), 368–372. <https://doi.org/10.1038/nature09146>

Pochakom, A., Mu, C., Rho, J. M., Tompkins, T. A., Mayengbam, S., & Shearer, J. (2022). Selective Probiotic Treatment Positively Modulates the Microbiota-Gut-Brain Axis in the BTBR Mouse Model of Autism. *Brain Sciences*, 12(6), 781. <https://doi.org/10.3390/brainsci12060781>

Pochakom, A., Mu, C., Rho, J. M., Tompkins, T. A., Mayengbam, S., & Shearer, J. (2022). Selective Probiotic Treatment Positively Modulates the Microbiota-Gut-Brain Axis in the BTBR Mouse Model of Autism. *Brain Sciences*, 12(6), 781. <https://doi.org/10.3390/brainsci12060781>

Poultney, C. S., Goldberg, A. P., Drapeau, E., Kou, Y., Harony-Nicolas, H., Kajiwarra, Y., De Rubeis, S., Durand, S., Stevens, C., Rehnström, K., Palotie, A., Daly, M. J., Ma'ayan, A., Fromer, M., & Buxbaum, J. D. (2013). Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*, 93(4), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.001>

Pourret, O., & Hursthouse, A. (2019). It's Time to Replace the Term 'Heavy Metals' with 'Potentially Toxic Elements' When Reporting Environmental Research. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(22), 4446. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224446>

Principi, N., & Esposito, S. (2019). Vitamin D Deficiency During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders Development. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 987. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00987>

Pu, Y., Yang, J., Chang, L., Qu, Y., Wang, S., Zhang, K., Xiong, Z., Zhang, J., Tan, Y., Wang, X., Fujita, Y., Ishima, T., Wang, D., Hwang, S. H., Hammock, B. D., & Hashimoto, K. (2020). Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(21), 11753–11759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922287117>

Qiang, Q., Skudder-Hill, L., Toyota, T., Wei, W., & Adachi, H. (2022). CSF GAP-43 as a biomarker of synaptic dysfunction is associated with tau pathology in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 12(1), 17392. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20324-2>

Qin, L., Ma, K., & Yan, Z. (2022). Rescue of histone hypoacetylation and social deficits by ketogenic diet in a Shank3 mouse model of autism. *Neuropsychopharmacology*:

Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 47(6), 1271–1279. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01212-1>

Qin, L., Ma, K., & Yan, Z. (2022). Rescue of histone hypoacetylation and social deficits by ketogenic diet in a Shank3 mouse model of autism. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 47(6), 1271–1279. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01212-1>

Qin, Y., Du, Y., Chen, L., Liu, Y., Xu, W., Liu, Y., Li, Y., Leng, J., Wang, Y., Zhang, X.-Y., Feng, J., Zhang, F., Jin, L., Qiu, Z., Gong, X., & Wang, H. (2022). A recurrent SHANK1 mutation implicated in autism spectrum disorder causes autistic-like core behaviors in mice via downregulation of mGluR1-IP3R1-calcium signaling. *Molecular Psychiatry*, 27(7), 2985–2998. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01539-1>

Quaak, I., Brouns, M. R., & Van de Bor, M. (2013). The dynamics of autism spectrum disorders: How neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(8), 3384–3408. <https://doi.org/10.3390/ijerph10083384>

Raghavan, R., Riley, A. W., Volk, H., Caruso, D., Hironaka, L., Sices, L., Hong, X., Wang, G., Ji, Y., Brucato, M., Wahl, A., Stivers, T., Pearson, C., Zuckerman, B., Stuart, E. A., Landa, R., Fallin, M. D., & Wang, X. (2018). Maternal Multivitamin Intake, Plasma Folate and Vitamin B12 Levels and Autism Spectrum Disorder Risk in Offspring. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 32(1), 100–111. <https://doi.org/10.1111/ppe.12414>

Rai, D., Heuvelman, H., Dalman, C., Culpin, I., Lundberg, M., Carpenter, P., & Magnusson, C. (2018). Association Between Autism Spectrum Disorders With or Without Intellectual Disability and Depression in Young Adulthood. *JAMA Network Open*, 1(4), e181465. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.1465>

Ramírez-Salazar, S. A., Herren, C., McCartney, J., & Ortiz García, J. G. (2021). Dietary Insights in Neurological Diseases. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 21(10), 55. <https://doi.org/10.1007/s11910-021-01143-w>

Reim, D., & Schmeisser, M. J. (2017). Neurotrophic Factors in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder: Focus on BDNF and IGF-1. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 224, 121–134. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52498-6_7

- Rigney, N., de Vries, G. J., Petrusis, A., & Young, L. J. (2022). Oxytocin, Vasopressin, and Social Behavior: From Neural Circuits to Clinical Opportunities. *Endocrinology*, 163(9), bqac111. <https://doi.org/10.1210/endo/bqac111>
- Ritvo, E. R., Freeman, B. J., Mason-Brothers, A., Mo, A., & Ritvo, A. M. (1985). Concordance for the syndrome of autism in 40 pairs of afflicted twins. *The American Journal of Psychiatry*, 142(1), 74–77. <https://doi.org/10.1176/ajp.142.1.74>
- Robinson-Agramonte, M. de L. A., Michalski, B., Vidal-Martinez, B., Hernández, L. R., Santiesteban, M. W., & Fahnestock, M. (2022). BDNF, proBDNF and IGF-1 serum levels in naïve and medicated subjects with autism. *Scientific Reports*, 12(1), 13768. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17503-6>
- Rocca, C., De Bartolo, A., Granieri, M. C., Rago, V., Amelio, D., Falbo, F., Malivindi, R., Mazza, R., Cerra, M. C., Boukhzar, L., Lefranc, B., Leprince, J., Anouar, Y., & Angelone, T. (2022). The Antioxidant Selenoprotein T Mimetic, PSELT, Induces Preconditioning-like Myocardial Protection by Relieving Endoplasmic-Reticulum Stress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(3), 571. <https://doi.org/10.3390/antiox11030571>
- Rodrigues, J. V. S., Poli, M. C. F., Petrilli, P. H., Dornelles, R. C. M., Turcio, K. H., & Theodoro, L. H. (2023). Food selectivity and neophobia in children with autism spectrum disorder and neurotypical development: A systematic review. *Nutrition Reviews*, 81(8), 1034–1050. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuac112>
- Rodrigues-Amorim, D., Rivera-Baltanás, T., Del Carmen Vallejo-Curto, M., Rodriguez-Jamardo, C., de Las Heras, E., Barreiro-Villar, C., Blanco-Formoso, M., Fernández-Palleiro, P., Álvarez-Ariza, M., López, M., García-Caballero, A., Olivares, J. M., & Spuch, C. (2020). Plasma β -III tubulin, neurofilament light chain and glial fibrillary acidic protein are associated with neurodegeneration and progression in schizophrenia. *Scientific Reports*, 10(1), 14271. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71060-4>
- Rogawski, M. A., Löscher, W., & Rho, J. M. (2016). Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5), a022780. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022780>
- Rose, S., Melnyk, S., Pavliv, O., Bai, S., Nick, T. G., Frye, R. E., & James, S. J. (2012). Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox

status in the autism brain. *Translational Psychiatry*, 2(7), e134. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.61>

Rossignol, D. A., & Frye, R. E. (2014). Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism. *Frontiers in Physiology*, 5, 150. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00150>

Ruffolo, G., Alfano, V., Romagnolo, A., Zimmer, T., Mills, J. D., Cifelli, P., Gaeta, A., Morano, A., Anink, J., Mühlebner, A., Vezzani, A., Aronica, E., & Palma, E. (2022). GABAA receptor function is enhanced by Interleukin-10 in human epileptogenic gangliogliomas and its effect is counteracted by Interleukin-1 β . *Scientific Reports*, 12(1), 17956. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22806-9>

Ruskin, D. N., Murphy, M. I., Slade, S. L., & Masino, S. A. (2017). Ketogenic diet improves behaviors in a maternal immune activation model of autism spectrum disorder. *PloS One*, 12(2), e0171643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171643>

Saghazadeh, A., Ataeinia, B., Keynejad, K., Abdolalizadeh, A., Hirbod-Mobarakeh, A., & Rezaei, N. (2019). A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: Effects of age, gender, and latitude. *Journal of Psychiatric Research*, 115, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.05.019>

Sagiv, S. K., Harris, M. H., Gunier, R. B., Kogut, K. R., Harley, K. G., Deardorff, J., Bradman, A., Holland, N., & Eskenazi, B. (2018). Prenatal Organophosphate Pesticide Exposure and Traits Related to Autism Spectrum Disorders in a Population Living in Proximity to Agriculture. *Environmental Health Perspectives*, 126(4), 047012. <https://doi.org/10.1289/EHP2580>

Sanchez Jimenez, J. G., & De Jesus, O. (2024). Hypothalamic Dysfunction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560743/>

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Hultman, C., Larsson, H., & Reichenberg, A. (2017). The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA*, 318(12), 1182–1184. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.12141>

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA*, 311(17), 1770–1777. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.4144>

Sandin, S., Schendel, D., Magnusson, P., Hultman, C., Surén, P., Susser, E., Grønberg, T., Gissler, M., Gunnes, N., Gross, R., Henning, M., Bresnahan, M., Sourander, A., Hornig, M., Carter, K., Francis, R., Parner, E., Leonard, H., Rosanoff, M., ... Reichenberg, A. (2016). Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. *Molecular Psychiatry*, 21(5), 693–700. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.70>

Santangelo, A., Corsello, A., Spolidoro, G. C. I., Trovato, C. M., Agostoni, C., Orsini, A., Milani, G. P., & Peroni, D. G. (2023). The Influence of Ketogenic Diet on Gut Microbiota: Potential Benefits, Risks and Indications. *Nutrients*, 15(17), 3680. <https://doi.org/10.3390/nu15173680>

Sato, M., Nakai, N., Fujima, S., Choe, K. Y., & Takumi, T. (2023). Social circuits and their dysfunction in autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 28(8), 3194–3206. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02201-0>

Sauer, A. K., Stanton, J. E., Hans, S., & Grubucker, A. M. (2021). Autism Spectrum Disorders: Etiology and Pathology. In A. M. Grubucker (Ed.), *Autism Spectrum Disorders*. Exon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK573613/>

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>

Schmitt, A. D., Hu, M., Jung, I., Xu, Z., Qiu, Y., Tan, C. L., Li, Y., Lin, S., Lin, Y., Barr, C. L., & Ren, B. (2016). A Compendium of Chromatin Contact Maps Reveals Spatially Active Regions in the Human Genome. *Cell Reports*, 17(8), 2042–2059. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.061>

Schmunk, G., Boubion, B. J., Smith, I. F., Parker, I., & Gargus, J. J. (2015). Shared functional defect in IP₃R-mediated calcium signaling in diverse monogenic autism syndromes. *Translational Psychiatry*, 5(9), e643. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.123>

Schröter, J., Syring, H., Göhring, G., Kölker, S., Opladen, T., Hoffmann, G. F., Syrbe, S., & Jung-Klawitter, S. (2022). Generation of an induced pluripotent stem cell line

- (DHMCi008-A) from an individual with TUBA1A tubulinopathy. *Stem Cell Research*, 62, 102818. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2022.102818>
- Schwichtenberg, A. J., Janis, A., LinASDy, A., Desai, H., Sahu, A., Kellerman, A., Chong, P. L. H., Abel, E. A., & Yacilla, J. K. (2022). Sleep in Children with Autism Spectrum Disorder: A Narrative Review and Systematic Update. *Current Sleep Medicine Reports*, 8(4), 51–61. <https://doi.org/10.1007/s40675-022-00234-5>
- Sen, P., Sherwin, E., Sandhu, K., Bastiaanssen, T. F. S., Moloney, G. M., Golubeva, A., Fitzgerald, P., Paula Ventura Da Silva, A., Chruścicka-Smaga, B., Olavarria-Ramirez, L., Druelle, C., Campos, D., Jayaprakash, P., Rea, K., Jeffery, I. B., Savignac, H., Chetal, S., Mulder, I., Schellekens, H., ... Cryan, J. F. (2022). The live biotherapeutic *Blautia stercoris* MRx0006 attenuates social deficits, repetitive behaviour, and anxiety-like behaviour in a mouse model relevant to autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 106, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.08.007>
- Sener, E. F., Dana, H., Tahtasakal, R., Hamurcu, Z., Taheri, S., Delibasi, N., Mehmetbeyoglu, E., Sukranli, Z. Y., Dal, F., Tufan, E., Oflamaz, A. O., Doganyigit, Z., Ozkul, Y., & Rassoulzadegan, M. (2023). Heterozygous *Cc2d1a* mice show sex-dependent changes in the Beclin-1/p62 ratio with impaired prefrontal cortex and hippocampal autophagy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 125, 110764. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110764>
- Sethuraman, A., Rao, P., Pranay, A., Xu, K., LaManna, J., & Puchowicz, M. A. (2022). Chronic Ketosis Modulates HIF1 α -Mediated Inflammatory Response in Rat Brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1395, 75–79. https://doi.org/10.1007/978-3-031-14190-4_13
- Sgritta, M., Dooling, S. W., Buffington, S. A., Momin, E. N., Francis, M. B., Britton, R. A., & Costa-Mattioli, M. (2019). Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron*, 101(2), 246–259.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.018>
- Shen, W., Krautscheid, P., Rutz, A. M., Bayrak-Toydemir, P., & Dugan, S. L. (2019). De novo loss-of-function variants of *ASH1L* are associated with an emergent neurodevelopmental disorder. *European Journal of Medical Genetics*, 62(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.05.003>

- Shih, P.-Y., Hsieh, B.-Y., Lin, M.-H., Huang, T.-N., Tsai, C.-Y., Pong, W.-L., Lee, S.-P., & Hsueh, Y.-P. (2020). CTTNBP2 Controls Synaptic Expression of Zinc-Related Autism-Associated Proteins and Regulates Synapse Formation and Autism-like Behaviors. *Cell Reports*, 31(9), 107700. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107700>
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C. A., Lim, H., Saunders, L. R., Stevens, R. D., Newgard, C. B., Farese, R. V., de Cabo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K., & Verdin, E. (2013). Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6116), 211–214. <https://doi.org/10.1126/science.1227166>
- Shimizu, T., Nayar, S. G., Swire, M., Jiang, Y., Grist, M., Kaller, M., Sampaio Baptista, C., Bannerman, D. M., Johansen-Berg, H., Ogasawara, K., Tohyama, K., Li, H., & Richardson, W. D. (2023). Oligodendrocyte dynamics dictate cognitive performance outcomes of working memory training in mice. *Nature Communications*, 14(1), 6499. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42293-4>
- Shu, C., Green Snyder, L., Shen, Y., Chung, W. K., & SPARK Consortium. (2022). Imputing cognitive impairment in SPARK, a large autism cohort. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 15(1), 156–170. <https://doi.org/10.1002/aur.2622>
- Siebes, R., Muntjewerff, J.-W., & Staal, W. (2018). Differences of Symptom Distribution Across Adult Age in High Functioning Individuals on the Autism Spectrum Using Subscales of the Autism Spectrum Quotient. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 48(11), 3939–3944. <https://doi.org/10.1007/s10803-018-3657-z>
- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 25. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
- Silverman, J. L., Tolu, S. S., Barkan, C. L., & Crawley, J. N. (2010). Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(4), 976–989. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.201>

- Silverman, J. L., Turner, S. M., Barkan, C. L., Tolu, S. S., Saxena, R., Hung, A. Y., Sheng, M., & Crawley, J. N. (2011). Sociability and motor functions in Shank1 mutant mice. *Brain Research*, 1380, 120–137. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.026>
- Simpson, B., Tupper, C., & Al Aboud, N. M. (2024). Genetics, DNA Packaging. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534207/>
- Singh, H., Chmura, J., Bhaumik, R., Pandey, G. N., & Rasenick, M. M. (2020). Membrane-Associated α -Tubulin Is Less Acetylated in Postmortem Prefrontal Cortex from Depressed Subjects Relative to Controls: Cytoskeletal Dynamics, HDAC6, and Depression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 40(20), 4033–4041. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3033-19.2020>
- Singla, R., Mishra, A., Joshi, R., Sarma, P., Kumar, R., Kaur, G., Sharma, A. R., Jain, A., Prakash, A., Bhatia, A., & Medhi, B. (2022). Homotaurine ameliorates the core ASD symptomatology in VPA rats through GABAergic signaling: Role of GAD67. *Brain Research Bulletin*, 190, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.09.003>
- Socala, K., Doboszewska, U., Szopa, A., Serefko, A., Włodarczyk, M., Zielińska, A., Poleszak, E., Fichna, J., & Wlaź, P. (2021). The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacological Research*, 172, 105840. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105840>
- Sóki, N., Richter, Z., Karádi, K., Lőrincz, K., Horváth, R., Gyimesi, C., Szekeres-Paraczkó, C., Horváth, Z., Janszky, J., Dóczi, T., Seress, L., & Ábrahám, H. (2022). Investigation of synapses in the cortical white matter in human temporal lobe epilepsy. *Brain Research*, 1779, 147787. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.147787>
- Solleiro-Villavicencio, H., & Rivas-Arancibia, S. (2018). Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+T Cells in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 114. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00114>
- St Pourcain, B., Cents, R. A. M., Whitehouse, A. J. O., Haworth, C. M. A., Davis, O. S. P., O'Reilly, P. F., Roulstone, S., Wren, Y., Ang, Q. W., Velders, F. P., Evans, D. M., Kemp, J. P., Warrington, N. M., Miller, L., Timpson, N. J., Ring, S. M., Verhulst, F. C., Hofman, A., Rivadeneira, F., ... Davey Smith, G. (2014). Common variation near ROBO2 is

associated with expressive vocabulary in infancy. *Nature Communications*, 5, 4831. <https://doi.org/10.1038/ncomms5831>

Stavoe, A. K. H., & Holzbaur, E. L. F. (2019). Autophagy in Neurons. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35, 477–500. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125242>

Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y., & Malenka, R. C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(12), 3219–3228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005>

Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*, 1693(Pt B), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>

Streifer, M., & Gore, A. C. (2021a). Epigenetics, estrogenic endocrine-disrupting chemicals (EDCs), and the brain. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 92, 73–99. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2021.03.006>

Streifer, M., & Gore, A. C. (2021b). Epigenetics, estrogenic endocrine-disrupting chemicals (EDCs), and the brain. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 92, 73–99. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2021.03.006>

Styles, M., Alsharshani, D., Samara, M., Alsharshani, M., Khattab, A., Qoronfleh, M. W., & Al-Dewik, N. I. (2020). Risk factors, diagnosis, prognosis and treatment of autism. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 25(9), 1682–1717. <https://doi.org/10.2741/4873>

Sun, X., Zhang, H.-F., Ma, C.-L., Wei, H., Li, B.-M., & Luo, J. (2021). Alleviation of Anxiety/Depressive-Like Behaviors and Improvement of Cognitive Functions by *Lactobacillus plantarum* WLPL04 in Chronically Stressed Mice. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses Et De La Microbiologie Medicale*, 2021, 6613903. <https://doi.org/10.1155/2021/6613903>

Sutherland, R., Hodge, A., Bruck, S., Costley, D., & Klieve, H. (2017). Parent-reported differences between school-aged girls and boys on the autism spectrum. *Autism: The International Journal of Research and Practice*, 21(6), 785–794. <https://doi.org/10.1177/1362361316668653>

Suzuki, K., Matsuzaki, H., Iwata, K., Kamenno, Y., Shimmura, C., Kawai, S., Yoshihara, Y., Wakuda, T., Takebayashi, K., Takagai, S., Matsumoto, K., Tsuchiya, K. J., Iwata, Y., Nakamura, K., Tsujii, M., Sugiyama, T., & Mori, N. (2011). Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PloS One*, 6(5), e20470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020470>

Takata, F., Nakagawa, S., Matsumoto, J., & Dohgu, S. (2021). Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 661838. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.661838>

Tallarico, M., Leo, A., Russo, E., Citraro, R., Palma, E., & De Sarro, G. (2023). Seizure susceptibility to various convulsant stimuli in the BTBR mouse model of autism spectrum disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1155729. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1155729>

Tamang, M. K., Ali, A., Pertile, R. N., Cui, X., Alexander, S., Nitert, M. D., Palmieri, C., & Eyles, D. (2023). Developmental vitamin D-deficiency produces autism-relevant behaviours and gut-health associated alterations in a rat model. *Translational Psychiatry*, 13(1), 204. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02513-3>

Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., & Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*, 83(5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>

Tao, Y., Leng, S. X., & Zhang, H. (2022). Ketogenic Diet: An Effective Treatment Approach for Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, 20(12), 2303–2319. <https://doi.org/10.2174/1570159X20666220830102628>

Taylor, J. L., Debost, J.-C. P. G., Morton, S. U., Wigdor, E. M., Heyne, H. O., Lal, D., Howrigan, D. P., Bloemendal, A., Larsen, J. T., Kosmicki, J. A., Weiner, D. J., Homsy, J., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Agerbo, E., McGrath, J. J., Mortensen, P. B., Petersen, L., Daly, M. J., & Robinson, E. B. (2019). Paternal-age-related de novo mutations and

risk for five disorders. *Nature Communications*, 10(1), 3043. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11039-6>

Taylor, L. E., Swerdfeger, A. L., & Eslick, G. D. (2014). Vaccines are not associated with autism: An evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine*, 32(29), 3623–3629. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.085>

Teleanu, D. M., Niculescu, A.-G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladăcenco, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A. M., & Teleanu, R. I. (2022). An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5938. <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>

Tennoune, N., Chan, P., Breton, J., Legrand, R., Chabane, Y. N., Akkermann, K., Järv, A., Ouelaa, W., Takagi, K., Ghouzali, I., Francois, M., Lucas, N., Bole-Feysot, C., Pestel-Caron, M., do Rego, J.-C., Vaudry, D., Harro, J., Dé, E., Déchelotte, P., & Fetissof, S. O. (2014). Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide α -MSH, at the origin of eating disorders. *Translational Psychiatry*, 4(10), e458. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.98>

Theoharides, T. C., Stewart, J. M., Panagiotidou, S., & Melamed, I. (2016). Mast cells, brain inflammation and autism. *European Journal of Pharmacology*, 778, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.086>

Tian, J., & Kaufman, D. L. (2023). The GABA and GABA-Receptor System in Inflammation, Anti-Tumor Immune Responses, and COVID-19. *Biomedicines*, 11(2), 254. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020254>

Tiesler, C. M. T., & Heinrich, J. (2014). Prenatal nicotine exposure and child behavioural problems. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 23(10), 913–929. <https://doi.org/10.1007/s00787-014-0615-y>

Tohidpour, A., Morgun, A. V., Boitsova, E. B., Malinovskaya, N. A., Martynova, G. P., Khilazheva, E. D., Kopylevich, N. V., Gertsog, G. E., & Salmina, A. B. (2017). Neuroinflammation and Infection: Molecular Mechanisms Associated with Dysfunction of Neurovascular Unit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 276. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00276>

Toma, C., Hervás, A., Torrico, B., Balmaña, N., Salgado, M., Maristany, M., Vilella, E., Martínez-Leal, R., Planelles, M. I., Cuscó, I., del Campo, M., Pérez-Jurado, L. A.,

- Caballero-Andaluz, R., de Diego-Otero, Y., Pérez-Costillas, L., Ramos-Quiroga, J. A., Ribasés, M., Bayés, M., & Cormand, B. (2013). Analysis of two language-related genes in autism: A case-control association study of FOXP2 and CNTNAP2. *Psychiatric Genetics*, 23(2), 82–85. <https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e32835d6fc6>
- Tomova, A., Husarova, V., Lakatosova, S., Bakos, J., Vlkova, B., Babinska, K., & Ostatnikova, D. (2015). Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & Behavior*, 138, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.033>
- Traetta, M. E., Codagnone, M. G., Uccelli, N. A., Ramos, A. J., Zárata, S., & Reinés, A. (2021). Hippocampal neurons isolated from rats subjected to the valproic acid model mimic in vivo synaptic pattern: Evidence of neuronal priming during early development in autism spectrum disorders. *Molecular Autism*, 12(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13229-021-00428-8>
- Treffert, D. A. (1970). Epidemiology of infantile autism. *Archives of General Psychiatry*, 22(5), 431–438. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1970.01740290047006>
- Trifonova, E. A., Klimenko, A. I., Mustafin, Z. S., Lashin, S. A., & Kochetov, A. V. (2019). The mTOR Signaling Pathway Activity and Vitamin D Availability Control the Expression of Most Autism Predisposition Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6332. <https://doi.org/10.3390/ijms20246332>
- Tripathi, M. K., Ojha, S. K., Kartawy, M., Khaliulin, I., Hamoudi, W., & Amal, H. (2024). Mutations associated with autism lead to similar synaptic and behavioral alterations in both sexes of male and female mouse brain. *Scientific Reports*, 14(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50248-4>
- Trobiani, L., Meringolo, M., Diamanti, T., Bourne, Y., Marchot, P., Martella, G., Dini, L., Pisani, A., De Jaco, A., & Bonsi, P. (2020). The neuroligins and the synaptic pathway in Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 119, 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.017>
- Tromp, A., Mowry, B., & Giacomotto, J. (2021). Neurexins in autism and schizophrenia—a review of patient mutations, mouse models and potential future directions. *Molecular Psychiatry*, 26(3), 747–760. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00944-8>

Tsompanidis, A., Warriar, V., & Baron-Cohen, S. (2023). The genetics of autism and steroid-related traits in prenatal and postnatal life. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1126036. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1126036>

Tsujimura, K., Shiohama, T., & Takahashi, E. (2022). microRNA Biology on Brain Development and Neuroimaging Approach. *Brain Sciences*, 12(10), 1366. <https://doi.org/10.3390/brainsci12101366>

Tzanoulinou, S., Musardo, S., Contestabile, A., Bariselli, S., Casarotto, G., Magrinelli, E., Jiang, Y.-H., Jabaudon, D., & Bellone, C. (2022). Inhibition of Trpv4 rescues circuit and social deficits unmasked by acute inflammatory response in a Shank3 mouse model of Autism. *Molecular Psychiatry*, 27(4), 2080–2094. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01427-0>

Urraca, N., Cleary, J., Brewer, V., Pivnick, E. K., McVicar, K., Thibert, R. L., Schanen, N. C., Esmer, C., Lamport, D., & Reiter, L. T. (2013). The interstitial duplication 15q11.2-q13 syndrome includes autism, mild facial anomalies and a characteristic EEG signature. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 6(4), 268–279. <https://doi.org/10.1002/aur.1284>

Usui, N., Kobayashi, H., & Shimada, S. (2023). Neuroinflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5487. <https://doi.org/10.3390/ijms24065487>

Værøy, H., Lahaye, E., Dubessy, C., Benard, M., Nicol, M., Cherifi, Y., Takhlidjt, S., do Rego, J.-L., do Rego, J.-C., Chartrel, N., & Fetissoff, S. O. (2023). Immunoglobulin G is a natural oxytocin carrier which modulates oxytocin receptor signaling: Relevance to aggressive behavior in humans. *Discover Mental Health*, 3(1), 21. <https://doi.org/10.1007/s44192-023-00048-z>

Valicenti-McDermott, M., Hottinger, K., Seijo, R., & Shulman, L. (2012). Age at diagnosis of autism spectrum disorders. *The Journal of Pediatrics*, 161(3), 554–556. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.05.012>

van Arensbergen, J., Pagie, L., FitzPatrick, V. D., de Haas, M., Baltissen, M. P., Comoglio, F., van der Weide, R. H., Teunissen, H., Vösa, U., Franke, L., de Wit, E., Vermeulen, M., Bussemaker, H. J., & van Steensel, B. (2019). High-throughput identification of human

SNPs affecting regulatory element activity. *Nature Genetics*, 51(7), 1160–1169. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0455-2>

van Eijk, L., & Zietsch, B. P. (2021). Testing the extreme male brain hypothesis: Is autism spectrum disorder associated with a more male-typical brain? *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 14(8), 1597–1608. <https://doi.org/10.1002/aur.2537>

Van Wijngaarden-Cremers, P. J. M., van Eeten, E., Groen, W. B., Van Deurzen, P. A., Oosterling, I. J., & Van der Gaag, R. J. (2014). Gender and age differences in the core triad of impairments in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 44(3), 627–635. <https://doi.org/10.1007/s10803-013-1913-9>

Varian, B. J., Poutahidis, T., DiBenedictis, B. T., Levkovich, T., Ibrahim, Y., Didyk, E., Shikhman, L., Cheung, H. K., Hardas, A., Ricciardi, C. E., Kolandaivelu, K., Veenema, A. H., Alm, E. J., & Erdman, S. E. (2017). Microbial lysate upregulates host oxytocin. *Brain, Behavior, and Immunity*, 61, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.002>

Vicidomini, C., Ponzoni, L., Lim, D., Schmeisser, M. J., Reim, D., Morello, N., Orellana, D., Tozzi, A., Durante, V., Scalmani, P., Mantegazza, M., Genazzani, A. A., Giustetto, M., Sala, M., Calabresi, P., Boeckers, T. M., Sala, C., & Verpelli, C. (2017). Pharmacological enhancement of mGlu5 receptors rescues behavioral deficits in SHANK3 knock-out mice. *Molecular Psychiatry*, 22(5), 689–702. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.30>

Vidali, S., Aminzadeh, S., Lambert, B., Rutherford, T., Sperl, W., Kofler, B., & Feichtinger, R. G. (2015). Mitochondria: The ketogenic diet--A metabolism-based therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 63, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.01.022>

Vignoli, A., La Briola, F., Peron, A., Turner, K., Vannicola, C., Saccani, M., Magnaghi, E., Scornavacca, G. F., & Canevini, M. P. (2015). Autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: Searching for risk markers. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10, 154. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0371-1>

Villavicencio-Tejo, F., Olesen, M. A., Navarro, L., Calisto, N., Iribarren, C., García, K., Corsini, G., & Quintanilla, R. A. (2023). Gut-Brain Axis Deregulation and Its Possible

Contribution to Neurodegenerative Disorders. *Neurotoxicity Research*, 42(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s12640-023-00681-0>

Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., Binaglia, M., Corsini, E., Di Luca, M., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(25), 8692–8700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003>

Viviani, B., Boraso, M., Marchetti, N., & Marinovich, M. (2014). Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: A neurotoxic conspiracy? *Neurotoxicology*, 43, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.03.004>

von Ehrenstein, O. S., Ling, C., Cui, X., Cockburn, M., Park, A. S., Yu, F., Wu, J., & Ritz, B. (2019). Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: Population based case-control study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 364, 1962. <https://doi.org/10.1136/bmj.1962>

Vuong, H. E., & Hsiao, E. Y. (2017). Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*, 81(5), 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.024>

Vyas, Y., Lee, K., Jung, Y., & Montgomery, J. M. (2020). Influence of maternal zinc supplementation on the development of autism-associated behavioural and synaptic deficits in offspring Shank3-knockout mice. *Molecular Brain*, 13(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00650-0>

Wakefield, A. J., Murch, S. H., Anthony, A., Linnell, J., Casson, D. M., Malik, M., Berelowitz, M., Dhillon, A. P., Thomson, M. A., Harvey, P., Valentine, A., Davies, S. E., & Walker-Smith, J. A. (1998). Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet (London, England)*, 351(9103), 637–641. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)11096-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)11096-0)

Wang, J., Cao, Y., Hou, W., Bi, D., Yin, F., Gao, Y., Huang, D., Li, Y., Cao, Z., Yan, Y., Zhao, J., Kong, D., Lv, X., Huang, L., Zhong, H., Wu, C., Chen, Q., Yang, R., Wei, Q., & Qin, H. (2023). Fecal microbiota transplantation improves VPA-induced ASD mice by

modulating the serotonergic and glutamatergic synapse signaling pathways. *Translational Psychiatry*, 13(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02307-7>

Wang, J., Huang, H., Liu, C., Zhang, Y., Wang, W., Zou, Z., Yang, L., He, X., Wu, J., Ma, J., & Liu, Y. (2022). Research Progress on the Role of Vitamin D in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, 859151. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.859151>

Wang, L., Tang, S., Wu, S., Yao, L., Su, D., & Wang, Y. (2022). Maternal Exposure to Pesticides and Risk of Autism Spectrum Disorders in Offspring: A Meta-analysis. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 52(4), 1640–1651. <https://doi.org/10.1007/s10803-021-05063-z>

Wang, Q., Kong, Y., Wu, D.-Y., Liu, J.-H., Jie, W., You, Q.-L., Huang, L., Hu, J., Chu, H.-D., Gao, F., Hu, N.-Y., Luo, Z.-C., Li, X.-W., Li, S.-J., Wu, Z.-F., Li, Y.-L., Yang, J.-M., & Gao, T.-M. (2021). Impaired calcium signaling in astrocytes modulates autism spectrum disorder-like behaviors in mice. *Nature Communications*, 12(1), 3321. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23843-0>

Wang, X., Chang, L., Wan, X., Tan, Y., Qu, Y., Shan, J., Yang, Y., Ma, L., & Hashimoto, K. (2022). (R)-ketamine ameliorates demyelination and facilitates remyelination in cuprizone-treated mice: A role of gut-microbiota-brain axis. *Neurobiology of Disease*, 165, 105635. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105635>

Wang, Y., Zhao, S., Liu, X., Zheng, Y., Li, L., & Meng, S. (2018). Oxytocin improves animal behaviors and ameliorates oxidative stress and inflammation in autistic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 107, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.148>

Wang, Z., Ding, R., & Wang, J. (2020). The Association between Vitamin D Status and Autism Spectrum Disorder (ASD): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 13(1), 86. <https://doi.org/10.3390/nu13010086>

Wang, Z., Hong, Y., Zou, L., Zhong, R., Zhu, B., Shen, N., Chen, W., Lou, J., Ke, J., Zhang, T., Wang, W., & Miao, X. (2014). Reelin gene variants and risk of autism spectrum disorders: An integrated meta-analysis. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 165B(2), 192–200. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32222>

- Werling, D. M. (2016). The role of sex-differential biology in risk for autism spectrum disorder. *Biology of Sex Differences*, 7, 58. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0112-8>
- Wigdor, E. M., Weiner, D. J., Grove, J., Fu, J. M., Thompson, W. K., Carey, C. E., Baya, N., van der Merwe, C., Walters, R. K., Satterstrom, F. K., Palmer, D. S., Rosengren, A., Bybjerg-Grauholm, J., iPSYCH Consortium, Hougaard, D. M., Mortensen, P. B., Daly, M. J., Talkowski, M. E., Sanders, S. J., ... Robinson, E. B. (2022). The female protective effect against autism spectrum disorder. *Cell Genomics*, 2(6), 100134. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100134>
- Woodbury-Smith, M., & Scherer, S. W. (2018). Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 60(5), 445–451. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13717>
- Wood-Downie, H., Wong, B., Kovshoff, H., Cortese, S., & Hadwin, J. A. (2021). Research Review: A systematic review and meta-analysis of sex/gender differences in social interaction and communication in autistic and nonautistic children and adolescents. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 62(8), 922–936. <https://doi.org/10.1111/jcpp.13337>
- Xie, J., Van Hoecke, L., & Vandenbroucke, R. E. (2021). The Impact of Systemic Inflammation on Alzheimer's Disease Pathology. *Frontiers in Immunology*, 12, 796867. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.796867>
- Xie, S., Karlsson, H., Dalman, C., Widman, L., Rai, D., Gardner, R. M., Magnusson, C., Schendel, D. E., Newschaffer, C. J., & Lee, B. K. (2019). Family History of Mental and Neurological Disorders and Risk of Autism. *JAMA Network Open*, 2(3), e190154. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.0154>
- Xu, B., Ho, Y., Fasolino, M., Medina, J., O'Brien, W. T., Lamonica, J. M., Nugent, E., Brodtkin, E. S., Fuccillo, M. V., Bucan, M., & Zhou, Z. (2023). Allelic contribution of *Nrxn1α* to autism-relevant behavioral phenotypes in mice. *PLoS Genetics*, 19(2), e1010659. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010659>
- Xu, Y., Jiang, C., Wu, J., Liu, P., Deng, X., Zhang, Y., Peng, B., & Zhu, Y. (2022). Ketogenic diet ameliorates cognitive impairment and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 28(4), 580–592. <https://doi.org/10.1111/cns.13779>

- Xu, Y., Yang, X., Chen, D., Xu, Y., Lan, L., Zhao, S., Liu, Q., Snijders, A. M., & Xia, Y. (2023). Maternal exposure to pesticides and autism or attention-deficit/hyperactivity disorders in offspring: A meta-analysis. *Chemosphere*, 313, 137459. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137459>
- Yang, M., Bao, D., Shi, A., Yuan, H., Wang, J., He, W., Tong, X., & Qin, H. (2020). Zinc Promotes Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell Neural Differentiation via ERK-STAT Signaling. *Stem Cells and Development*, 29(13), 863–875. <https://doi.org/10.1089/scd.2020.0016>
- Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated three-chambered social approach task for mice. *Current Protocols in Neuroscience*, Chapter 8, Unit 8.26. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0826s56>
- Yang, Z., Matsumoto, A., Nakayama, K., Jimbo, E. F., Kojima, K., Nagata, K., Iwamoto, S., & Yamagata, T. (2016). Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients. *Brain & Development*, 38(1), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2015.04.006>
- Yip, B. H. K., Bai, D., Mahjani, B., Klei, L., Pawitan, Y., Hultman, C. M., Grice, D. E., Roeder, K., Buxbaum, J. D., Devlin, B., Reichenberg, A., & Sandin, S. (2018). Heritable Variation, With Little or No Maternal Effect, Accounts for Recurrence Risk to Autism Spectrum Disorder in Sweden. *Biological Psychiatry*, 83(7), 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.09.007>
- Yip, J., Soghomonian, J. J., & Blatt, G. J. (2009). Decreased GAD65 mRNA levels in select subpopulations of neurons in the cerebellar dentate nuclei in autism: An in-situ hybridization study. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 2(1), 50–59. <https://doi.org/10.1002/aur.62>
- Yip, J., Soghomonian, J.-J., & Blatt, G. J. (2008). Increased GAD67 mRNA expression in cerebellar interneurons in autism: Implications for Purkinje cell dysfunction. *Journal of Neuroscience Research*, 86(3), 525–530. <https://doi.org/10.1002/jnr.21520>
- Yong, Z., Dou, Y., Gao, Y., Xu, X., Xiao, Y., Zhu, H., Li, S., & Yuan, B. (2021). Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism spectrum disorder cases in Xuzhou, China. *Translational Pediatrics*, 10(3), 635–646. <https://doi.org/10.21037/tp-21-54>

- Yoon, J., & Mao, Y. (2021). Dissecting Molecular Genetic Mechanisms of 1q21.1 CNV in Neuropsychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5811. <https://doi.org/10.3390/ijms22115811>
- Yoshimura, R. F., Tran, M. B., Hogenkamp, D. J., Ayala, N. L., Johnstone, T., Dunnigan, A. J., Gee, T. K., & Gee, K. W. (2017). Allosteric modulation of nicotinic and GABAA receptor subtypes differentially modify autism-like behaviors in the BTBR mouse model. *Neuropharmacology*, 126, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.029>
- Yu, L., Wu, Y., & Wu, B.-L. (2015). Genetic architecture, epigenetic influence and environment exposure in the pathogenesis of Autism. *Science China. Life Sciences*, 58(10), 958–967. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4941-1>
- Yui, K., Tanuma, N., Yamada, H., & Kawasaki, Y. (2017). Decreased total antioxidant capacity has a larger effect size than increased oxidant levels in urine in individuals with autism spectrum disorder. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(10), 9635–9644. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8595-3>
- Zaccaria, K. J., Lagace, D. C., Eisch, A. J., & McCasland, J. S. (2010). Resistance to change and vulnerability to stress: Autistic-like features of GAP43-deficient mice. *Genes, Brain, and Behavior*, 9(8), 985–996. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00638.x>
- Zaky, E. (2017). Toxic Heavy Metals and Autism Spectrum Disorder; Is There a Link????!! *J Child Adolesc Beh*, 5. <https://doi.org/10.4172/2375-4494.1000336>
- Zapata-Muñoz, J., Villarejo-Zori, B., Largo-Barrientos, P., & Boya, P. (2021). Towards a better understanding of the neuro-developmental role of autophagy in sickness and in health. *Cell Stress*, 5(7), 99–118. <https://doi.org/10.15698/cst2021.07.253>
- Żarnowska, I., Chrapko, B., Gwizda, G., Nocuń, A., Mitosek-Szewczyk, K., & Gasior, M. (2018). Therapeutic use of carbohydrate-restricted diets in an autistic child; a case report of clinical and 18FDG PET findings. *Metabolic Brain Disease*, 33(4), 1187–1192. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0219-1>
- Zawadzka, A., Cieślik, M., & Adamczyk, A. (2021a). The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11516. <https://doi.org/10.3390/ijms222111516>

- Zawadzka, A., Cieřlik, M., & Adamczyk, A. (2021b). The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11516. <https://doi.org/10.3390/ijms222111516>
- Zegarra-Ruiz, D. F., El Beidaq, A., Iñiguez, A. J., Lubrano Di Ricco, M., Manfredo Vieira, S., Ruff, W. E., Mubiru, D., Fine, R. L., Sterpka, J., Greiling, T. M., Dehner, C., & Kriegel, M. A. (2019). A Diet-Sensitive Commensal *Lactobacillus* Strain Mediates TLR7-Dependent Systemic Autoimmunity. *Cell Host & Microbe*, 25(1), 113-127.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.009>
- Zhang, L., Xu, X., Ma, L., Wang, X., Jin, M., Li, L., & Ni, H. (2023). Zinc Water Prevents Autism-Like Behaviors in the BTBR Mice. *Biological Trace Element Research*, 201(10), 4779–4792. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03548-1>
- Zhang, Q., Wu, H., Zou, M., Li, L., Li, Q., Sun, C., Xia, W., Cao, Y., & Wu, L. (2019). Folic acid improves abnormal behavior via mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 71, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.002>
- Zhang, R. (2022). Oxytocin—A key to aetiology and treatment for Autism Spectrum Disorder. *EBioMedicine*, 81, 104126. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104126>
- Zhang, Y., Li, N., Li, C., Zhang, Z., Teng, H., Wang, Y., Zhao, T., Shi, L., Zhang, K., Xia, K., Li, J., & Sun, Z. (2020). Genetic evidence of gender difference in autism spectrum disorder supports the female-protective effect. *Translational Psychiatry*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0699-8>
- Zhao, H., Zhang, H., Liu, S., Luo, W., Jiang, Y., & Gao, J. (2021). Association of Peripheral Blood Levels of Cytokines With Autism Spectrum Disorder: A Meta-Analysis. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 670200. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.670200>
- Zhao, H., Zhang, H., Liu, S., Luo, W., Jiang, Y., & Gao, J. (2021). Association of Peripheral Blood Levels of Cytokines With Autism Spectrum Disorder: A Meta-Analysis. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 670200. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.670200>
- Zhou, R., Ji, B., Kong, Y., Qin, L., Ren, W., Guan, Y., & Ni, R. (2021). PET Imaging of Neuroinflammation in Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Immunology*, 12, 739130. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.739130>

Zhou, Y. Y., & Fu, Q. H. (2022). [Advance in pathogenesis of oligodendrocytes-associated autism spectrum disorder]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]*, 56(9), 1232–1237. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112150-20220529-00541>

Zhu, F., Shan, W., Xu, Q., Guo, A., Wu, J., & Wang, Q. (2019). Ketone Bodies Inhibit the Opening of Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) in Rat Hippocampal Excitatory Neurons in vitro. *Frontiers in Neurology*, 10, 155. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00155>

Zhu, Y., Mordaunt, C. E., Yasui, D. H., Marathe, R., Coulson, R. L., Dunaway, K. W., Jianu, J. M., Walker, C. K., Ozonoff, S., Hertz-Picciotto, I., Schmidt, R. J., & LaSalle, J. M. (2019). Placental DNA methylation levels at CYP2E1 and IRS2 are associated with child outcome in a prospective autism study. *Human Molecular Genetics*, 28(16), 2659–2674. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz084>

Zhu, Y., Tang, X., Cheng, Z., Dong, Q., & Ruan, G. (2022). The Anti-Inflammatory Effect of Preventive Intervention with Ketogenic Diet Mediated by the Histone Acetylation of mGluR5 Promotor Region in Rat Parkinson's Disease Model: A Dual-Tracer PET Study. *Parkinson's Disease*, 2022, 3506213. <https://doi.org/10.1155/2022/3506213>

Zoicas, I., & Kornhuber, J. (2019). The Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Social Behavior in Rodents. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1412. <https://doi.org/10.3390/ijms20061412>

Zunino, G., Messina, A., Sgadò, P., Baj, G., Casarosa, S., & Bozzi, Y. (2016). Brain-derived neurotrophic factor signaling is altered in the forebrain of Engrailed-2 knockout mice. *Neuroscience*, 324, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.023>