

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PEDECIBA - Subárea Neurociencias

EFECTO DE EXTRACTOS DE CANNABIS SOBRE MODELOS MURINOS DE TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA:

Estudios comportamentales y celulares

Lic. Sabrina Pose

Laboratorio de Neuroinflamación y Terapia Génica
Institut Pasteur de Montevideo

Tutora:

Dra. Natalia Lago

Co-tutora:

Dra. Inés Carrera



Tribunal:

Dra. Daniella Agrati

Dra. Ximena López

Dr. José Pedro Prieto

ÍNDICE

RESUMEN	1
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA)	4
MODELOS MURINOS DE AUTISMO	6
CÉLULAS MICROGLIALES: HOMEOSTASIS Y NEUROINFLAMACIÓN EN TEA	7
FITOCANNABINOIDES Y EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE: APLICACIONES TERAPÉUTICAS	11
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
ANIMALES	17
MODELO GENÉTICO MURINO DE AUTISMO: SHANK3B <i>KNOCKOUT</i> (<i>SHANK3B^{-/-}</i>)	17
MODELO AMBIENTAL MURINO DE AUTISMO: ÁCIDO VALPROICO (VPA)	19
EXTRACTOS DE <i>CANNABIS SATIVA</i>	19
ANÁLISIS DOSIS-RESPUESTA	19
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	21
GRUPOS EXPERIMENTALES	21
PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO	22
PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
RESULTADOS	26
CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL DE LOS MODELOS MURINOS DE AUTISMO	26
MODELO GENÉTICO: SHANK3B	26
MODELO AMBIENTAL: VPA	29
TRATAMIENTOS CON EXTRACTOS DE CANNABIS	32
PRUEBA DE DOSIS	32
MODELO GENÉTICO: SHANK3B	33
MODELO AMBIENTAL: VPA	41
CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS MICROGLIALES	46
DISCUSIÓN	48
BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

Los trastornos del espectro autista (TEA) son desórdenes heterogéneos del neurodesarrollo, cuyo diagnóstico se realiza en base a tres características: dificultades en la comunicación, déficits en la interacción social, y comportamientos e intereses restringidos y repetitivos. Estos síntomas tienen un gran impacto en el desarrollo y la integración social de los individuos afectados. Actualmente el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de EEUU estima que uno de cada 54 niños ha sido diagnosticado con TEA en el 2020, con predominancia en varones, los cuales son diagnosticados hasta cuatro veces más que las niñas. Sin embargo, se ha observado que las niñas pueden manifestar los TEA de forma distinta, lo que contribuiría fuertemente a esta diferencia en número de diagnósticos, y sugiere una manifestación diferencial de estos trastornos dependiente del sexo.

Los TEA son trastornos altamente heredables, estimando que cerca del 83% de los casos son causados por variantes genéticas, como por ejemplo mutaciones en el gen *Shank3*. Ratones *knockout* para la isoforma B (*Shank3B^{-/-}*) muestran comportamientos equivalentes a aquellos observados en humanos con TEA, con conductas repetitivas traducidas a acicalamiento excesivo, y déficits en comportamientos sociales.

Por otra parte, aquellos casos que no pueden ser explicados por factores genéticos, probablemente sean causados por factores ambientales. Un ejemplo de estos es la exposición prenatal al ácido valproico (VPA), un fármaco comúnmente utilizado para tratar la epilepsia refractaria. La exposición prenatal a VPA aumenta el riesgo de TEA en niños, observándose también un efecto similar en modelos murinos. Al inyectar hembras de roedores con VPA en día 12.5 de gestación, la progenie presenta comportamientos similares a los observados en personas con TEA, tales como movimientos repetitivos y estereotipados y disminución de comportamientos sociales.

La microglía son las células inmunes residentes del cerebro. Poseen capacidad fagocítica, que les permite no solo eliminar restos celulares sino también monitorear y mantener las sinapsis en el cerebro sano. El balance excitación versus inhibición de las sinapsis y los circuitos cerebrales (balance E/I) puede ser afectado tanto por la falta como por el exceso de poda sináptica por parte de la microglía, y se ha sugerido que este podría ser el mecanismo que subyace muchos desórdenes del neurodesarrollo, incluyendo TEA.

La mayoría de los niños autistas se tratan actualmente con medicamentos destinados a tratar condiciones de comorbilidad, como convulsiones, ansiedad, depresión y déficits de atención. Estos no siempre son eficaces y pueden tener efectos secundarios negativos. El aumento en los últimos años en el diagnóstico de autismo ha generado la necesidad de incrementar los esfuerzos en el estudio de los procesos neuropatológicos asociados a dicho trastorno.

En los últimos años se han obtenido resultados anecdóticos sobre la efectividad de extractos de cannabis medicinal en pacientes con TEA, mejorando tanto su comportamiento como sus habilidades comunicacionales. La planta de *Cannabis sativa* produce un gran número de compuestos, como terpenos, flavonoides, y cannabinoides, donde los cannabinoides tienen un papel relevante debido a su actividad biológica. Se han aislado más de 140 cannabinoides, y los más estudiados son de los mayoritarios en la planta como el cannabidiol (CBD) y el tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC). En la planta estos cannabinoides son sintetizados en sus formas

ácidas (como CBDA y Δ^9 -THCA) y producen las moléculas neutras (CBD, Δ^9 -THC) por un proceso de descarboxilación no enzimática.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de extractos de plantas de cannabis sobre dos modelos murinos de autismo de forma tal de dilucidar si estos compuestos son capaces de revertir el fenotipo de tipo autista de los modelos. Para ello se llevó a cabo en primer lugar la caracterización fenotípica comportamental de un modelo genético (Shank3B) y uno ambiental (administración prenatal de VPA) en ambos sexos. Luego de la caracterización se analizó la respuesta de animales de ambos modelos y ambos sexos al tratamiento crónico con extractos de dos quimiotipos de plantas de *Cannabis sativa*: una alta en CBDA (eCBDA) y otra alta en Δ^9 -THCA (eTHCA), así como CBDA puro (CBDAp). Por último, como forma de aproximación mecanística se evaluó el posible rol de la microglía en estos modelos como blanco farmacológico de los extractos de cannabis. Para ello se evaluó el número de células microgliales en la corteza cerebral y el cuerpo estriado antes y después del tratamiento.

Tanto en el modelo genético, como en el ambiental se observaron comportamientos definidos como de tipo autista en ambos sexos. Si bien la administración crónica de eTHCA no fue efectiva para revertir el fenotipo observado en el modelo genético, luego de la administración de eCBDA se observó una reversión del comportamiento de auto-acicalamiento en las hembras en la prueba de interacción recíproca. Por otra parte, en el modelo ambiental, el tratamiento con eCBDA mejoró comportamientos de interacción social en ambos sexos, mostrando que el extracto tiene diferentes efectos tanto en los modelos como por sexo. Además, en el modelo ambiental se observó que el CBDA en su forma pura es eficaz para revertir los mismos comportamientos que el extracto en machos, pero no en hembras.

Finalmente, se estudió la microglía en ratones de ambos modelos luego de los tratamientos con eCBDA o CBDAp, utilizando Iba1 como inmunomarcador, para intentar dilucidar el mecanismo que subyace la reversión comportamental observada. Se observó que, en el modelo genético, el número de células microgliales se encuentra aumentado en la corteza cerebral, y esto se revierte con la administración crónica de eCBDA. En el modelo ambiental, si bien el número de células microgliales también se encuentra aumentado en la corteza cerebral, los tratamientos con eCBDA y CBDAp únicamente son eficaces para revertir este aumento en hembras.

Los resultados obtenidos muestran el uso potencial de extractos altos en CBDA en el tratamiento de desórdenes del neurodesarrollo y la necesidad de evaluar ambos sexos en los estudios sobre autismo, así como de estudiar la microglía como posible diana terapéutica en patologías del neurodesarrollo.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Δ^9-THC	Tetrahidrocannabinol
Δ^9-THCA	Ácido tetrahidrocannabinólico
5-HT_{1A}	Receptor serotoninérgico 1A
2-AG	2-araquidonoilglicerol
AEA	N-araquidonoiletanolamida o Anandamida
Balance E/I	Balance excitación/inhibición
CB₁ y CB₂	Receptores cannabinoides tipo 1 y 2
CBD	Cannabidiol
CBDA	Ácido cannabidiólico
CBDAp	CBDA puro
eCBDA	Extracto de cannabis alto en CBDA
eTHCA	Extracto de cannabis alto en Δ^9 -THCA
Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> (marcador microglial)
KO	<i>Knockout</i> (genotipo mutante)
MSN	Neuronas espinosas medianas
PPARγ	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas
sEC	Sistema endocannabinoide
SNC	Sistema nervioso central
SSRI	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina
TEA	Trastornos del espectro autista
veh	Vehículo (EtOH:KolliphorEL:salino)
VPA	Ácido valproico
WT	<i>Wild-type</i> (genotipo salvaje)

INTRODUCCIÓN

Trastornos del Espectro Autista (TEA)

Los trastornos del espectro autista (TEA) son desórdenes heterogéneos del neurodesarrollo, comúnmente caracterizados por la presencia desde muy temprana edad de déficits en la interacción social, retrasos en el desarrollo de la capacidad de comunicación social, y presencia de comportamientos e intereses restringidos y repetitivos¹.

Estos síntomas tienen un gran impacto en el desarrollo personal y la integración social de los individuos afectados. Además, los TEA se dan con un alto índice de comorbilidades, con 70% de los individuos presentando al menos una, y 41% presentando dos o más². Dichas comorbilidades pueden ser tanto psicopatológicas, como ser trastornos de ansiedad, depresión, trastorno obsesivo compulsivo, o trastorno por déficit de atención e hiperactividad, como de otra índole, como ser epilepsia, dispraxia, enfermedades del tracto intestinal, o síndrome de Ehlers Danlos²⁻⁵.

En la actualidad, no existen tratamientos para los síntomas centrales del autismo, y los medicamentos utilizados solo están destinados al tratamiento de comorbilidades. Algunos ejemplos de los fármacos utilizados son antipsicóticos, ansiolíticos, o inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI). Dichos tratamientos, además de tener efectos secundarios significativos, no siempre son eficaces, y, al igual que las terapias conductuales, suelen ser insuficientes para proveer una mejora en la calidad de vida de los individuos que se encuentran en el espectro⁶⁻⁸.

Actualmente el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de EEUU estima que, en ese país, la prevalencia de TEA es de uno de cada 54 niños. Los TEA son diagnosticados hasta cuatro veces más en niños que en niñas cuando se presenta con discapacidad intelectual, y esta proporción aumenta a 1:10 en ausencia de discapacidades intelectuales⁹. Si bien dichas diferencias parecen estar relacionadas en cierto grado con una menor incidencia en niñas, estudios recientes han postulado que la menor tasa de diagnóstico podría darse por problemas en la identificación de TEA, debido a diferencias en la manifestación sintomatológica entre niños y niñas^{10,11}. Los análisis diagnósticos de TEA están mayoritariamente basados en niños con autismo, y carecen de la sensibilidad suficiente para la detección en niñas. Estos déficits son reafirmados además por la presencia de sesgos auto-confirmantes: las investigaciones se concentran en la presentación masculina de los TEA, y los nuevos instrumentos de diagnóstico son validados con muestras principalmente masculinas¹¹. Además, existe un problema de circularidad, los individuos incluidos en las investigaciones son aquellos que ya han sido diagnosticados con autismo, y por lo tanto las niñas que puedan participar de las investigaciones cumplen con los criterios necesarios para el diagnóstico, los cuales son basados en niños⁹. Esto conlleva a que los resultados de la investigación no puedan ser extrapolados a todas las mujeres y niñas en el espectro. En resumen, existe un sesgo en el diagnóstico de los TEA hacia el sexo masculino, lo cual retroalimenta que históricamente las investigaciones de autismo sean llevadas a cabo únicamente con niños, o con animales machos en el caso de estudios preclínicos. Finalmente, es importante destacar que el sexo es una variable biológica fundamental a la hora de observar respuestas a fármacos, tanto desde el punto de vista de farmacocinética como farmacodinamia¹²⁻¹⁴, por lo que es de vital importancia evaluar ambos sexos en la búsqueda de tratamientos farmacológicos. Todos estos factores muestran la necesidad de incorporar el sexo

como variable biológica en las investigaciones biomédicas, en particular relacionadas al trastorno del espectro autista.

Los trastornos del espectro autista son altamente heredables, estimando que cerca del 83% de los casos tienen una base genética¹⁵. Recientemente se han identificado un gran número de genes que podrían estar detrás de los TEA. Un ejemplo de esto es el gen *Shank*, el cual se encuentra afectado en aproximadamente 1% de las personas diagnosticadas con TEA¹⁶. Los genes *Shank* codifican la familia de proteínas *SHANK*, formada por *SHANK1*, 2 y 3, las cuales son proteínas de andamiaje localizadas en postsinapsis excitatorias, indispensables para el desarrollo, la estabilidad y la regulación de estas sinapsis^{16–19}. En neuronas, *SHANK1* induce el crecimiento de las cabezas de las espinas dendríticas, mientras que *SHANK2* y *SHANK3* promueven su inducción y maduración²⁰. El gen *Shank3* está localizado en el cromosoma 22 (22q13.3) en humanos y 15 (15E3) en ratones, y gracias a sus múltiples promotores intragénicos y exones con *splicing* alternativo, pueden producir múltiples isoformas (α , β y γ)²¹. Las tres proteínas de la familia tienen un patrón de expresión diferencial en el cerebro, siendo *SHANK3* la única que se encuentra enriquecida en las sinapsis glutamatérgicas corticoestriatales^{21,22} (**Figura 1**). La haploinsuficiencia del gen *Shank3* se encuentra en más del 0.5% de los casos de trastorno del espectro autista, convirtiéndola en una de las causas monogénicas más prevalentes^{16,23,24}.

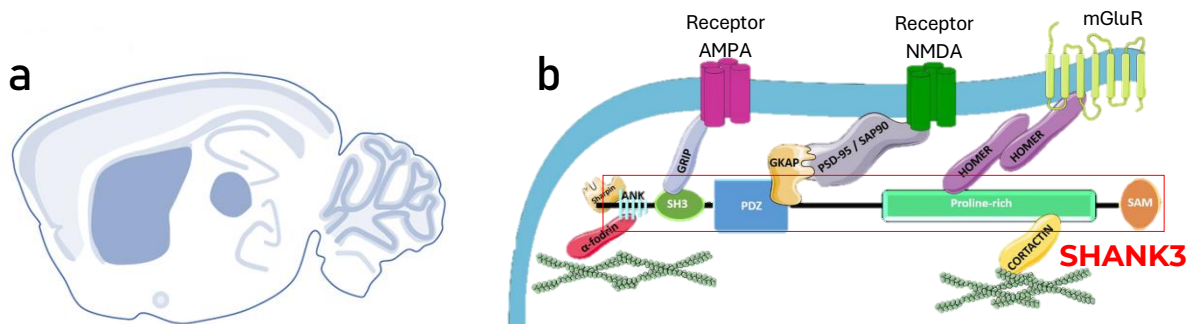


Figura 1 - El gen *Shank3* se encuentra afectado en un porcentaje significativo de casos de TEA. a) Esquema de corte sagital de cerebro de ratón, donde se indica la distribución de la proteína *SHANK3*, mayor intensidad de color representa mayor expresión de la proteína. El ARNm de *Shank3* se encuentra enriquecido en la corteza cerebral, el tálamo, el cuerpo estriado, las zonas CA1 y CA3, y el giro dentado del hipocampo, y en las células granulares del cerebelo. Adaptado de Monteiro & Feng, Nat Rev Neurosci, 2017. **b)** Representación esquemática de una postsinapsis glutamatérgica. Allí, la proteína *SHANK3* (encuadrada en rojo) cumple funciones de andamiaje. En los ratones mutantes *Shank3B*, se encuentra alterado el fragmento del gen que codifica el dominio PDZ. Imagen adaptada de Costales & Kolevzon, Neurotherapeutics, 2015.

Sin embargo, no todos los casos de TEA son de origen genético, sino que también existen factores de riesgo ambientales²⁵. Un ejemplo de esto es el ácido valproico (VPA), un fármaco comúnmente utilizado para tratar la epilepsia refractaria y el trastorno bipolar. En humanos, se descubrió que la exposición prenatal a VPA aumenta el riesgo de desarrollar TEA en niñas y niños^{26–30}, especialmente cuando se administra en las etapas tempranas del embarazo, cuando ocurre el cierre del tubo neural^{27,31}. Si bien no se conoce con precisión el mecanismo de acción de este fármaco teratogénico en el desarrollo, se cree que podría estar afectando la plasticidad sináptica³², apoptosis neuronal³³, o incluso la expresión génica, mediante mecanismos epigenéticos, en particular la remodelación por inhibición de las histonas desacetilasas, ya que es un inhibidor de estas enzimas³⁴.

Modelos Murinos de Autismo

Los TEA son desórdenes muy complejos, y se encuentran en un espectro muy amplio, por lo que, hasta el momento, ningún modelo animal es capaz de representarlo completamente. Sin embargo, los modelos murinos son muy útiles a la hora de investigar síntomas y comportamientos asociados con el autismo, así como los mecanismos que lo subyacen y los posibles tratamientos. Por esta razón, para este estudio se analizaron dos modelos de autismo, con orígenes y sintomatologías distintas.

El modelo genético utilizado en esta tesis, caracterizado en 2011 por Peça *et al*¹⁸ se basa en una mutación del gen *Shank3* en la que se genera una delección del dominio PDZ, que afecta la expresión de las tres isoformas producidas por este locus (elimina α y β y reduce γ). Esto genera los mutantes conocidos como *Shank3B*^{-/-} (Shank3B KO), los cuales presentan características comportamentales similares a las personas con TEA. Al evaluarlos en la semana cinco de edad, los machos de este modelo presentan exceso de auto-acicalamiento, llegando incluso a generarse lesiones¹⁸. Además, presentan comportamientos disfuncionales en todas las pruebas de interacción social. En la prueba de sociabilidad de tres cámaras, donde el animal puede interactuar con un coespecífico que se encuentra en una pequeña jaula, o con una jaula vacía, los ratones de este modelo prefieren la jaula vacía. Cuando esta jaula es ocupada por otro ratón, novedoso para el sujeto de prueba, los animales *Shank3B*^{-/-} prefieren permanecer en la zona central neutra, en lugar de interactuar con cualquiera de los dos ratones en las jaulas¹⁸, en contraste con los animales control, los cuales se caracterizan por ser animales sociales. Por otra parte, en pruebas de interacción social en arena abierta, donde interactúan en díadas con animales de tipo salvaje (WT, *wild-type*), presentan un déficit en el tiempo total de interacción social, en particular una menor frecuencia de olfateos oronasales y anogenitales¹⁸. Sin embargo, al evaluar la interacción social en machos y hembras de tres semanas de edad en una prueba de interacción social, donde los animales se colocan en una arena neutra con un animal del mismo sexo y edad e interactúan libremente durante diez minutos, ninguno de los dos sexos presenta diferencias fenotípicas comportamentales respecto a los *wild-type*¹⁷. Los animales macho de este modelo, de cinco semanas de edad, además no presentan alteraciones motoras, evaluadas en un test de coordinación motora, o en la prueba de campo abierto, ni en los niveles de tigmotaxia, también evaluado en el campo abierto. Sin embargo, sí presentan comportamientos de tipo ansioso, como ser exploración vertical reducida, menor tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado en círculo, y mayor latencia para cruzar al área iluminada en el modelo de transición luz-oscuridad¹⁸.

El modelo ambiental elegido para esta tesis es la exposición prenatal a ácido valproico (VPA). En roedores, la administración de VPA en el día 12.5 de gestación genera alteraciones en el desarrollo similares a los observados en humanos, generando un fenotipo comportamental semejante al observado en personas con TEA^{31,35}. Los ratones de este modelo presentan retrasos en el desarrollo, demorando más tiempo en comenzar la apertura ocular y presentar el reflejo de enderezamiento, que se encuentran más pronunciados en machos que en hembras³⁶. Por otra parte, la literatura indica que tanto machos como hembras del modelo, evaluados entre las semanas cinco y siete de edad presentan un aumento significativo del comportamiento de auto-acicalamiento³⁶, y a las ocho semanas de edad presentan déficits en la actividad locomotora total, así como las exploraciones verticales, analizadas en el campo abierto³⁷. Finalmente, en ambas edades evaluadas, los machos presentan déficit sociales significativos, que no se observan en hembras^{36,37}.

Células Microgliales: homeostasis y neuroinflamación en TEA

La microglía son células gliales del sistema inmune innato, residentes del sistema nervioso central (SNC), con capacidad fagocítica. Son de origen mesodérmico, y durante el desarrollo embrionario, sus progenitores migran hacia el SNC, hasta que se completa la formación de la barrera hematoencefálica. Una vez en el SNC, la microglía se sincroniza con el desarrollo neuronal, y a medida que el sistema nervioso madura, cumple distintas funciones, donde cumple con funciones fisiológicas y señalizaciones características³⁸. Durante el desarrollo embrionario, la microglía cumple gran variedad de funciones, como ser la regulación de la formación de los tractos axonales, migración de interneuronas, y fagocitosis de progenitores neurales. Además está postulada su influencia en la astrogénesis, oligodendrogénesis y la formación de vasos sanguíneos³⁹. La colonización del cerebro por parte de la microglía se da de forma progresiva, y en ratones se completa sobre el final de la segunda semana posnatal³⁹. Estas células, que en condiciones de salud representan cerca del 10% de las células del SNC⁴⁰, se presentan con densidad variable en las distintas regiones del cerebro. Son muy ramificadas, tienen dominios territoriales, y sus procesos sensan constantemente el tejido parenquimatoso, recorriendo el volumen total del cerebro cada pocas horas⁴¹, detectando una gran variedad de señales, y actuando en consecuencia, manteniendo el SNC en homeostasis. Si durante este sensado se detectan señales que indiquen la presencia de patógenos o lesiones físicas, la microglía es capaz de alterarse transcripcional y morfológicamente para cumplir funciones inmunológicas, convirtiéndose en microglía reactiva. La conversión de microglía homeostática a reactiva, provocada por alteraciones en la homeostasis, como por ejemplo la presencia de patógenos o estímulos inflamatorios, se da en etapas. En primer lugar, la microglía prolifera, y retrae sus ramificaciones, cambiando su morfología a “microglía ameboide”. Esta microglía reactiva es capaz de producir citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, tales como TNF α , especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, así como IL-1 β e IL-6. Además, la microglía ameboide es quimiotáctica, es decir, es capaz de migrar hacia el sitio de lesión^{42,43} (**Figura 2**). Estudios previos han encontrado evidencia de procesos crónicos neuroinflamatorios y presencia aumentada de microglía reactiva en distintas áreas cerebrales de niños autistas, analizados post-mortem, lo cual podría estar indicando que la neuroinflamación podría estar jugando un rol esencial en el desarrollo de esta patología, así como su mantenimiento a lo largo de la vida de los individuos^{44–}

46.

Además de sus funciones frente a daños físicos o presencia de agentes patógenos, la microglía también cumple funciones fisiológicas no inflamatorias, homeostáticas, esenciales para el desarrollo y mantenimiento del SNC⁴⁷ (**Figura 3**). Su interacción con las neuronas es de vital importancia, y defectos en su funcionamiento puede conducir a trastornos del neurodesarrollo (**Figura 4**).

Algunos de sus principales roles fisiológicos son la regulación neuronal mediante apoptosis y poda sináptica, y la plasticidad sináptica. La microglía es capaz de inducir la muerte celular programada de neuronas sin provocar inflamación, y su posterior limpieza, lo cual es esencial durante la formación de circuitos neurales. Por otra parte, durante el desarrollo del SNC, la microglía es capaz de eliminar estructuras sinápticas, como ser axones y espinas dendríticas, mediante lo que se conoce como poda sináptica⁴⁸. Durante el desarrollo neuronal se genera un alto número de conexiones sinápticas y, en función de la actividad que presenten, son mantenidas y reforzadas, o eliminadas mediante poda sináptica^{49,50}. Esta remodelación y refinación sináptica es esencial para la formación y el mantenimiento del balance entre excitación e inhibición (balance E/I) tanto en las entradas sinápticas de neuronas individuales, como en los

circuitos neurales. El balance E/I puede ser afectado tanto por la falta como por el exceso de poda sináptica por parte de la microglía, y se ha sugerido que este podría ser el mecanismo que subyace muchos desórdenes del neurodesarrollo, incluyendo TEA⁵¹. En particular, se ha sugerido que un aumento de sinapsis excitatorias en circuitos neurales determinados podrían subyacer algunos fenotipos autistas, como ser déficits sociales y de comunicación, así como el aumento de la presencia de intereses restringidos y comportamientos repetitivos, al menos en parte de los casos⁵².

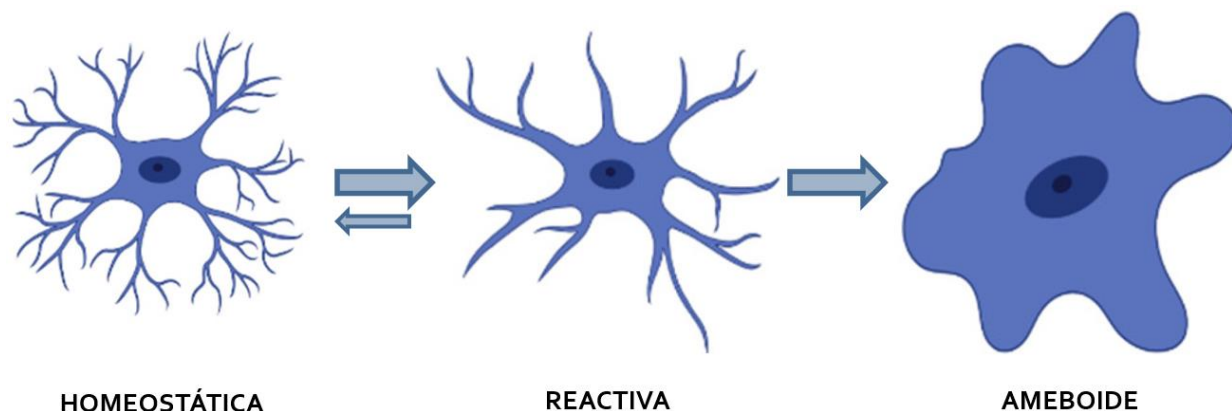


Figura 2 - Distintos estados morfológicos de las células microgliales. La microglía homeostática es una célula muy ramificada, que censa constantemente el tejido parenquimatoso del SNC. Esta morfología está presente en condiciones fisiológicas. Frente a la presencia de lesiones físicas o elementos patógenos, la microglía se convierte en reactiva, aumenta su tamaño somático, y tiene procesos menos ramificados y más gruesos. Produce citoquinas y quimioquinas, y tiene capacidad migratoria. En condiciones neuroinflamatorias, donde hay moléculas proinflamatorias en altas concentraciones durante períodos de tiempo prolongados, la microglía cambia su morfología a ameboide: no presenta ramificaciones, es proinflamatoria y puede cumplir la función de presentación de antígenos.

Los “períodos críticos” o “períodos sensibles” son ventanas temporales postnatales tempranas donde aumenta la plasticidad de circuitos determinados, que son moldeados en función de la experiencia, y dependen de forma directa del balance E/I a nivel cortical⁵³. Los errores de poda sináptica, ya sea por falta o exceso, que se den durante estos períodos, generarán entonces problemas a largo plazo en la conectividad sináptica⁵⁴. Dado que la microglía responde a señales de inflamación, el exceso o falta de poda sináptica podría ser promovido por factores ambientales capaces de causar inflamaciones locales o sistémicas durante los períodos críticos⁴⁰.

En estudios post-mortem de humanos diagnosticados con autismo se observó una alteración en el número y morfología de la microglía, así como alteraciones en la interacción entre microglía y neuronas⁵⁵. Además, estudios transcriptómicos del genoma completo revelaron que algunos pacientes presentan alteraciones en genes específicos de microglía, entre ellos marcadores relacionados al estado inflamatorio de la microglía⁴⁰.

Si bien la microglía no ha sido estudiada aún en el modelo genético de autismo Shank3B, Peça y colaboradores analizaron las sinapsis excitatorias proyectadas desde la corteza cerebral hacia las neuronas espinosas medianas (MSN) del cuerpo estriado. Allí encontraron alteraciones en la composición de la densidad postsináptica, defectos en la morfología de las MSN, y disminución en la neurotransmisión corticoestriatal generada por cambios en la postsinapsis, es decir, alteraciones en el balance E/I corticoestriatal^{18,53}.

Por otra parte, en el modelo ambiental, VPA, la microglía ha sido un tema de interés. Dado que el VPA es un inhibidor de las histonas deacetilasas, el tratamiento durante el desarrollo afecta la expresión de muchos genes mediante desacetilación de la cromatina⁵³. En ratas macho de este modelo se ha reportado un desbalance entre excitación e inhibición muy significativo, y presentan incrementos importantes en conectividad, reactividad y plasticidad en corteza prefrontal medial, corteza somatosensorial y amígdala^{53,56,57}. Además, se encontró un aumento de cerca del 37% de células positivas para el marcador Iba1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*) en la corteza cerebral de ratas macho de este modelo en comparación con su control⁵⁸. Iba1 es una proteína de unión a calcio, que se expresa únicamente en las células microgliales, por lo que puede utilizarse como marcador tanto en cultivos como en muestras de tejido⁵⁹.

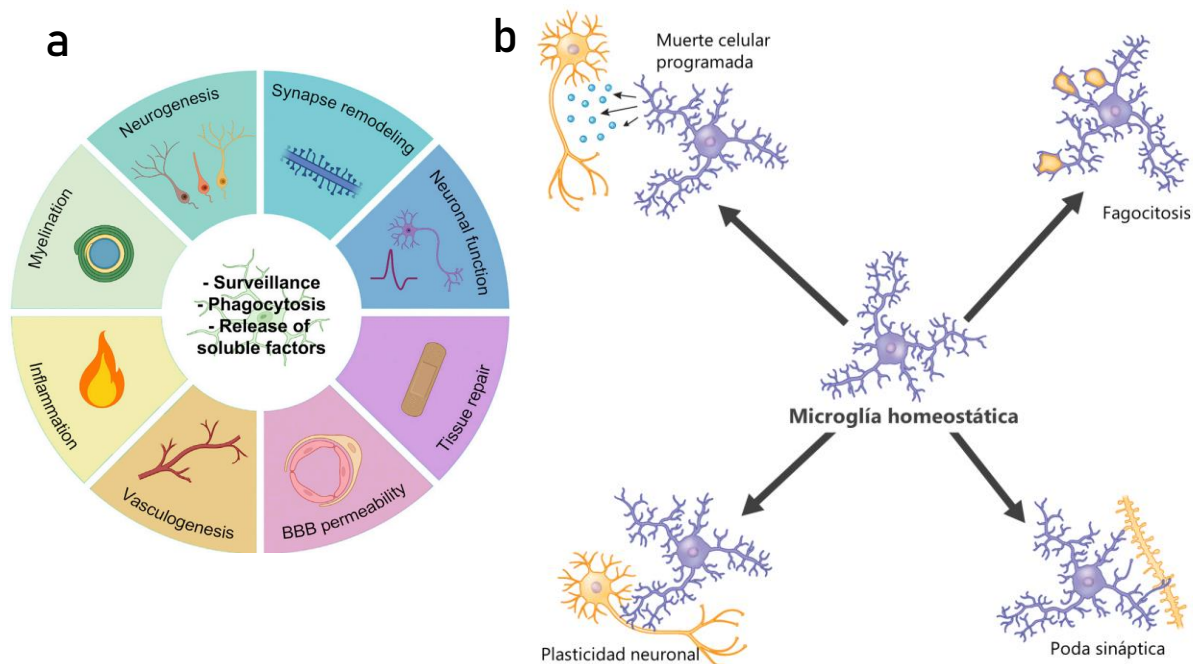


Figura 3 - Representación esquemática de las funciones homeostáticas de la microglía. **a)** En el círculo interno pueden observarse las propiedades y funciones principales de la microglía: censo, fagocitosis y capacidad de liberar factores solubles, las cuales le permiten realizar las funciones biológicas que se enumeran en el círculo externo (neurogénesis, remodelación sináptica, función neuronal, reparación de tejidos, permeabilidad de la barrera hematoencefálica, vasculogénesis, inflamación y mielinización). Extraído de Paolicelli et al, Neuron, 2022. **b)** En condiciones de homeostasis, la microglía sensa el parénquima del SNC, y cumple con roles fisiológicos de desarrollo, mantenimiento y plasticidad. En la imagen se destacan la muerte celular programada, fagocitosis, plasticidad neuronal, y poda sináptica. Adaptado de Salter and Stevens, Nat Med, 2017.

Todos los estudios referidos a células microgliales mencionados previamente, realizados con animales de los modelos Shank3B y VPA han sido llevado a cabo en machos. El desarrollo cerebral en mamíferos es sexualmente dimórfico, y distintos estudios en roedores han encontrado diferencias entre sexos de las características de la microglía, tanto en su migración y colonización del SNC durante el desarrollo, como su morfología y número de células en distintas áreas del cerebro durante el desarrollo posnatal temprano^{39,40,60}. Un estudio encontró que, en el día cuatro de vida, las ratas macho tienen significativamente más células microgliales que las hembras en la corteza parietal, las áreas CA1 y CA3, y el giro dentado del hipocampo, y la amígdala. Sin embargo, esto se revierte, y se observa mayor cantidad de células microgliales en hembras luego de un mes y de dos meses de vida. Además, en el mismo estudio observaron

variaciones importantes en la morfología y la expresión de citoquinas y quimioquinas en los distintos sexos y edades⁶¹. Por otra parte, en ratas se observó que en ciertas áreas del cerebro la colonización microglial del cerebro en desarrollo está ligada al sexo, dependiendo principalmente de estrógeno. Además, en adultos, el estrógeno es necesario para la generación tanto de respuestas basales como proinflamatorias, mientras que la testosterona inhibe su transformación a microglía reactiva⁶². El área preóptica es un área del cerebro sexualmente dimórfica tanto en roedores como humanos, que se desarrolla de acuerdo con el ambiente hormonal que la rodea⁶³. En roedores, es esencial para comportamiento sexual y de cópula de ambos sexos, así como el comportamiento maternal de las hembras, entre otros⁶⁴. Esto se da gracias a la testosterona, que es aromatizada a estradiol, el cual promueve la producción de prostaglandina E2. En el cerebro en desarrollo, la microglía es capaz tanto de producir como de responder a prostaglandinas. En ratas, la inhibición de las células microgliales impide la masculinización del área preóptica, mientras que la administración de estradiol o prostaglandina E2 en hembras genera la reactividad de microglía e induce la masculinización de esta área⁶⁰. Todo esto indicaría entonces que estos dimorfismos sexuales en la microglía podrían subyacer, al menos parcialmente, las diferencias observadas entre sexos en trastornos del neurodesarrollo, como ser el TEA, así como la posible diferencia de respuestas a tratamientos terapéuticos.

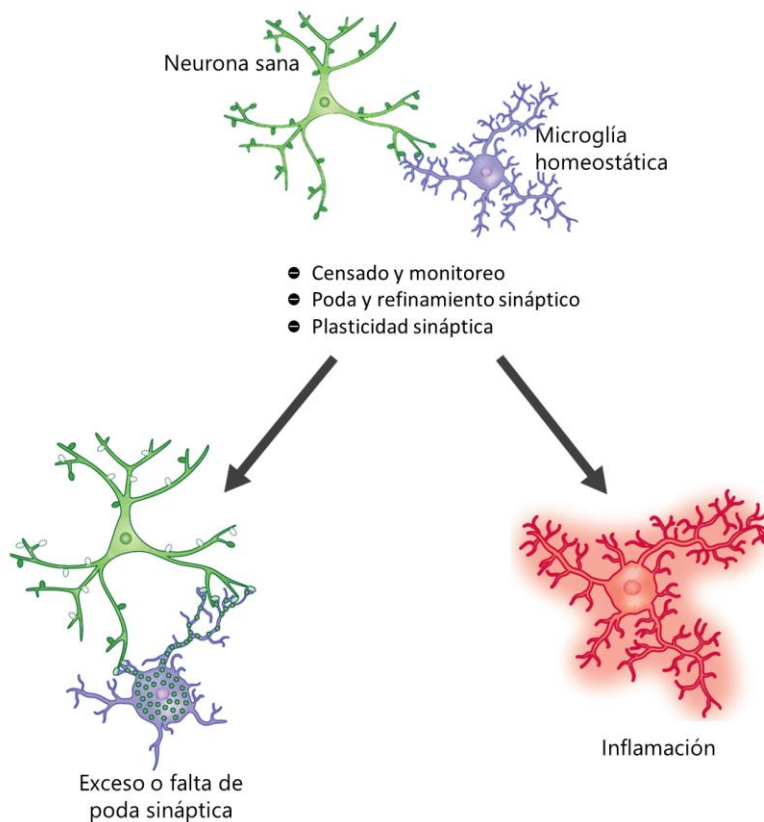


Figura 4 - Funciones de la microglía en homeostasis y en enfermedad. La microglía tiene roles muy variables tanto en estado de salud como frente a patógenos. Las fallas en las funciones microgliales, como ser la falta o exceso de poda sináptica contribuyen al desarrollo de enfermedades del neurodesarrollo, como TEA. Adaptado de Salter and Stevens, Nat Med, 2017

Fitocannabinoides y el Sistema Endocannabinoide: aplicaciones terapéuticas

Históricamente, la planta *Cannabis sativa* (*C. sativa*) ha sido utilizada con fines medicinales, y actualmente existe un gran interés en sus posibles aplicaciones biológicas, y los mecanismos que las subyacen⁶⁵. *C. sativa* produce un amplio rango de metabolitos, incluyendo terpenos y flavonoides, pero los cannabinoides son los más estudiados. Se han descubierto más de 140 cannabinoides distintos, de los cuales los más abundantes son Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol (CBD), cannabicromeno (CBC) y cannabigerol (CBG), y sus respectivos precursores ácidos (Δ^9 -THCA, CBDA, CBCA y CBGA). En la naturaleza, estos compuestos se encuentran mayoritariamente en forma de ácidos carboxílicos, y son capaces de convertirse en su forma neutra a través de un proceso de descarboxilación no enzimática⁶⁶.

Estos compuestos son biológicamente activos gracias a su capacidad de interactuar con diversos blancos farmacológicos, como ser el sistema endocannabinoide (sEC). El sEC es un sistema de señalización lipídico, evolutivamente muy conservado⁶⁷, y que está presente desde las etapas más tempranas del desarrollo embrionario. Tiene funciones esenciales en el desarrollo del sistema nervioso, y en adultos tiene funciones esenciales de regulación y modulación de la actividad neural, así como en la plasticidad sináptica y en la homeostasis de procesos emocionales y comportamentales^{68,69}. Además, funciona como modulador de los sistemas nervioso autónomo, endócrino, inmune y reproductivo⁶⁷. En humanos, uno de los receptores del sistema, CB₁, puede detectarse a nivel cerebral desde la semana catorce del desarrollo, especialmente en la corteza cerebral, hipocampo, núcleo caudado, putamen y corteza cerebelar, en forma similar a su distribución en adultos⁷⁰. Este sistema está compuesto por ligandos endógenos conocidos como endocannabinoides (araquidonoiletanolamida, también conocido como anandamida – AEA –, y 2-araquidonoilglicerol – 2-AG), las enzimas que sintetizan, transportan y degradan los endocannabinoides, y sus receptores^{68,70,71}. Se han identificado cinco subtipos de receptores endocannabinoides distintos, pero los únicos dos que han sido clonados, y los más estudiados, CB₁ y CB₂ (**Figura 5**), son receptores de membrana unidos a proteína G (GPCR), siendo CB₁ el receptor metabotrópico más abundante en el cerebro, que se expresa principalmente en axones y terminales presinápticas neuronales^{72–74}. Por otra parte, CB₂ en el SNC se expresa en neuronas tales como neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral⁷⁵, en una pequeña proporción de neuronas del tronco encefálico, y de forma constitutiva en microglía, pero esta expresión aumenta frente a condiciones inflamatorias^{76,77}. Los receptores CB₂ también se expresan en tejidos que producen y regulan células del sistema inmune, como ser el bazo y el timo. Ambos receptores tienen funciones de modulación enzimática, su activación inhibe la actividad de la adenilato ciclasa y estimula la actividad de protein-quinasas activadas por mitógenos⁷¹. Además, inhiben los receptores NMDA, disminuyendo las concentraciones de calcio celulares, suprimiendo la excitación neuronal y por lo tanto inhibiendo la liberación de neurotransmisor, lo cual confiere efectos neuroprotectores^{71,78,79}. A gran escala, estos receptores están implicados en funciones tales como el desarrollo cerebral, aprendizaje y memoria, comportamiento motor, regulación del apetito, temperatura corporal, regulación del miedo y el estrés, percepción del dolor e inflamación^{68,73,80}.

Los compuestos naturales no endógenos capaces de interactuar con el sEC se conocen como fitocannabinoides. Si bien estructuralmente son similares, distintos cannabinoides tienen distintos efectos fisiológicos. Por ejemplo, Δ^9 -THC es un agonista parcial del receptor CB₁, lo cual le confiere efectos psicotrópicos, mientras que CBD es un modulador alostérico negativo de CB₁, y no tiene efectos psicotrópicos^{71,74,81}. Estudios sobre los efectos biológicos de extractos de cannabis refieren a la existencia de un efecto séquito (“entourage”): una sinergia entre los

componentes del extracto (cannabinoides, terpenos y flavonoides) que tiene como consecuencia que la mezcla de compuestos tenga un mayor efecto que los compuestos aislados. Este efecto ha sido postulado en numerosos experimentos con animales, donde se sugiere que CBD, Δ^9 -THC, fitocannabinoides menores, y terpenos estarían actuando de forma sinérgica, potenciando el efecto farmacológico del cannabinoide principal, disminuyendo los efectos secundarios, o modificando la farmacocinética⁸²⁻⁸⁴. Sin embargo, el mismo no está definido mecanísticamente como un fenómeno estable y predictivo^{85,86}.

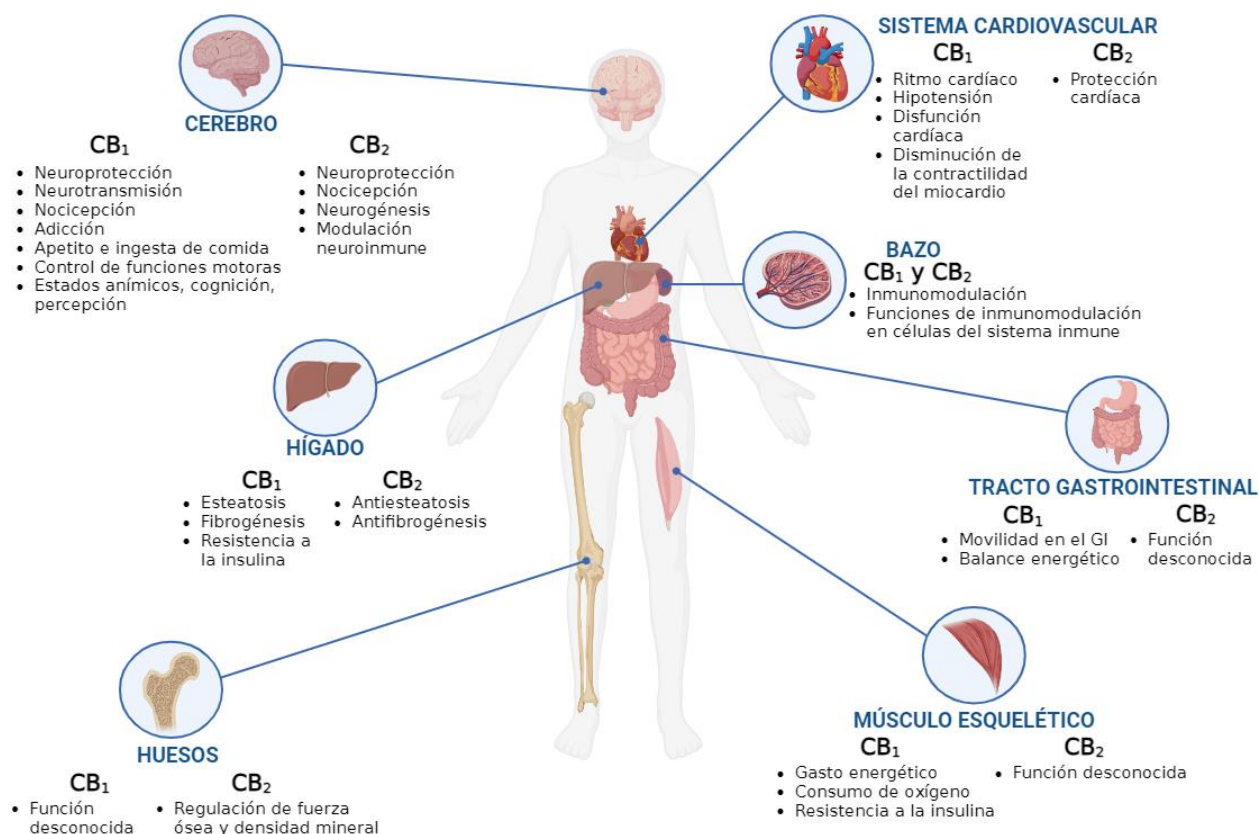


Figura 5 - Localización de los receptores CB₁ y CB₂ en el cuerpo humano, y sus principales funciones fisiológicas. Adaptado de An et al, Int J Mol Sci, 2020.

Dado el rol neuromodulador del sEC y la amplia distribución de sus receptores en el SNC tanto en humanos como en roedores, numerosos estudios han analizado las posibles funciones de los fitocannabinoides y los cannabinoides sintéticos para el tratamiento de múltiples patologías clínicas tanto en modelos animales como en humanos. Δ^9 -THC es un agonista parcial de CB₁ y CB₂⁸⁷, sus efectos biológicos frente a la interacción con CB₁ son dosis dependientes, pudiendo tener efectos psicotrópicos, como la generación de un estado de euforia, relajación y analgesia, o terapéuticos, como antieméticas, anticonvulsivas, analgésicas y neuroprotectoras, y es capaz de mejorar síntomas de neurodegeneración en múltiples modelos animales⁸⁸⁻⁹⁰. Por otra parte, el CBD, que tiene un nivel de toxicidad muy bajo, y un tiempo de vida media de aproximadamente nueve horas, tiene efecto de agonista parcial de CB₂, y modulador alostérico negativo de CB₁, por lo cual no es capaz de activar el receptor, pero sí de modificar la eficiencia y potencia de los ligandos, como ser Δ^9 -THC o 2-AG⁹¹. Ha demostrado tener múltiples propiedades terapéuticas, incluyendo propiedades ansiolíticas, antidepresivas y antipsicóticas, gracias a su capacidad de

estimular la plasticidad sináptica y promover la neurogénesis. Además, tiene propiedades antioxidantes, neuroprotectoras y antiinflamatorias, gracias a su capacidad de interacción con las células endoteliales del SNC, los oligodendrocitos, y la microglía^{74,92,93}. Es interesante destacar que los fitocannabinoides no interactúan únicamente con los receptores del sEC, por lo cual que sus efectos están mediados por múltiples blancos de acción⁹¹.

Los principales cannabinoides ácidos, ácido Δ^9 -tetrahydrocannabinólico (Δ^9 -THCA), ácido cannabidiólico (CBDA), ácido cannabigerólico (CBGA), y ácido cannabícroménico (CBCA) son sintetizados en la planta *C. sativa* y se descarboxilan en función de la temperatura, dando lugar a sus formas neutras (**Figura 6a y 6b**).

Δ^9 -THCA, a diferencia de Δ^9 -THC, no produce efectos psicotrópicos⁹⁴. Es un agonista del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ), el cual media sus acciones neuroprotectoras, así como su rol en la regulación de glucógeno y el metabolismo de adipocitos, por lo cual podría utilizarse como tratamiento de síndromes metabólicos⁹⁵. Además, tiene efectos antieméticos, mediados al menos parcialmente por el receptor CB₁, y antiinflamatorios, mediados por el receptor del sEC GPR55^{95,96} (**Figura 6c**).

El ácido cannabidiólico (CBDA) es el precursor ácido de CBD, y el cannabinoide principal del aceite de semilla de cáñamo, y tiene gran potencial terapéutico. Es un antioxidante muy potente, significativamente más que su contraparte neutra, tanto en ambientes básicos como neutros⁹⁷, y en medios fisiológicos, es capaz de reducir eficientemente radicales libres y óxido nítrico mediante transferencia de electrones^{98,99}. Además, es capaz de inhibir la actividad de ciclooxigenasa-2 (COX-2) con alta especificidad, y mucho más efectivamente que Δ^9 -THCA, confiriéndole propiedades antiinflamatorias¹⁰⁰. Por otra parte, en un modelo murino de inflamación aguda inducida por carragenanos en una pata trasera, la administración sistémica intraperitoneal de CBDA presentó efectos antiinflamatorios y analgésicos, los cuales no pudieron ser replicados con la administración de CBD¹⁰¹. CBDA también tiene efectos antieméticos en ratas, reduciendo náusea y vómitos en mucho mayor medida que CBD¹⁰². Por otra parte, en un modelo de ratones expuestos a condicionamiento de miedo pavloviano, CBD pero no CBDA eliminó la expresión de miedo condicionado, y CBDA pero no CBD normalizó los comportamientos de ansiedad inducidos por trauma¹⁰³. Finalmente, CBDA tiene potencial anticancerígeno, eliminando la expresión de mRNA de COX-2 y la migración de células cancerosas en una línea de cáncer de seno altamente agresiva (MDA-MB-231)^{104,105} (**Figura 6c**).

La microglía expresa de forma constitutiva CB₁ y CB₂ a bajo nivel, pero la expresión de CB₂ aumenta significativamente durante las primeras etapas de respuesta a situaciones patológicas, influyendo en los procesos de migración, proliferación, y liberación de intermediarios proinflamatorios. Durante estas etapas, la microglía es especialmente susceptible a la acción de cannabinoides, tanto endógenos como exógenos, que son capaces de inhibir el proceso de transformación a microglía reactiva^{76,77,92,106}. En el cerebro, los endocannabinoides son sintetizados tanto por astrocitos como por microglía, y en microglía la expresión esta modulada por citoquinas^{93,107}. Los agonistas de CB₂ tienen efecto neuroprotector, dado que son capaces de disminuir el número de células microgliales reactivas^{92,108}. El endocannabinoide 2-araquidonoilglicerol (2-AG) es un agonista de CB₂ que en condiciones neuroinflamatorias estimula la migración y proliferación microglial, y reduce su capacidad de liberar factores proinflamatorios como TNF α y radicales libres^{92,108}. Además, 2-AG tiene funciones neuroprotectoras, actuando como inhibidor de la ciclooxigenasa 2. Por otra parte, AEA es un agonista parcial de CB₂, y tiene propiedades antiinflamatorias. La inhibición de la hidrólisis de

a

Δ^9 -THCA $\rightarrow$ Δ^9 -THC

b

CBDA $\rightarrow$ CBD

c

Δ⁹-THCA

- Enfermedad de Parkinson (neuroprotección) via PPAR-γ
- Síndrome metabólico via PPAR-γ
- Nausea via CB₁ 5-HT_{1A}
- Inflamación via GPR55

CBDA

- Ansidad via 5-HT_{1A}
- Síndrome de Dravet (modelo murino) via 5-HT_{1A}
- Dolor inflamatorio (reduce dolor y edema) via 5-HT_{1A}
- Cáncer de seno via 5-HT_{1A}
- Diabetes via 5-HT_{1A}
- Nausea via CB₁ 5-HT_{1A}

Por otra parte, los cannabinoides exógenos agonistas o agonistas parciales de CB₂ (como Δ⁹-THC o CBD) también tienen efectos neuroprotectores, en particular son capaces de modular la reactividad microglial mediante la inhibición de producción de citoquinas y quimioquinas⁹². Muchas condiciones psicológicas tales como ansiedad, estrés y depresión están relacionadas con aumento del número de células microgliales y cambios en su morfología, así como presencia de marcadores proinflamatorios^{92,110,111}, por lo cual este ha sido un blanco terapéutico muy estudiado. Un ejemplo de esto son experimentos donde se sobreexpresa o se elimina el receptor CB₂. Los ratones modificados genéticamente para no expresar los receptores CB₂ presentan un aumento en la vulnerabilidad a estímulos estresantes¹¹², mientras que aquellos modificados genéticamente para sobre expresar este receptor en el SNC presentan disminuciones el perfil proinflamatorio en modelos de estrés subcrónico¹¹³ y resistencia a estímulos ansiogénicos¹¹⁴, por lo que CB₂ tiene un rol en la regulación de la ansiedad y los desórdenes del estado de ánimo. Otro ejemplo son experimentos donde los ratones son tratados con lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared bacteriana de bacterias gram-negativas que funciona como agente inflamatorio, e induce un fenotipo depresivo, así como daños cognitivos a largo plazo. El tratamiento con LPS genera liberación prolongada de citoquinas y la transformación de las células microgliales reactivas. El tratamiento con CBD o Δ⁹-THC tiene un efecto neuroprotector, rescatando los daños generados en el SNC por la administración sistémica de LPS^{115,116}.

14

crónico con CBD en un modelo murino de esquizofrenia es capaz de disminuir los déficits tanto en una prueba de interacción social como en una de memoria. En ese estudio, los efectos del CBD no son inhibidos mediante el bloqueo de receptores CB₁ ni CB₂, pero sí del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}¹¹⁸. Además, en el mismo modelo, CBD es capaz de inhibir la reactividad microglial¹¹⁹.

Como ya se mencionó previamente, existe evidencia de que los cambios comportamentales encontrados en pacientes con TEA podrían estar relacionados con alteraciones en el número o estado de reactividad microglial en el período perinatal, lo cual afectaría procesos tales como la actividad fagocítica homeostática y la poda sináptica, influyendo en los procesos de maduración sináptica, que podrían ser alterados mediante el tratamiento con cannabinoides. Además, el sEC es crítico para la determinación de los períodos críticos del desarrollo cerebral y, mediante la modulación de sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas, afecta el establecimiento del balance excitación/inhibición, tanto durante el período posnatal temprano como durante la adolescencia^{69,120}. En un estudio realizado en humanos, donde se utilizó espectroscopía de resonancia magnética para medir los niveles de glutamato y GABA en hombres autistas y neurotípicos de aproximadamente treinta años, se encontró que la administración aguda de CBD aumenta los niveles de glutamato en los ganglios basales (GB) y los disminuye en la corteza prefrontal dorsomedial (CPF-DM) en ambos grupos. Sin embargo, la administración de CBD tiene efectos contrarios entre grupos respecto a los niveles de GABA, los cuales aumentan en el grupo control, pero disminuyen en el grupo de TEA, especialmente en el CPF-DM. Esto indicaría que los blancos de acción glutamatérgicos del CBD en GB y CPF-DM no están alterados en hombres adultos con TEA, pero aquellos relacionados con las vías inhibitorias GABAérgicas sí lo están¹²¹.

Finalmente, se han llevado a cabo múltiples estudios clínicos con niños y adolescentes (al menos 80% de los participantes son varones en ambos casos), para evaluar la eficacia de las formas neutras tanto de cannabinoides puros (Δ^9 -THC y CBD), como extractos conteniendo CBD en mayor proporción que Δ^9 -THC^{122,123}. En un estudio realizado con once niños y cuatro niñas de aproximadamente once años de edad, a los que se les administró aceite alto en CBD, (CBD: Δ^9 -THC, 75:1. Dosis de CBD 4.6 mg/kg/día y Δ^9 -THC 0.06 mg/kg/día) durante un máximo de nueve meses, encontraron mejoras muy significativas especialmente en síntomas tales como desórdenes del sueño, déficits atencionales, y déficits en la interacción social. De los once niños, cinco tenían también diagnóstico de epilepsia. En tres de los casos, las crisis epilépticas disminuyeron en un 50%, mientras que, en los otros dos, en un 100%. Además, únicamente se observaron efectos secundarios leves y transitorios¹²⁴.

Existe además evidencia anecdótica del efecto positivo en pacientes autistas del tratamiento con aceites elaborados con extractos de cannabis de forma artesanal, mejorando sus habilidades comunicacionales. En este contexto y en el marco de un Proyecto Alianzas para la investigación (Agencia Nacional de Investigación e Innovación-Khiron Life Sciences Uruguay S.A) se analizaron en la Facultad de Química (Universidad de la República) aceites preparados con los mismos procedimientos artesanales recabados por la empresa. Se encontró preponderancia de las formas ácidas de los cannabinoides principales en estas formulaciones⁶⁶, lo cual sugiere un posible rol de los cannabinoides ácidos en pacientes con TEA que no ha sido explorado.

En este estudio se evaluó si los extractos de cannabis preparados en Facultad de Química son capaces de revertir parcial o totalmente comportamientos de tipo autista encontrados en distintos modelos murinos de TEA. Dado el rol de la microglía en el neurodesarrollo también se estudió su rol como blanco celular del tratamiento.

Hipótesis

Basado en resultados anecdóticos del uso de aceites de cannabis por personas diagnosticadas con TEA, postulamos que extractos de la planta *C. sativa* tienen el potencial de revertir comportamientos de tipo autista en modelos murinos de TEA en machos y hembras.

Además, proponemos que la administración de los extractos afectará las células microgliales de estos ratones.

Objetivo general

Evaluar el efecto de extractos de dos quimiotipos de *Cannabis sativa* en dos modelos murinos de TEA tanto a nivel comportamental como celular, en machos y hembras.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el fenotipo comportamental de dos modelos murinos de autismo, uno genético y uno ambiental, en ambos sexos.
2. Evaluar del efecto de extractos producidos a partir de dos variedades de cannabis en ambos modelos y sexos
 - 2.1. Evaluar del efecto de extractos producidos a partir de dos variedades de cannabis, uno alta en Δ^9 -THCA y otro alto en CBDA en el modelo genético
 - 2.2. Evaluación del efecto del extracto producido a partir de cannabis alto en CBDA, y evaluación de la posible recapitulación del efecto mediante la administración del cannabinoide principal puro en el modelo ambiental.
3. Caracterizar la microglía en ambos modelos y sexos, y analizar el posible efecto de los tratamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos de esta tesis fueron llevados a cabo en el Institut Pasteur de Montevideo (IPMon), en el Laboratorio de Neuroinflamación y Terapia Génica. Este proyecto se encuentra enmarcado dentro del Proyecto Alianzas para la Innovación (Agencia Nacional de Investigación e Innovación y la empresa Khiron Life Sciences Uruguay S.A., ALI_1_2018_1_147904). También fue financiado por una beca de posgrado otorgada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII - POS_NAC_2021_1_169851), y la Beca Paulina Luisi edición 2021, otorgada por el Institut Pasteur de Montevideo. La investigación se realizó cumpliendo con la regulación del IRCCA (Instituto para la Regulación y Control del Cannabis, Uruguay) bajo tres licencias de investigación a lo largo de la maestría, una Licencia de Investigación Científica otorgada a Khiron Life Sciences Uruguay S.A. y dos a Inés Carrera, Facultad de Química.

ANIMALES

En todos los experimentos se utilizaron ratones hembra y macho (*Mus musculus*) adultos, a partir de cuatro semanas de edad, criados en el bioterio convencional de la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio (UBAL) del IPMon, donde también fueron llevados a cabo todas las pruebas de comportamiento. Los ratones se mantuvieron en cajas de entre 2 y 6 ratones en un ambiente controlado, en condiciones estándar de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), 40-60% de humedad relativa, y acceso *ad libitum* a comida y agua. El protocolo experimental correspondiente a este proyecto fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur de Montevideo (001-19 y 006-23).

Modelo genético murino de autismo: *Shank3B knockout (Shank3B^{-/-})*

Los ratones *Shank3B*¹⁸, de trasfondo genético C57BL/6, se adquirieron en heterocigosis de *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME), y se realizaron cruzamientos para obtener crías homocigotas *knockout* (KO) para dicho gen (*Shank3B*^{-/-}).

Genotipado

Se realizó el genotipado de las crías mediante PCR a partir de una sección de 5mm de cola, obtenida en el momento del destete, a los 21 días de nacimiento. El ADN se extrajo mediante la digestión de la muestra en 500µL de solución de lisis (1M Tris-HCl pH= 8, 10mM EDTA pH= 7.5, 100mM NaCl; 0.5% SDS; Proteínasa K 500µg/mL) a 55 °C en bloque térmico durante dieciséis horas. A continuación, se purificó el ADN, incubando durante diez minutos en hielo con 300µL de NaCl, seguido de centrifugación a 9500g. El sobrenadante resultado de la centrifugación se traspasó a un nuevo tubo, donde fue precipitado con 1mL de etanol a -20°C en tres centrifugaciones sucesivas a 14000g, la primera con etanol 95% y las siguientes con etanol 70%. Luego de decantar el sobrenadante de la última centrifugación, se dejó secar el pellet en termobloque a 55°C durante treinta minutos, para eliminar completamente el etanol del tubo. Finalmente, se resuspendió el pellet en 50µL de agua milliQ y se midió la concentración con un nanodrop DeNovix DS-11 FX.

Se realizaron reacciones de PCR para evaluar la presencia o ausencia de la delección (*Shank3B*), y únicamente fueron utilizados para las pruebas aquellos homocigotas (*Shank3B*^{-/-}). Para ello, se llevó a cabo la reacción de cada muestra por duplicado, con cebadores WT o KO, de forma tal de evidenciar la presencia o ausencia del gen. Los cebadores utilizados fueron: *Forward* (común

Tabla 1 - Componentes de la mezcla para PCR. Volumen total de cada tubo: 20 μ L

Componente	Volumen (μ L)/tubo
Solución tampón 10x	2 μ L
MgCl ₂ 25mM	0.75 μ L
dNTP (2.5mM)	0.2 μ L
primer <i>forward</i>	0.1 μ L
primer WT/KO <i>reverse</i>	0.1 μ L
Taq ADN Polimerasa (5U/ μ L)	0.2 μ L
H ₂ O milliQ	11.65 μ L
ADN (20ng/ μ L)	5 μ L

para ambas reacciones) GAG ACT GAT CAG CGC AGT TG, *WT reverse* TGA CAT AAT CGC TGG CAAAG, y *KO reverse* GCT ATA CGAAGT TAT GTC GAC TAG G. La amplificación de ADN se llevó a cabo en un termociclador Applied BioSystems 2700. En todos los casos, se utilizaron controles con ADN de animales WT y KO conocidos, y agua como control negativo. Los componentes utilizados para cada mezcla de PCR (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) se detallan en la **tabla 1**, mientras que las condiciones establecidas para los ciclos de amplificación se especifican en la **tabla 2**.

Tabla 2 - Condiciones de ciclado para la PCR

Paso	Temp (°C)	Tiempo	Notas
1	94	2 min	
2	94	20 sec	
3	65	15 sec	-0.5 decrecimientos por ciclo
4	68	10 sec	
5			Repetir pasos 2-4 por 10 ciclos
6	94	15 sec	
7	60	15 sec	
8	72	10 sec	
9			Repetir pasos 6-8 por 23 (KO) o 26 (WT) ciclos
10	72	2 min	
11	10		Hold

Los resultados de las reacciones de PCR se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, en corridas de 38 minutos a 100V. El resultado esperado de la amplificación para animales WT es de 374 pb, y para animales KO es de 153pb. La presencia de ambos amplicones sería indicativo del gen en heterocigosis.

Los animales WT y KO seleccionados para el estudio provienen de camadas de hermanos, de forma tal de contemplar que hayan estado bajo iguales condiciones de crianza durante la lactancia.

Modelo ambiental murino de autismo: Ácido Valproico (VPA)

Este modelo se llevó a cabo con ratones C57BL/6. Para generar este modelo, los animales deben ser tratados durante el desarrollo prenatal con ácido valproico. Para ello, se coloca un puñado de cama de macho en una caja con dos hembras, de forma tal que sincronicen su ciclo estral. Dos días después, se espera que las hembras estén en estro (sexualmente receptivas) y se mueven las hembras a la caja del macho. A la mañana siguiente se corrobora la presencia de tapón vaginal, y se devuelven las hembras a su caja. El día donde se observa el tapón vaginal es el día 0.5 de preñez. A partir de este día, se realiza un seguimiento de peso para confirmar la preñez. En el día 12.5¹²⁵ se administra VPA 500mg/kg (200µL) subcutáneo, y se separan las hembras en cajas individuales.

EXTRACTOS DE *Cannabis sativa*

El material vegetal fue donado por la empresa Khiron Life Science Uruguay S.A. y procesado en la Facultad de Química (Universidad de la República), Laboratorio de Farmacognosia y Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones del Departamento de Química Orgánica. Se trabajó con dos quimiotipos de cannabis: uno con alto contenido en Δ^9 -THC total (eTHCA) y otra con alto contenido en CBD total (eCBDA). En breve, los extractos se obtuvieron mediante extracción etanólica de inflorescencias según Fernández *et al*⁶⁶. La caracterización de las resinas obtenidas se realizó mediante HPLC-DAD con estándares para cada cannabinoide (**Tabla 3**). También se realizó la purificación del cannabinoide CBDA utilizando métodos de separación cromatográficos y se cuantificó la pureza de los mismos (**Tabla 4**).

La administración a los animales se hizo de forma intraperitoneal, utilizando EtOH:KolliphorEL:salino en una proporción 1:1:18 como vehículo.

Se utilizaron tres extractos de cannabis, dos altos en CBDA (RB009 y RB10456) y uno alto en THCA (RA005). El extracto RB009 se utilizó para las pruebas de dosis, y para los primeros cuatro días de inyección de animales del modelo genético. El resto de los días de inyección del modelo genético, así como todas las inyecciones del modelo ambiental se realizaron con RB10456. Todas las inyecciones de eTHCA se llevaron a cabo con RA005.

Análisis dosis-respuesta

Para determinar la dosis adecuada de cada extracto se administraron cuatro dosis diferentes tomando como referencia el cannabinoide principal (0.1, 1, 10 y 50mg/kg) a ratones C57BL/6 hembras y machos de ocho semanas de edad. Luego de treinta minutos se realizó una prueba de campo abierto, donde se analizó la actividad locomotora y exploratoria, y el nivel de ansiedad. En base a los resultados obtenidos, y dado que no existen antecedentes de estudios preclínicos con las formas ácidas de los cannabinoides, se decidió la dosis de trabajo para el resto de los experimentos como 10mg/kg, ya que no afecta la actividad motora.

Tabla 4 - Cuantificación de cannabinoides presentes en las resinas etanólicas utilizadas mediante HPLC-DAD. Todos los valores expresados en %m/m (gramos de cannabinoides en 100g de resina). LOD: límite de detección, LOQ: límite de cuantificación

Cannabinoide	Alto en CBDA		Alto en THCA
	RB0009	RB10456	RA0005
CBDA	83,4	76,96	0,21
CBD	1,74	0,81	<LOD
Δ^9-THC	0,18	0,11	4,02
Δ^9-THCA	3,07	3,22	74.10
CBDVA	0,06	0,13	<LOD
CBDV	<LOD	<LOD	<LOD
CBC	<LOD	0,22	<LOD
CBCA	13,20	16,41	3.97
CBGA	0,61	0,68	0.49
CBG	0,10	0,08	0.55
THCV	<LOD	<LOD	<LOQ
THCVA	<LOD	<LOD	0.59
CBN	<LOD	<LOD	<LOD
D8/THC	<LOD	<LOD	<LOD

Tabla 3 - CBDA aislado, vehiculado para ensayos murinos. LOQ: límite de cuantificación

Cannabinoide	Concentración (mg/kg)	Pureza
CBDA	3.8	
CBD	<LOQ	95%
CBCA	<LOQ	

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los animales fueron destetados a los 22 días de edad. Entre las cuatro y seis semanas de edad se llevaron a cabo pruebas comportamentales para su caracterización: prueba de campo abierto, prueba de auto-acicalamiento, prueba de interacción recíproca y prueba de enterramiento de bolitas. A partir de ese momento y hasta su sacrificio, todos los animales fueron pesados al menos tres veces por semana. Durante las dos semanas siguientes a la caracterización comportamental, se les administró el tratamiento indicado de forma intraperitoneal en una dosis de 10mg/kg, en un régimen crónico de cinco días de inyección y dos de descanso. En el primer día de la siguiente semana se les administró tratamiento y se los colocó en la sala de comportamiento para habituación. En los días consecutivos se les volvió a realizar las pruebas de comportamiento, manteniéndolos durante toda la semana en la sala de comportamiento y administrándoles el tratamiento correspondiente al final de cada prueba, de tal forma que el posible efecto del mismo no fuese agudo.

Grupos Experimentales

Los grupos experimentales se integraron por animales machos y hembras de cada modelo. En el caso de los animales Shank3B, las pruebas comportamentales de caracterización se llevaron a cabo en dos cohortes. La cohorte “adultos”, compuesta por animales de entre siete y diez semanas de edad, fue utilizada únicamente para la caracterización comportamental. Por otra parte, la cohorte “jóvenes”, compuesta por animales de entre cuatro y seis semanas de edad, tras las pruebas comportamentales, fue dividida en subgrupos para llevar a cabo las pruebas de tratamiento. De acuerdo con el objetivo específico número 2.1, los tratamientos administrados fueron vehículo (veh), extracto alto en CBDA (eCBDA) o extracto alto en Δ^9 -THCA (eTHCA) (**Figura7a**). Por otra parte, los animales VPA comenzaron las pruebas de caracterización comportamental a las cinco semanas de edad para cumplir con el primer objetivo específico, y los tratamientos administrados, de acuerdo con el objetivo específico 2.2, fueron vehículo (veh), extracto alto en CBDA (eCBDA), o CBDA puro (CBDAp) (**Figura7b**).

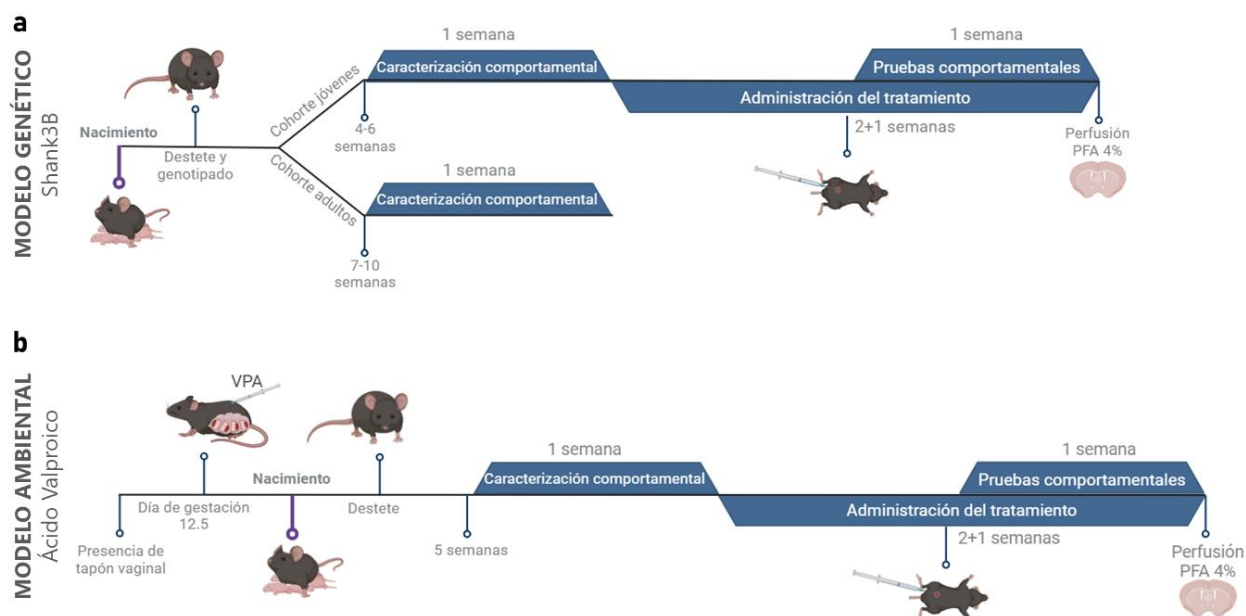


Figura 7 - Líneas de tiempo de los procedimientos experimentales llevados a cabo con ambos modelos. a) representación gráfica de las cohortes de animales del modelo Shank3B, y los experimentos realizados, b) representación de la obtención del modelo ácido valproico (VPA) y los experimentos realizados con los animales del modelo.

Para cumplir con el objetivo específico número tres, tanto los animales de la cohorte jóvenes del modelo Shank3B como los animales del modelo VPA fueron sacrificados mediante perfusión con paraformaldehído 4% (PFA) veinticuatro horas después de la última administración de tratamiento.

Pruebas de comportamiento

Todas las pruebas fueron llevadas a cabo durante la mañana, en condiciones de luz reducida (luz roja, >1 lux) y fueron filmadas utilizando el software *AnyMaze*¹²⁶. Todas las pruebas fueron analizadas con el software *AnyMaze*, excepto las pruebas de interacción recíproca, acicalamiento y de enterramiento de bolitas, que se analizaron por observación directa, sin previo conocimiento del grupo al que pertenece cada animal. En la **Figura 8** puede observarse un esquema de las pruebas comportamentales realizadas.

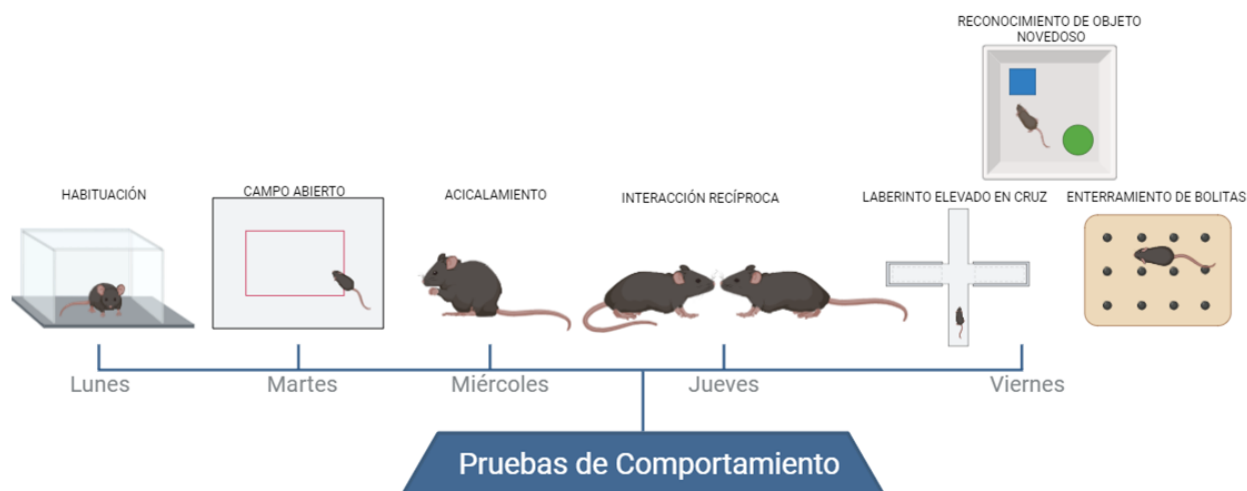


Figura 8 - Línea de tiempo de pruebas comportamentales. Se siguió el mismo orden de pruebas de comportamiento tanto para la caracterización comportamental como para las pruebas posteriores al tratamiento. En todos los casos, se pusieron a habitar los animales en la sala de comportamiento el día lunes, y en los días sucesivos se realizaron las pruebas de campo abierto, auto-acicalamiento, y prueba de interacción recíproca. En el último día de pruebas comportamentales se llevaron a cabo distintas pruebas para distintos animales (laberinto elevado en cruz, reconocimiento de objetos novedosos, o prueba de enterramiento de bolitas). En el caso de las pruebas correspondientes a los tratamientos, las inyecciones intraperitoneales se administraron durante todos los días de la semana, al terminar las pruebas comportamentales correspondientes.

Campo abierto

La prueba de campo abierto, donde se evalúa actividad espontánea, se llevó a cabo en una arena de acrílico opaco de 39 x 60 x 50cm, que los animales recorrieron libremente durante seis minutos. Se analizó la distancia total recorrida, como índice de la actividad locomotora y exploratoria¹²⁷, y los ingresos al centro de la arena. Menor tiempo en la zona central se considera mayor ansiedad experimental, dado que el centro de la arena se considera una zona más adversa que la periferia¹²⁸.

Prueba de acicalamiento

Esta prueba, utilizada para evaluar comportamientos repetitivos¹²⁹, consiste en colocar de forma individual a los animales en cajas (15 x 27 x 13 cm) sin viruta. Esto se hace para eliminar el comportamiento de escarbar, ya que es un comportamiento competitivo del acicalamiento¹⁷. Cada sesión dura veinte minutos, siendo los diez primeros de habituación, y los siguientes diez de prueba. Durante la prueba, se contabiliza de forma manual el tiempo acumulado durante el

cual el animal se acicala. En modelos de TEA, mayor tiempo de auto-acicalamiento se interpreta como un aumento de comportamiento restringido y repetitivo¹³⁰.

Prueba de interacción recíproca

En este test, utilizado para evaluar los comportamientos sociales, los animales se colocan con un ratón C57BL/6 desconocido de igual edad y sexo en una caja (15 x 27 x 13 cm) sin viruta, durante diez minutos, que es el tiempo donde ocurren la mayor parte de las interacciones sociales¹⁷. Este test es grabado, y el video es utilizado para cuantificar manualmente los siguientes comportamientos sociales: olfateos anogenitales, olfateos oronasales, olfateos laterales; y comportamientos individuales: auto-acicalamiento y exploración vertical sin apoyo^{131,132}.

Enterramiento de bolitas

Los comportamientos repetitivos o de tipo compulsivo pueden medirse utilizando el test de enterramiento de bolitas¹³³. En este test, los animales son colocados durante treinta minutos en una caja (15 x 27 x 20 cm) con un piso de 5cm de cáscara de arroz, sobre la cual se colocan doce bolitas de vidrio opaco, distribuidas uniformemente. Al final del tiempo, se cuenta la cantidad de bolitas enterradas. Serán contadas como enterradas aquellas bolitas que se encuentren al menos 50% cubiertas por la cáscara de arroz. Una cantidad aumentada de bolitas enterradas respecto a los animales control, indica la presencia de comportamientos de tipo obsesivo compulsivos¹³³.

Laberinto elevado en cruz

Este modelo es utilizado para medir los niveles de ansiedad de los ratones^{134,135}. El aparato, que se encuentra elevado 50 cm del piso, consta de cuatro brazos (29 x 7 cm), dos de ellos con paredes de 16 cm de altura (brazos cerrados), y dos sin paredes (brazos abiertos), conectados por un centro de 8 x 8 cm. En esta prueba, el ratón es colocado en el centro del laberinto, orientado hacia un brazo abierto, y se le permite explorar libremente durante cinco minutos. Se cuantifica el tiempo en cada sección del laberinto, y se calcula el porcentaje de tiempo total en que el animal se encuentra en los brazos abiertos. A partir de estos resultados, se interpreta que un animal que permanece un porcentaje de tiempo más alto en los brazos abiertos presenta menos ansiedad experimental¹³⁵.

Reconocimiento de objetos novedosos

Esta prueba se llevó a cabo con el fin de evaluar posibles efectos secundarios del tratamiento con eCBDA sobre funciones cognitivas. En particular, se utilizó para evaluar memoria de largo plazo. Esta prueba se lleva a cabo en tres fases: habituación, familiarización, y prueba¹³⁶. Durante el primer día, en la fase de habituación, los animales son colocados en una arena opaca vacía (25 x 25 x 35 cm), que exploran libremente durante cinco minutos. Veinticuatro horas después, durante la fase de familiarización, se colocan en extremos opuestos de la arena dos objetos idénticos, y se permite que el ratón explore durante diez minutos. Finalmente, 24 horas después de la familiarización, se realiza la fase de prueba, durante la cual uno de los dos objetos es sustituido por un objeto novedoso para el ratón, colocado de forma contrabalanceada^{136,137}. Se cuantifica el número de interacciones del animal con los objetos durante los dos primeros minutos de la fase de prueba, o hasta que el animal interactúe con los objetos un total de veinte veces. En esta prueba, si se observa mayor cantidad de interacciones con el objeto novedoso que con el conocido, se considera que el animal generó memoria de largo plazo.

Procesamiento Histológico

Preparación del tejido

Al día siguiente de la última prueba realizada, los animales fueron anestesiados con ketamina (180 mg/kg) y xilacina (20 mg/kg), y se llevó a cabo la perfusión transcardíaca con una solución de paraformaldehído (PFA) 4% en solución buffer fosfato 0.1M. El cerebro se removió y sumergió para su post-fijación en una solución de paraformaldehído al 4% durante tres horas, seguido de un lavado con solución buffer fosfato (PBS) y luego se criopreservó en una solución de sacarosa al 30% en buffer fosfato 0.1M a 4°C durante al menos 48 horas. Los cerebros fueron congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su procesamiento. Finalmente, fueron cortados en su totalidad en un crióstato Leica CM1850 UV en secciones seriadas coronales de un grosor de 30µm, en dirección rostro-caudal, y se guardaron *free floating* (cortes en flotación) en solución crioprotectora (300g/L de sacarosa y 10g/L de polivinilpirridona en 500mL/L de buffer fosfato 0.1M y 300mL/L de etilenglicol) a -20°C, en series de ocho tubos por cerebro.

Inmunohistoquímica

Se cuantificó el número de células microgliales mediante la tinción de las mismas con inmunohistoquímica de cortes en flotación utilizando Iba1 como marcador, de acuerdo al protocolo adaptado de Ito *et al*, 1998⁵⁹. Luego de tres lavados con solución amortiguadora para eliminar la solución crioprotectora, las secciones se incubaron con una solución de 70% metanol, 30% PBS y 2% peróxido de hidrógeno para inactivar las peroxidasas endógenas. A continuación, se lavaron con PBS-Tritón 1%, y posteriormente, para evitar la unión inespecífica del anticuerpo, las secciones se incubaron con buffer de bloqueo (PBS-Tritón 1% + FBS -suero fetal bovino- 10%). Luego, se incubaron con el anticuerpo primario (anti Iba1, conejo, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) diluido 1:1000 en buffer de bloqueo durante toda la noche a temperatura ambiente, con agitación. En el siguiente paso, las secciones se lavaron con PBS-Tritón 1%, e incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa (HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody Bio-Rad) diluido 1:200 en buffer de bloqueo por 1.5 horas a temperatura ambiente con agitación. Luego de lavar, el marcaje fue revelado durante tres minutos con tetrahidrocloruro de 3-3' diaminobenzidina (DAB Sigma Aldrich) 0,05mg/mL diluido en PBS y H₂O₂ 0.01%. Finalmente, las secciones se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos para la posterior cuantificación. Todos los grupos experimentales fueron analizados juntos, simultáneamente, y en todos los ensayos se incluyó un control negativo (no se agregó anticuerpo primario, todos los demás pasos son idénticos).

Análisis de Iba1

Se obtuvieron imágenes de microscopía óptica con un microscopio OLYMPUS CX41, con una cámara Nikon, de dos áreas del cerebro: la corteza, en particular motora y somatosensorial, por sus funciones en el procesamiento sensorial, y el cuerpo estriado, que tiene funciones de control motor, y podría estar relacionado con la presencia de movimientos repetitivos y estereotipados¹³⁸ (**Figura 9**). Para cada animal se obtuvieron imágenes de tres secciones conteniendo las áreas de interés, y en cada sección se obtuvieron dos imágenes por hemisferio para cada área. Las células positivas para Iba1 fueron contabilizadas, y a continuación se promedió el número obtenido en cada hemisferio, se sumaron los hemisferios entre sí, y se promediaron las tres secciones de un mismo animal, para finalmente tener un promedio de cada individuo.

La cuantificación fue llevada a cabo mediante el software de acceso libre *FIJI*¹³⁹, utilizando un macro que determina la región de interés (ROI), así como el umbral y el análisis de partículas.

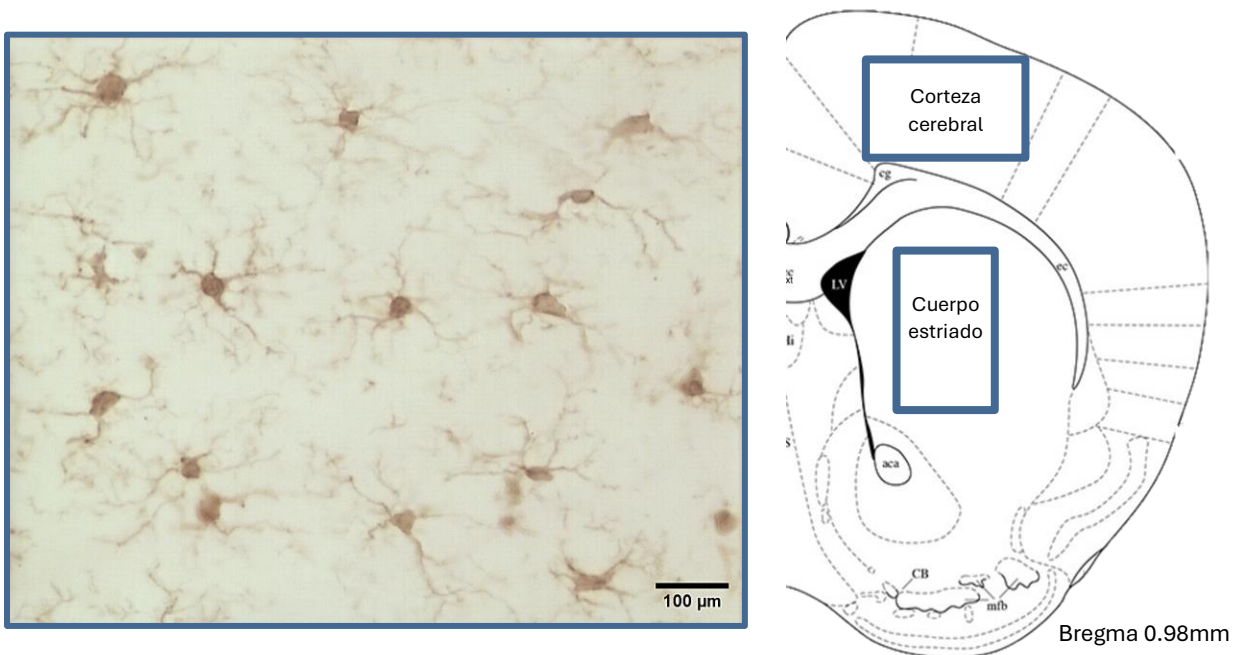


Figura 9 - Áreas del cerebro donde se cuantificó la microglía. Puede observarse una microfotografía representativa de microglía, marcada con Iba1 y revelada con DAB, y una representación esquemática de las ROI utilizadas para su cuantificación, en corteza cerebral y cuerpo estriado, basado en el atlas estereotáxico de coordenadas de Paxinos & Watson (Paxinos & Franklin, 2001). Barra de escala: 100 µm. Magnificación: 40X.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando herramientas del software *GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows*¹⁴⁰. Las pruebas comportamentales de animales *naïve*, donde se comparan dos grupos (en el modelo Shank3B son WT vs KO, en VPA son salino vs VPA), se utilizó el test *t* de student con dos colas, siempre que la distribución de datos fuese normal. Cuando no lo era, se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tanto para las pruebas comportamentales de los tratamientos como para el análisis inmunohistoquímico, donde se comparan más de dos grupos de animales, los análisis se realizaron mediante el test ANOVA de una vía, y el test Tukey-Kramer como test post hoc de variables múltiples.

Los resultados de machos y hembras son únicamente mostrados por separado cuando tienen diferencias significativas entre sí. En todos los casos, los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) y el nivel de significancia escogido para las comparaciones estadísticas es $p < 0,05$.

El análisis de las variaciones de peso de los distintos grupos, con respecto al tratamiento administrado fueron realizados con ANOVA de dos vías, con corrección Geisser-Greenhouse, y el test Tukey-Kramer como test post hoc de variables múltiples, de forma tal de tratar el tiempo como una variable continua, pudiendo así comparar la tasa de cambio de los pesos de los distintos grupos.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN COMPORTAMENTAL DE LOS MODELOS MURINOS DE AUTISMO

Con el fin de caracterizar el fenotipo de tipo autista en el modelo genético Shank3B y en el ambiental por inyección intraperitoneal de ácido valproico (VPA) a los 12.5 días de gestación, se llevó a cabo una amplia batería de pruebas comportamentales tanto en machos como en hembras de ambos modelos. Las pruebas elegidas para resaltar comportamientos de tipo autista o identificar su ausencia fueron: prueba de campo abierto (distancia total recorrida y tiempo en el centro de la arena), tiempo total de auto-acicalamiento, prueba de interacción recíproca y en el caso del modelo ambiental también se llevó a cabo la prueba de enterramiento de bolitas.

Modelo genético: Shank3B

Los ratones Shank3B KO, de trasfondo genético C57BL/6, se obtuvieron a partir de cruces de machos Shank3B KO con hembras heterocigotas para esta mutación (*Shank3B*^{+/-}). Como ya se especificó, la caracterización comportamental de los animales del modelo genético se llevó a cabo en dos cohortes: ratones jóvenes (machos y hembras WT y KO de 4 a 6 semanas de edad, $n=5$ en todos los grupos) y ratones adultos (entre 7 y 10 semanas de edad, machos WT $n=4$, KO $n=11$; hembras WT $n=8$, KO $n=5$). En la prueba de interacción recíproca, los animales no presentaron diferencias entre sexos, por lo que se los analizó juntos.

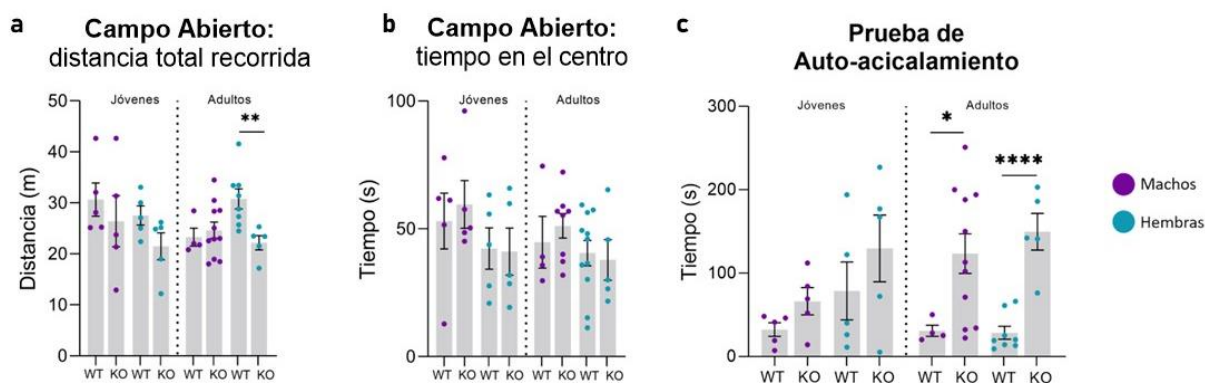


Figura 10 - Caracterización de fenotipos comportamentales del modelo genético de TEA Shank3B machos y hembras en cohorte jóvenes (entre 4 y 6 semanas de edad) y cohorte adultos (entre 7 y 10 semanas de edad). a) Distancia total recorrida en la prueba de campo abierto, b) tiempo en el centro de la arena durante la prueba de campo abierto, c) tiempo total de acicalamiento en un total de 10 minutos. Media $\pm$ SEM, t-student (a excepción de adultos machos en c, que no tiene distribución normal, analizado con Mann-Whitney). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$.

En primer lugar, se llevó a cabo la prueba de campo abierto (**Figura 10a y b**), en la que se encontró que los animales KO de la cohorte jóvenes no presentaron diferencias en la distancia total recorrida respecto a los WT ($p=0.1422$), ni diferencias en el tiempo en la zona central de la arena ($p=0.7852$). Sin embargo, si bien los machos KO de la cohorte adultos tampoco presentaron diferencias en la actividad locomotora total respecto a los animales WT ($p=0.6494$), las hembras adultas KO mostraron disminución en la distancia total recorrida ($p=0.0091$). Ninguno de los dos sexos de la cohorte adultos KO presentó diferencias en el tiempo que permanecieron en la zona central de la arena en comparación con los animales sin la mutación ($p=0.1370$).

En la evaluación de comportamientos repetitivos, mediante la prueba de acicalamiento individual (**Figura 10c**), no se observaron diferencias en la cantidad de tiempo que realizaron este comportamiento los animales KO de la cohorte jóvenes en comparación con los animales WT de la misma edad ($p= 0.2799$). Sin embargo, en el análisis de la cohorte adultos, se observó un aumento en el tiempo de auto-acicalamiento en ambos sexos, pero especialmente en hembras (machos $p= 0.0264$; hembras $p< 0.0001$). Es destacable que una consecuencia de este comportamiento son peladillas en la zona de la nuca de los animales KO de este modelo (**Figura 11**), mencionadas en literatura previa del modelo¹⁸.

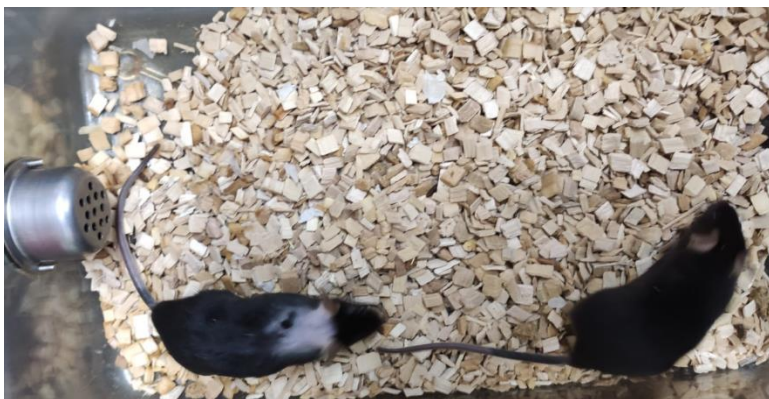


Figura 11 - - Los ratones Shank3B KO se auto-acicalan hasta generarse peladillas en la zona de la nuca. A la izquierda puede observarse un ratón Shank3B KO, con falta de pelo en la zona de la nuca por exceso de acicalamiento. A la derecha puede observarse un ratón Shank3B WT.

Finalmente se llevó a cabo la prueba de interacción recíproca, en la que los animales se enfrentaron en una arena neutra a animales desconocidos de igual sexo y edad y se analizaron los parámetros previamente descritos.

Los animales de la cohorte jóvenes (**Figura 12a**) presentaron una disminución en los comportamientos relacionados con la interacción con el extraño (olfateos anogenitales $p= 0.0034$; olfateos oronasales $p= 0.0009$; olfateos laterales $p= 0.0002$), pero ninguna diferencia en los comportamientos individuales (auto-acicalamiento $p= 0.3267$; exploración vertical $p= 0.1360$). Por otra parte, en los animales de la cohorte adultos (**Figura 12b**) se encontró una disminución de los comportamientos de interacción social (olfateos anogenitales $p= 0.0002$; olfateos oronasales $p< 0.0001$; olfateos laterales $p< 0.0001$). Además, en animales de esta edad se observó un aumento significativo del comportamiento de auto-acicalamiento ($p= 0.0001$), y de las posturas de exploración vertical de los animales KO respecto a los WT ($p< 0.0001$).

Por tanto, mediante esta caracterización fue posible confirmar el fenotipo de tipo autista previamente reportado en la bibliografía, y su presencia tanto en machos como en hembras. Los animales del modelo de entre cuatro y seis semanas de edad presentaron déficits en los comportamientos de interacción social. Además, animales de ambos sexos de entre siete y diez semanas de edad presentaron exceso de auto-acicalamiento en la prueba individual, así como déficits en sus comportamientos sociales, y aumento de auto-acicalamiento y de exploraciones verticales en un contexto social.

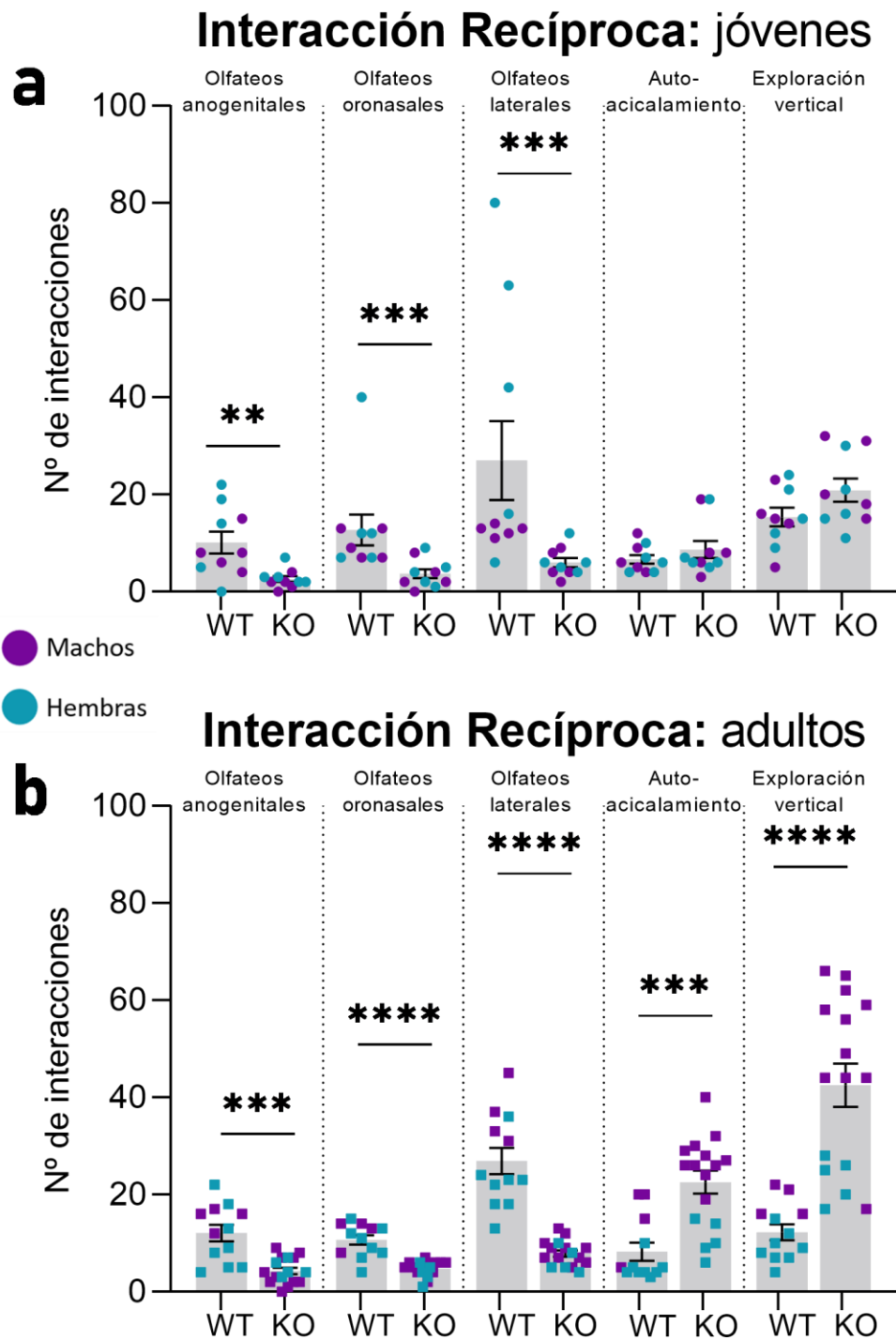


Figura 12 - Caracterización de comportamientos de interacción recíproca en el modelo genético de TEA Shank3B machos y hembras. Se cuantificaron tres comportamientos de interacción social (olfateos anogenitales, oronasales y laterales) y dos comportamientos individuales durante una prueba de 10 minutos, en una arena neutra con un ratón WT del mismo sexo y edad. **a)** cohorte jóvenes (entre 4 y 6 semanas de edad) y **b)** cohorte adultos (entre 7 y 10 semanas de edad). Media $\pm$ SEM, Mann-Whitney, (auto-acicalamiento tiene distribución normal en ambas cohortes, se analizó con t-student) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Modelo ambiental: VPA

La caracterización comportamental del modelo ambiental se llevó a cabo con ratones C57BL/6 de cinco semanas de edad, expuestos a ácido valproico durante el día 12.5 de desarrollo fetal. Los ratones de este modelo presentaron fenotipos mencionados en la bibliografía¹⁴¹, como ser malformaciones en la cola (**Figura 13**), o demoras en la apertura ocular respecto a animales sin tratamiento, o expuestos únicamente a solución salina (datos no mostrados). En algunos animales VPA también se observaron otros rasgos fenotípicos, como ser hidrocefalia o maloclusión. Los animales con hidrocefalia o maloclusión que no les permitía alimentarse fueron eutanasiados de acuerdo con los protocolos establecidos. Además, en varias ocasiones se dio la reabsorción fetal completa o abortos espontáneos luego de la administración de VPA, situaciones previamente reportadas en la literatura del modelo¹⁴¹. Las pruebas comportamentales fueron llevadas a cabo con un total de 57 animales VPA (26 hembras y 31 machos) y ocho animales tratados con solución salina en el día 12.5 de su gestación como controles (cuatro hembras y cuatro machos).



Figura 13 - Los animales del modelo VPA pueden nacer con malformaciones en la cola.

En la prueba de campo abierto (**Figura 14a y b**) se observó que los ratones del modelo ambiental no presentaron alteraciones en su actividad de locomoción y exploración con respecto a los animales control ($p=0.1003$), ni en el tiempo de permanencia en el centro de la arena ($p=0.4477$). Tampoco se encontraron diferencias en el tiempo de auto-acicalamiento (**Figura 14c**) de los animales tratados con VPA respecto a los animales control ($p=0.7734$), ni en el número de bolitas enterradas en la prueba de enterramiento de bolitas ($p=0.8263$) (**Figura 14d**).

De forma interesante, en la prueba de interacción recíproca las hembras de este modelo (**Figura 15b**) presentaron déficits en todos los comportamientos relacionados con la interacción social (olfateos anogenitales $p=0.0002$; olfateos oronales $p<0.0001$; olfateos laterales $p<0.0001$), pero no en los comportamientos individuales (auto-acicalamiento $p=0.9528$; exploración vertical $p=0.2495$). Por otra parte, en machos (**Figura 15a**) se observaron déficits en olfateos oronales ($p<0.0001$) y olfateos laterales ($p<0.0001$), pero no en olfateos anogenitales ($p=0.7155$), ni auto-acicalamiento ($p=0.4843$), y un aumento significativo en el comportamiento de exploración vertical ($p=0.0376$).

En resumen, encontramos que los animales de este modelo no presentan déficits en la actividad locomotora ni exceso de auto-acicalamiento. Además, tanto machos como hembras presentan una disminución significativa de los comportamientos sociales en la prueba de interacción social.

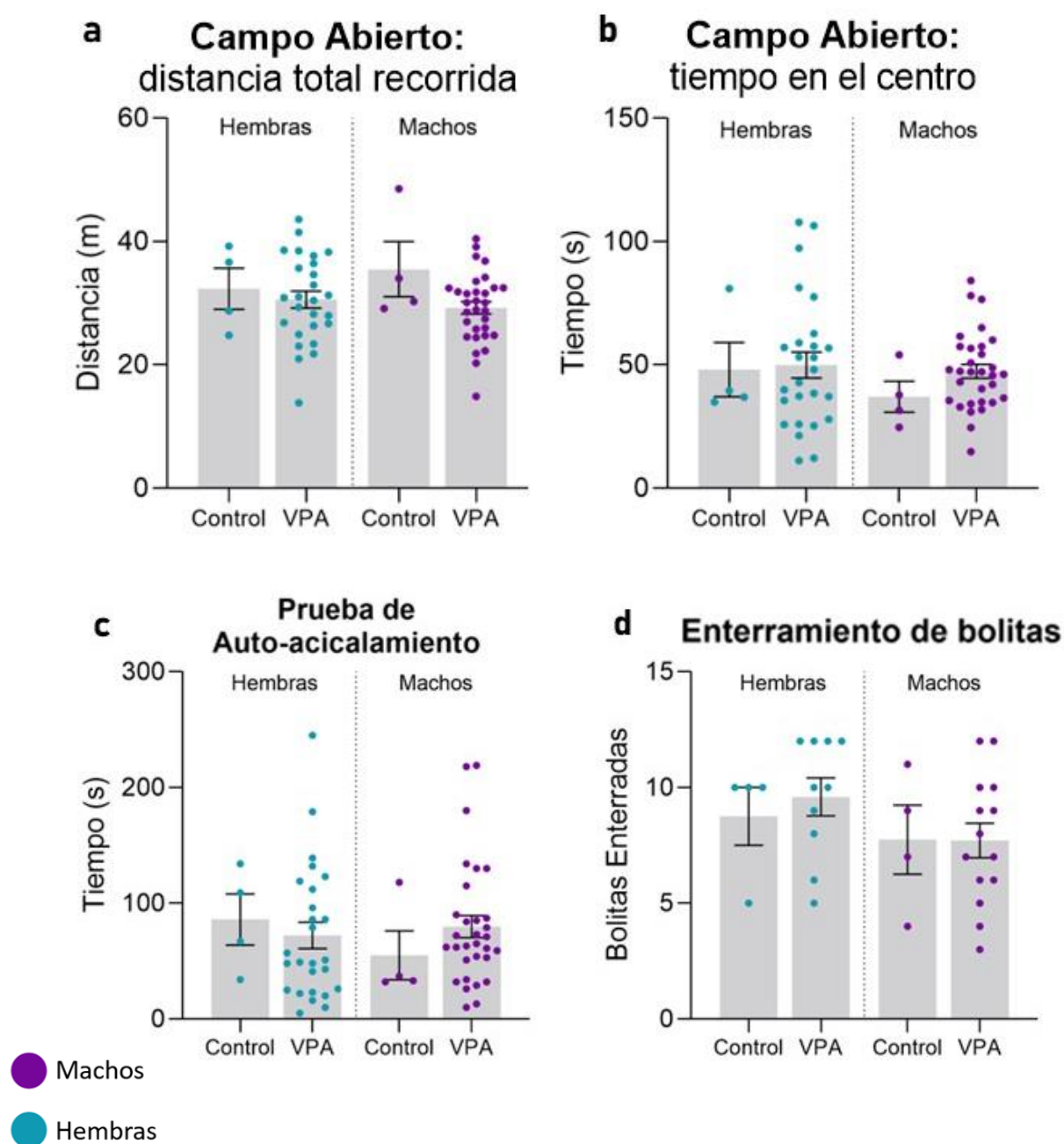


Figura 14 - Caracterización de fenotipos comportamentales del modelo ambiental de TEA VPA machos y hembras de 5 semanas de edad. *a)* Distancia total recorrida en la prueba de campo abierto, *b)* tiempo en el centro de la arena durante la prueba de campo abierto, *c)* tiempo total de acicalamiento en un total de 10 minutos, *d)* total de bolitas enterradas durante una prueba de 30 minutos con 12 bolitas. Media $\pm$ SEM, t-student.

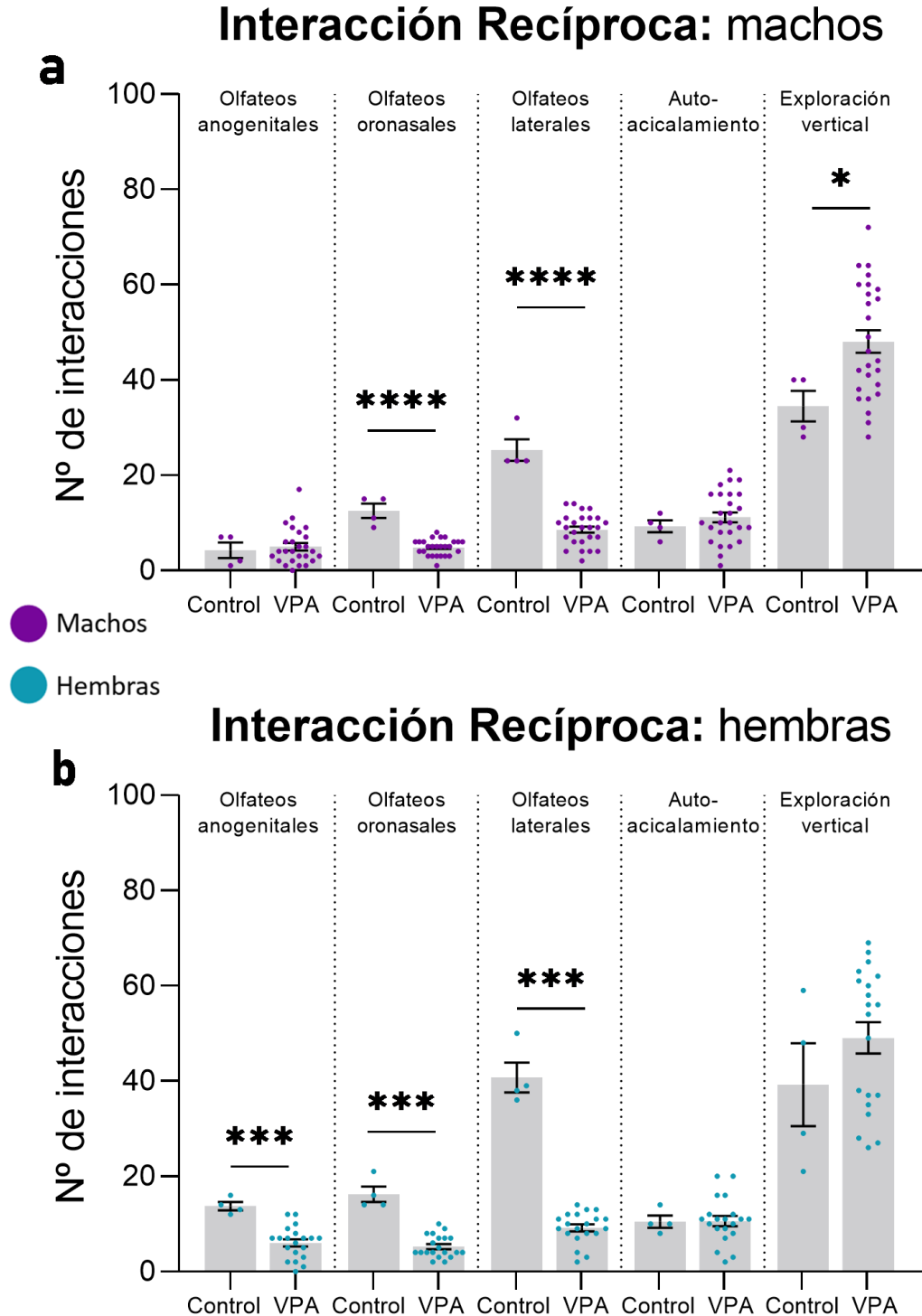


Figura 15 - Caracterización de comportamientos de interacción recíproca en el modelo ambiental de TEA VPA a) machos y b) hembras. Se cuantificaron tres comportamientos de interacción social (olfateos anogenitales, oronasaes y laterales) y dos comportamientos individuales durante una prueba de 10 minutos, en una arena neutra con un ratón WT del mismo sexo y edad. Media $\pm$ SEM, t-student, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$

TRATAMIENTOS CON EXTRACTOS DE CANNABIS

Prueba de dosis

De forma tal de elegir la dosis de tratamiento a utilizar en los experimentos, se administró una dosis aguda de forma intraperitoneal a animales machos y hembras C57BL/6. Treinta minutos después de la inyección se llevó a cabo una prueba de campo abierto, donde se evaluó la actividad locomotora y exploratoria (distancia total recorrida), el tiempo en la zona central, y el tiempo total que los animales permanecen inmóviles en la arena. Las dosis probadas fueron: 0.1, 1, 10 y 50mg/kg de eCBDA (RB009) o eTHCA (RA005), diluidos en vehículo.

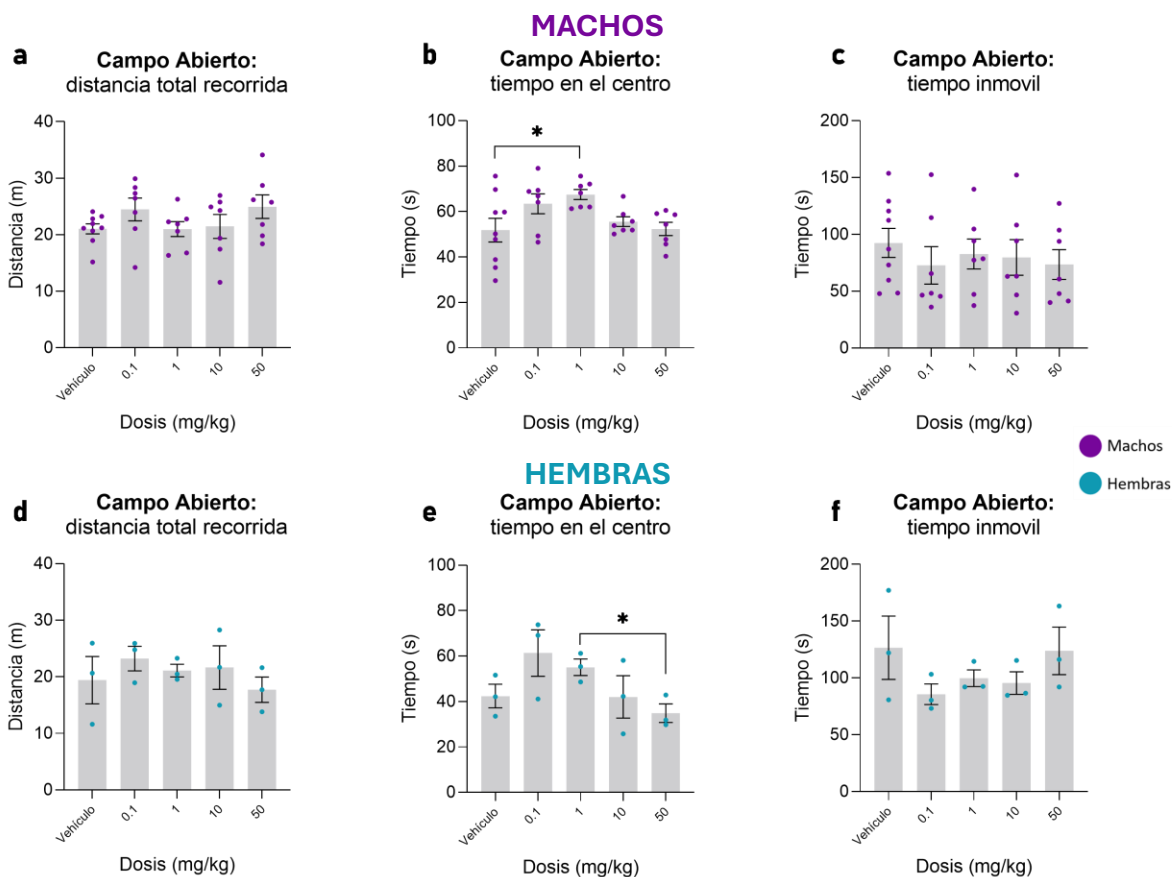


Figura 16 - Prueba de distintas dosis de eCBDA en ratones C57BL/6. Se administró el extracto por vía intraperitoneal, de forma aguda, en cuatro dosis distintas (0.1, 1, 10 o 50mg/kg), o vehículo. Luego de media hora, se realizó una prueba de campo abierto, y se analizó, en machos y hembras, la distancia total recorrida (**a y d**), el tiempo total de permanencia en el centro (**b y e**), y el tiempo total de inmovilidad (**c y f**). Media $\pm$ SEM, t-student, * $p < 0.05$.

En ninguno de los dos sexos se observaron diferencias en la actividad locomotora luego del tratamiento agudo con eCBDA, ni en el tiempo que permanecen inmóviles en el campo abierto. En hembras se observó mayor tiempo en el centro con la dosis 1mg/kg respecto a la dosis 50mg/kg (**Figura 16b**), mientras que en machos este efecto se observó en la dosis de 1mg/kg respecto al vehículo (**Figura 16e**). Por otra parte, eTHCA no tuvo efecto en ninguno de los dos sexos en la locomoción ni en la ansiedad a excepción de la dosis más alta (50mg/kg), que disminuyó muy significativamente la actividad locomotora, aumentando también el tiempo que permanecen inmóviles (**Figura 17**).

En resumen, estos resultados sugieren un efecto ansiolítico en animales C57BL/6 tras la administración de una dosis de 1 mg/kg de eCBDA, y un efecto en la actividad locomotora con eTHCA sólo en la dosis más alta, 50mg/kg. Dado que el tratamiento utilizado para los experimentos es crónico, y la caracterización fenotípica de ninguno de los dos modelos reveló alteraciones en la medida evaluada (tiempo en el centro de la arena), se eligió trabajar con una dosis de 10 mg/kg para todos los experimentos y todos los extractos. En todas las pruebas realizadas, el tratamiento se asignó al azar para cada animal.

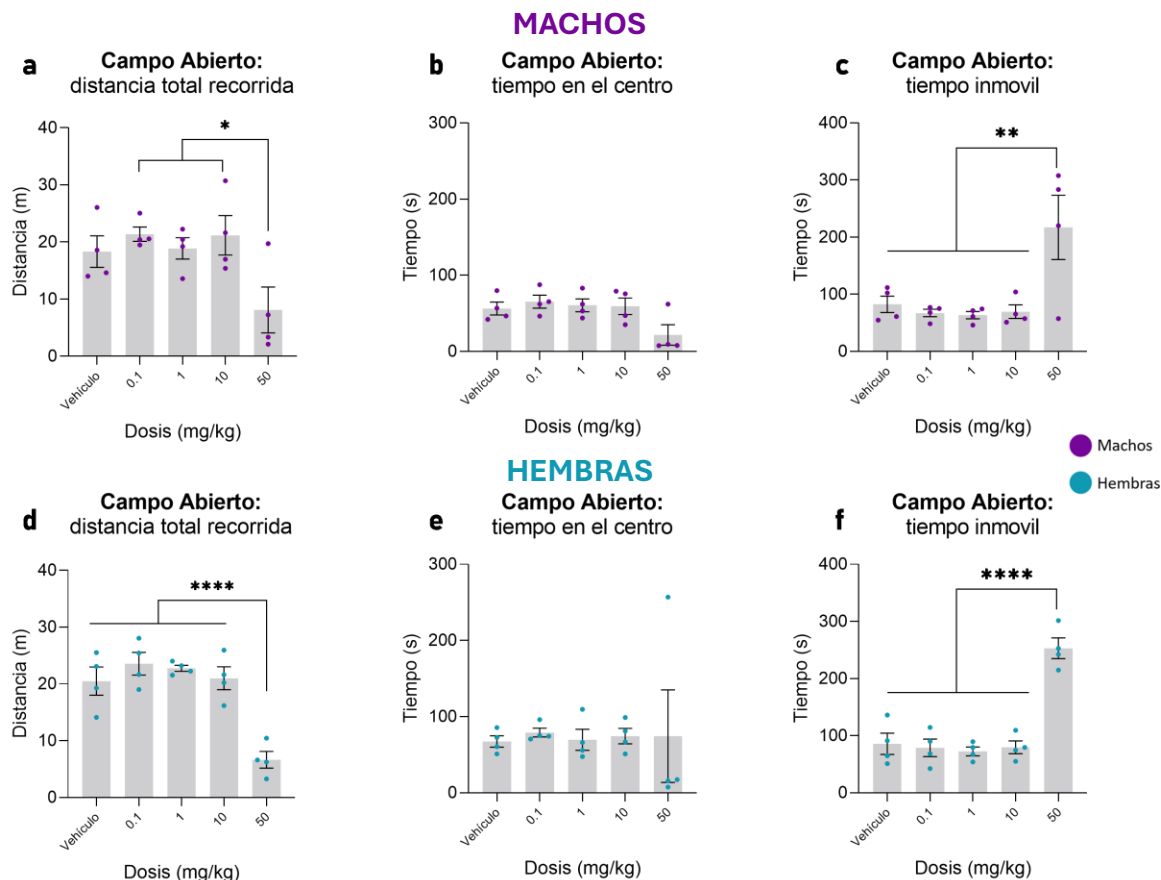


Figura 17 - Prueba de distintas dosis de eTHCA en ratones C57BL/6. Se administró el extracto por vía intraperitoneal, de forma aguda, en cuatro dosis distintas (0.1, 1, 10 o 50mg/kg), o vehículo. Luego de media hora, se realizó una prueba de campo abierto, y se analizó, en machos y hembras, la distancia total recorrida (**a y d**), el tiempo total de permanencia en el centro (**b y e**), y el tiempo total de inmovilidad (**c y f**). Media $\pm$ SEM, t-student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Modelo genético: Shank3B

Para la administración de tratamiento se utilizaron los animales de este modelo de la cohorte jóvenes (4-6 semanas de edad al inicio del experimento). A su vez, los ratones de la cohorte jóvenes, de entre cinco y siete semanas de edad, se dividieron en dos cohortes, en la primera (cohorte eTHCA) se les administró vehículo (machos WT veh $n = 4$, hembras WT veh $n = 2$, machos KO veh $n = 1$, hembras KO veh $n = 4$) o eTHCA 10mg/kg (machos WT eTHCA $n = 5$, hembras WT eTHCA $n = 3$, machos KO eTHCA $n = 2$, hembras KO eTHCA $n = 4$), mientras que en la segunda cohorte (cohorte eCBDA) los grupos experimentales fueron vehículo (machos WT veh $n = 6$, hembras WT veh $n = 6$, machos KO veh $n = 6$, hembras KO veh $n = 6$) o eCBDA 10mg/kg (machos WT eCBDA $n = 6$, hembras WT eCBDA $n = 6$, machos KO eCBDA $n = 7$, hembras KO

eCBDA $n=6$). El tratamiento fue administrado durante dos semanas, en un régimen de cinco días de inyección intraperitoneal, dos días de descanso, tras las cuales se volvieron a realizar las pruebas comportamentales. Se continuó administrando el vehículo o extracto a lo largo de la semana de las pruebas comportamentales. A partir de la semana anterior al comienzo del tratamiento, y al menos tres veces por semana durante el tratamiento y las pruebas comportamentales, se pesaron los animales, de forma tal de llevar un registro del posible efecto de los tratamientos en el peso, así como administrar siempre la dosis adecuada.

Tasa de cambio de peso

Los pesos se comenzaron a tomar desde días previos al comienzo del tratamiento, el cual se consideró como día 0, y se marcó en las gráficas con una línea negra. Con una línea roja se señaló el comienzo de las pruebas comportamentales. Los pesos de los animales fueron normalizados, tomando como 100% el peso en el día de su primera pesada. En el caso de los animales *Shank3B* tratados con eTHCA, machos y hembras fueron analizados juntos, dado el bajo n de los grupos.

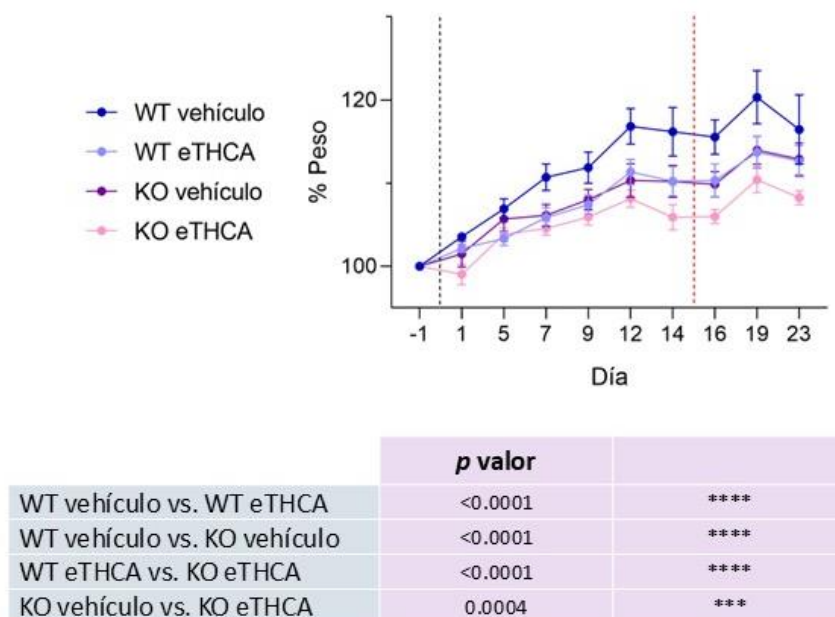


Figura 18 - Seguimiento de peso durante el tratamiento con eTHCA o vehículo de ratones WT y KO del modelo genético *Shank3B*. Los pesos de los animales están expresados como promedio, siendo 100% su peso el día del primer pesaje. Se establece como día 0 el primer día de inyección (línea punteada negra). La línea roja representa el primer día de prueba de comportamiento. Pueden observarse los animales, divididos por grupos: WT vehículo, WT eTHCA, KO vehículo, KO eTHCA. Debajo, puede observarse una tabla con los resultados de la prueba estadística ANOVA de dos vías, con corrección de Geisser-Greenhouse, y test posthoc de Tukey-Kramer, identificando los grupos donde se observa una variación en la tasa de cambio de los pesos de los animales. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

Durante el tratamiento con eTHCA, los ratones WT tratados con vehículo presentan un aumento de peso significativamente mayor que los animales WT tratados con eTHCA, y que los animales KO tratados con vehículo. Además, los ratones KO tratados con eTHCA también presentan una diferencia significativa con los animales WT del mismo tratamiento, así como con los animales KO tratados con vehículo (**Figura 18a**).

Por otra parte, los animales macho WT del modelo Shank3B tratados con eCBDA presentaron una tasa de aumento de peso significativamente menor que el resto de los grupos, especialmente en comparación con los animales KO del mismo tratamiento (**Figura 19a**). Lo mismo no se observa en hembras, donde los animales KO tratados con vehículo tienen una tasa de aumento de peso significativamente mayor que los WT tratados con vehículo. Si bien la diferencia en la tasa de aumento de peso de hembras KO vehículo no es significativamente mayor que el de las hembras KO tratadas con eCBDA, existe una tendencia (**Figura 19b**).

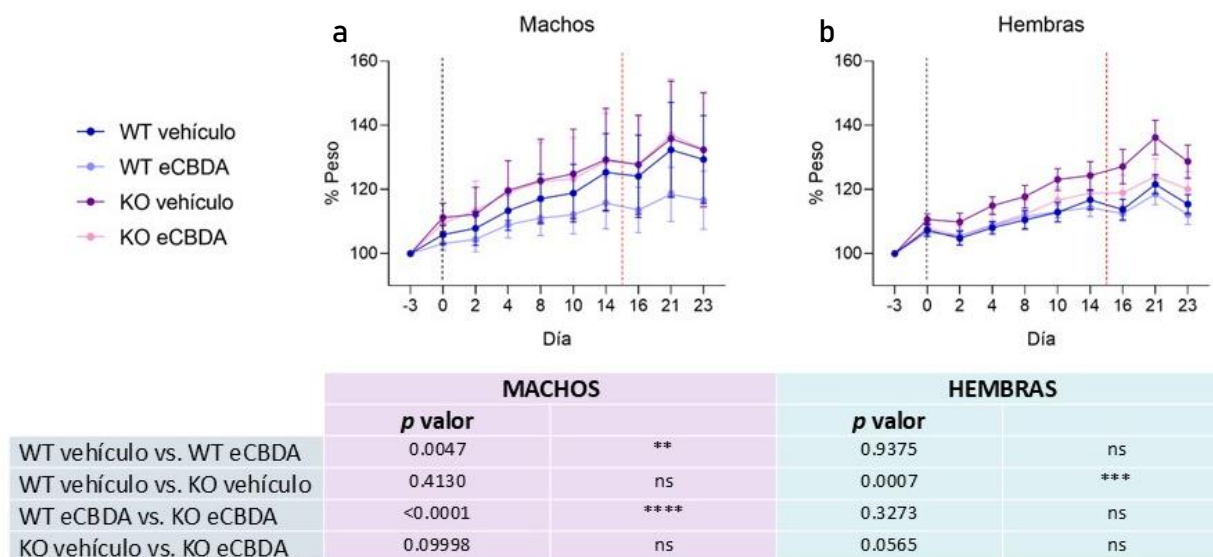


Figura 19 - Seguimiento de peso durante el tratamiento con eCBDA de ratones del WT y KO del modelo genético Shank3B. Los pesos de los animales están expresados como promedio, siendo 100% su peso el día del primer pesaje. Se establece como día 0 el primer día de inyección (línea punteada negra). La línea roja representa el primer día de prueba de comportamiento, y el último peso corresponde al día de su eutanasia. Pueden observarse machos (**a**) y hembras (**b**), divididos por grupos: WT vehículo, WT eCBDA, KO vehículo, KO eCBDA. Debajo, puede observarse una tabla con los resultados de la prueba estadística ANOVA de dos vías, con corrección de Geisser-Greenhouse, y test posthoc de Tukey-Kramer, identificando los grupos donde se observa una variación en la tasa de cambio de los pesos de los animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Comportamiento

Para analizar el comportamiento de los animales del modelo genético luego del tratamiento crónico con eTHCA o eCBDA se llevaron a cabo las mismas pruebas que en la caracterización fenotípica, en el mismo orden. En la cohorte eTHCA se analizaron también la prueba de enterramiento de bolitas y el laberinto elevado en cruz, de forma tal de develar posibles comportamientos compulsivos y repetitivos o de ansiedad. Los animales utilizados para estas pruebas tenían entre siete y diez semanas de edad, por lo que son comparables con los ratones de la cohorte adultos sin tratamiento. La cohorte eTHCA se compuso por un n muy pequeño de animales, por lo que ambos sexos fueron analizados en forma conjunta. Por otra parte, en la cohorte eCBDA los datos se analizaron de forma dependiente del sexo.

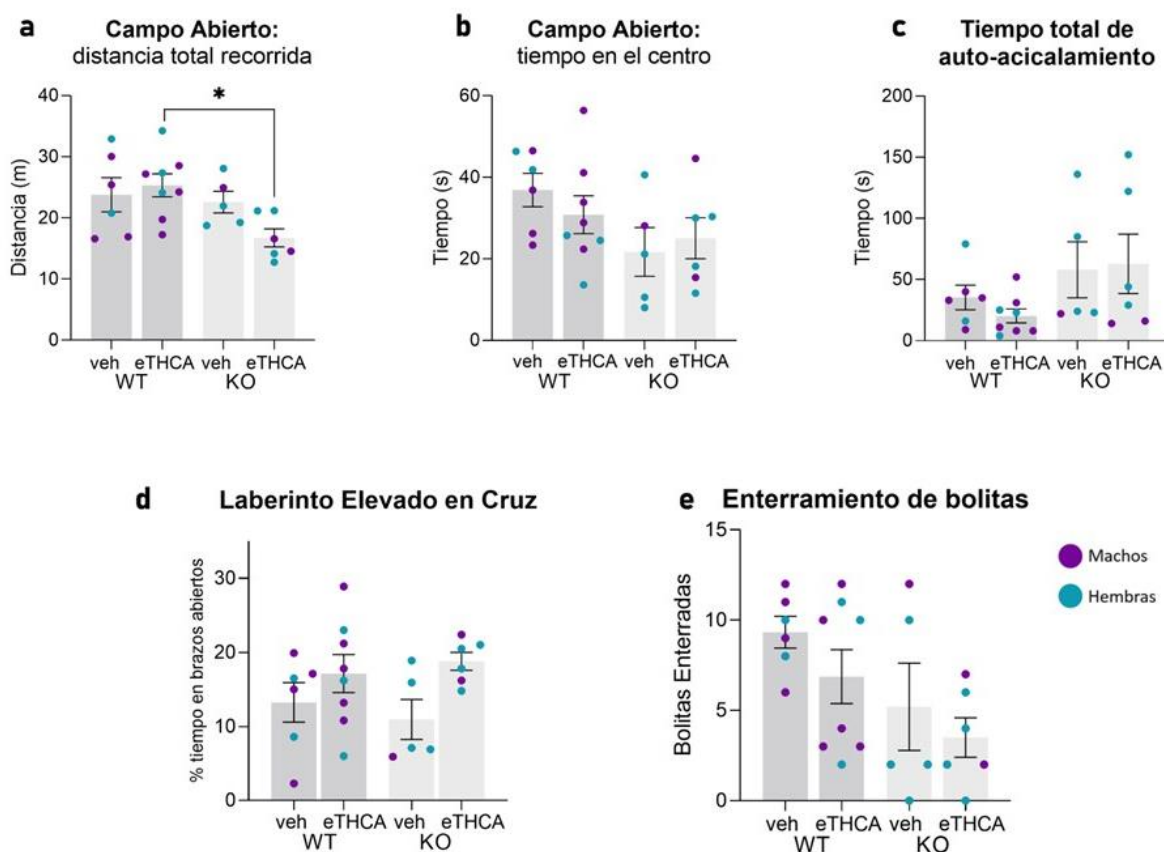


Figura 20 - Pruebas comportamentales de animales machos y hembras WT y KO del modelo *Shank3B* luego de la administración crónica de eTHCA o vehículo. a) distancia total recorrida en la prueba de campo abierto, b) tiempo en el centro de la arena durante la prueba de campo abierto, c) tiempo total de acicalamiento en un total de 10 minutos, d) porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz, e) número total de bolitas enterradas durante una prueba de 30 minutos con 12 bolitas. Media $\pm$ SEM, ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples Tukey, * $p < 0.05$.

El tratamiento crónico con eTHCA provocó una disminución en la actividad motora y exploratoria en el campo abierto de animales KO en comparación con los WT ($p = 0.0261$), pero no se observaron diferencias con los grupos tratados con vehículo (WT veh vs WT eTHCA $p = 0.9429$, WT veh vs KO veh $p = 0.9806$, KO veh vs KO eTHCA $p = 0.2667$) (**Figura 20a**). Tampoco se encontraron diferencias en el tiempo en el centro del campo abierto en ninguno de los grupos (WT veh vs WT eTHCA $p = 0.7977$, WT veh vs KO veh $p = 0.2060$, WT eTHCA vs KO eTHCA $p =$

0.8201, KO veh vs KO eTHCA $p=0.9694$) (**Figura 20b**), así como el tiempo de auto-acicalamiento (WT veh vs WT eTHCA $p=0.8934$, WT veh vs KO veh $p=0.7803$, WT eTHCA vs KO eTHCA $p=0.2217$, KO veh vs KO eTHCA $p=0.9970$) (**Figura 20c**), el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz (WT veh vs WT eTHCA $p=0.6388$, WT veh vs KO veh $p=0.9232$, WT eTHCA vs KO eTHCA $p=0.9577$, KO veh vs KO eTHCA $p=0.1749$) (**Figura 20d**), ni el número de bolitas enterradas (WT veh vs WT eTHCA $p=0.6316$, WT veh vs KO veh $p=0.2991$, WT eTHCA vs KO eTHCA $p=0.3728$, KO veh vs KO eTHCA $p=0.8789$) (**Figura 20e**).

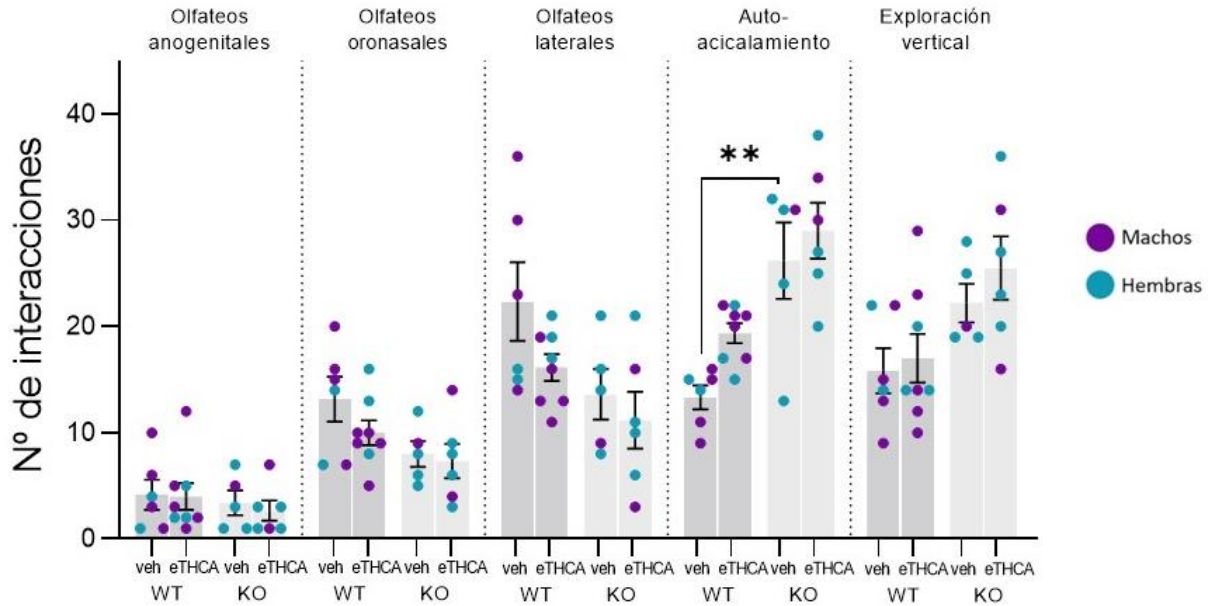


Figura 21 - Prueba de interacción recíproca de animales machos y hembras WT y KO del modelo Shank3B luego de la administración crónica de eTHCA o vehículo Cuantificación de tres comportamientos de interacción social (olfateos anogenitales, oronasales y laterales) y dos comportamientos individuales durante una prueba de 10 minutos, en una arena neutra con un ratón wild-type del mismo sexo y edad. Media $\pm$ SEM, ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples Tukey, * $p \leq 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En el análisis de la interacción recíproca de la cohorte eTHCA (**Figura 21**) no se observaron diferencias entre grupos en el número de olfateos anogenitales (WT veh vs WT eTHCA $p=0.9996$, WT veh vs KO veh $p=0.9763$, WT eTHCA vs KO eTHCA $p=0.8549$, KO veh vs KO eTHCA $p=0.9792$), oronasales (WT veh vs WT eTHCA $p=0.4542$, WT veh vs KO veh $p=0.1600$, WT eTHCA vs KO eTHCA $p=0.5945$, KO veh vs KO eTHCA $p=0.9919$), ni laterales (WT veh vs WT eTHCA $p=0.2856$, WT veh vs KO veh $p=0.1295$, WT eTHCA vs KO eTHCA $p=0.4749$, KO veh vs KO eTHCA $p=0.9173$), ni en las exploraciones verticales sin apoyo (WT veh vs WT eTHCA $p=0.9837$, WT veh vs KO veh $p=0.3260$, WT eTHCA vs KO eTHCA $p=0.0711$, KO veh vs KO eTHCA $p=0.8022$). De forma destacable, los comportamientos de auto-acicalamiento presentaron un aumento en los animales KO tratados con vehículo respecto a los WT del mismo tratamiento ($p=0.0024$). Por otra parte, el tratamiento crónico con eCBDA no generó cambios en ninguno de los comportamientos evaluados en la prueba de campo abierto (distancia total recorrida — machos: WT veh vs WT eCBDA $p=0.8564$, WT veh vs KO veh $p=0.9913$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p=0.9811$, KO veh vs KO eCBDA $p=0.9989$, hembras: WT veh vs WT eCBDA $p=0.5978$, WT veh vs KO veh $p=0.9583$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p=0.5457$, KO veh vs KO eCBDA $p=0.9756$; tiempo en el centro de la arena — machos: WT veh vs WT eCBDA $p=0.8177$, WT veh vs KO veh $p=0.7362$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p=0.9969$, KO veh vs KO eCBDA $p>$

0.9999, hembras: WT veh vs WT eCBDA $p=0.9995$, WT veh vs KO veh $p=0.5477$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p=0.9564$, KO veh vs KO eCBDA $p=0.7794$), en ninguno de los grupos (**Figura 22a y b**). El análisis del tiempo de auto-acicalamiento, realizado en una arena individual tras diez minutos de habituación a la misma, no reveló diferencias entre los grupos de machos (WT veh vs WT eCBDA $p=0.9961$, WT veh vs KO veh $p=0.6485$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p=0.6403$, KO veh vs KO eCBDA $p=0.9972$) (**Figura 22c**), pero sí en las hembras. En particular, se observó un aumento significativo del tiempo de auto-acicalamiento de las hembras Shank3B KO tratadas con vehículo, en comparación con las hembras Shank3B WT tanto luego del mismo tratamiento como del tratamiento con eCBDA. Las hembras KO tratadas con eCBDA no presentaron diferencias significativas en el tiempo de acicalamiento con ninguno de los otros tres grupos (WT veh vs WT eCBDA $p>0.9999$, WT veh vs KO veh $p=0.0407$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p=0.4868$, KO veh vs KO eCBDA $p=0.4616$) (**Figura 22d**).

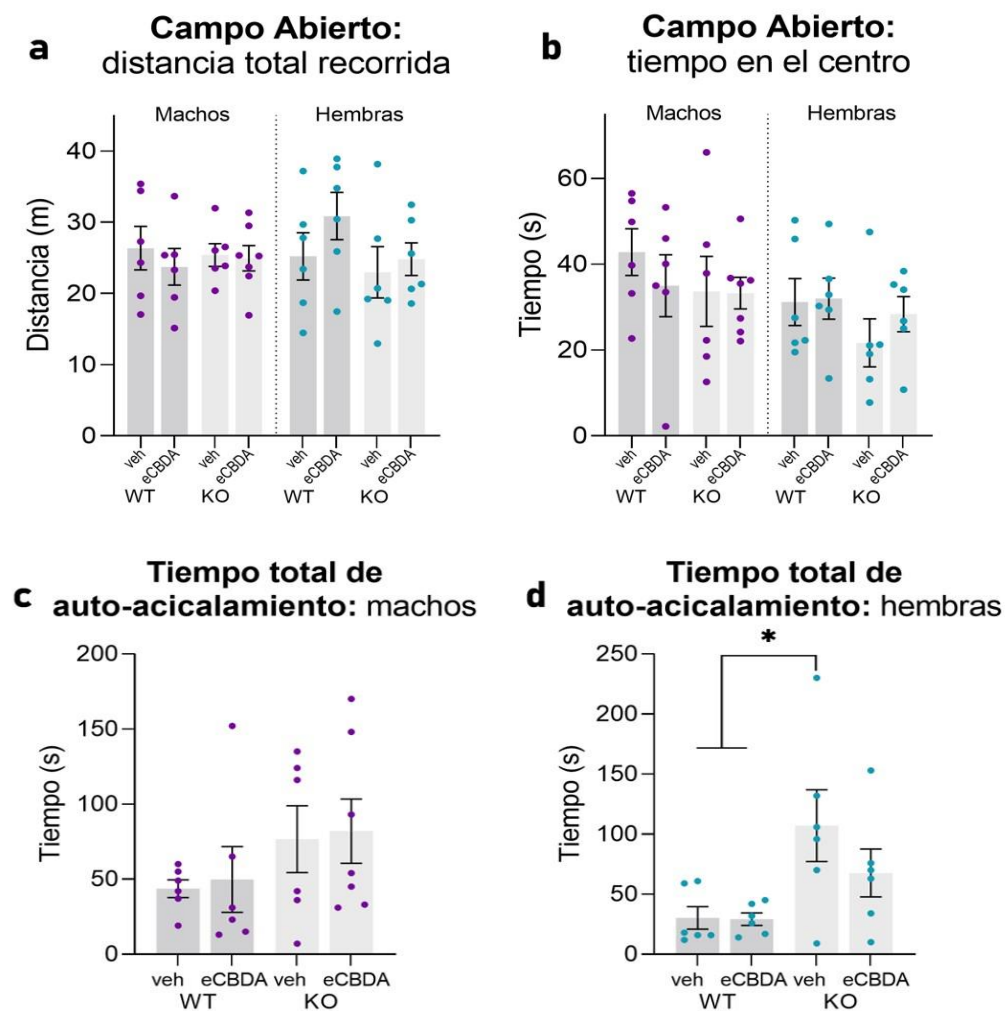


Figura 22 - Pruebas comportamentales de animales machos y hembras WT y KO del modelo Shank3B luego de la administración crónica de eCBDA o vehículo. **a)** distancia total recorrida en la prueba de campo abierto, **b)** tiempo en el centro de la arena durante la prueba de campo abierto, **c y d)** tiempo total de acicalamiento en un total de 10 minutos de machos y hembras, respectivamente. Media $\pm$ SEM, ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples Tukey, * $p<0.05$.

Finalmente, en la prueba de interacción recíproca de animales tratados con eCBDA no se observaron diferencias entre los comportamientos de interacción social (olfateos anogenitales, oronasales o laterales) en hembras de ninguno de los grupos (olfateos anogenitales: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.7539$, WT veh vs KO veh $p= 0.9961$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p> 0.9999$, KO veh vs KO eCBDA $p= 0.8653$; olfateos oronasales: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.3840$, WT veh vs KO veh $p= 0.9832$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p= 0.2230$, KO veh vs KO eCBDA $p= 0.8014$; olfateos laterales: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.7874$, WT veh vs KO veh $p= 0.9520$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p= 0.2064$, KO veh vs KO eCBDA $p= 0.9359$) (**Figura 23b**).

En machos (**Figura 23a**) solo se observó una diferencia en los olfateos anogenitales, donde el número es significativamente menor en animales KO tratados con vehículo que en los WT del mismo tratamiento (olfateos anogenitales: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.7975$, WT veh vs KO veh $p= 0.0169$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p= 0.5559$, KO veh vs KO eCBDA $p= 0.6705$; olfateos oronasales: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.9538$, WT veh vs KO veh $p= 0.9296$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p= 0.7081$, KO veh vs KO eCBDA $p= 0.7592$; olfateos laterales: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.5042$, WT veh vs KO veh $p= 0.3101$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p= 0.9986$, KO veh vs KO eCBDA $p= 0.9959$). Tampoco se observaron diferencias en los comportamientos de exploración vertical en ninguno de los grupos o sexos (machos: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.9041$, WT veh vs KO veh $p> 0.9999$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p= 0.9968$, KO veh vs KO eCBDA $p= 0.9421$; hembras: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.1772$, WT veh vs KO veh $p= 0.3508$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p= 0.9786$, KO veh vs KO eCBDA $p> 0.9999$).

Sin embargo, de manera destacable, tanto machos como hembras KO tratados con vehículo vieron elevado el número de comportamientos de auto-acicalamiento realizados en presencia de un extraño del mismo sexo y edad respecto a los animales WT del mismo tratamiento o tratados con eCBDA, pero el tratamiento con eCBDA fue capaz de revertir este aumento únicamente en hembras (machos: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.9751$, WT veh vs KO veh $p= 0.0060$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p= 0.3779$, KO veh vs KO eCBDA $p= 0.2945$; hembras: WT veh vs WT eCBDA $p= 0.9599$, WT veh vs KO veh $p= 0.0014$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p= 0.3383$, KO veh vs KO eCBDA $p= 0.0215$).

En resumen, en el modelo genético puede observarse que eTHCA no tiene efectos de reversión comportamental, mientras que eCBDA es capaz de revertir el exceso de auto-acicalamiento en la prueba de interacción recíproca en hembras.

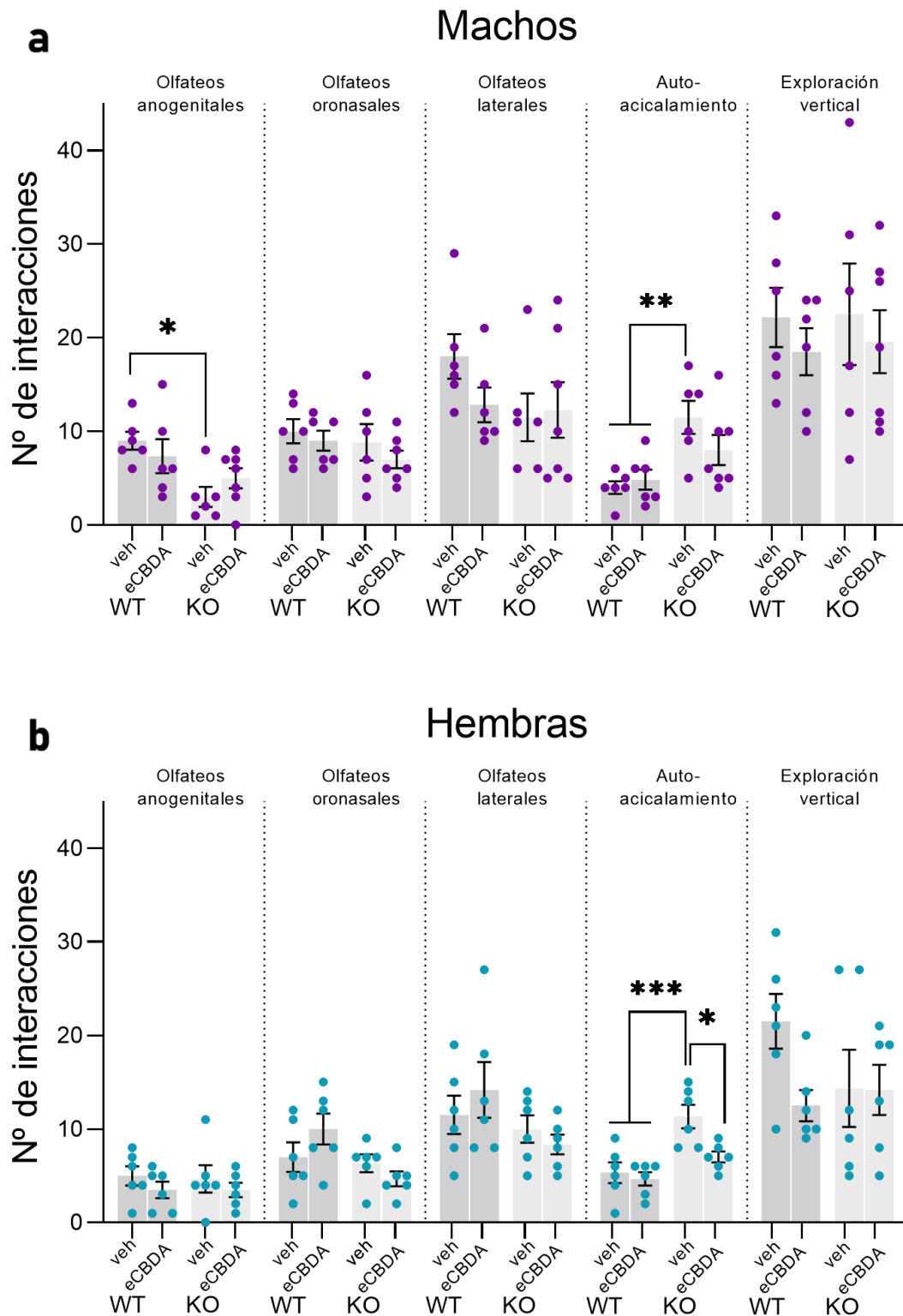


Figura 23 - Prueba de interacción recíproca de animales WT y KO del modelo Shank3B luego de la administración crónica de eCBDA o vehículo. Cuantificación de tres comportamientos de interacción social (olfateos anogenitales, oronasaes y laterales) y dos comportamientos individuales durante una prueba de 10 minutos, en una arena neutra con un ratón WT del mismo sexo y edad, de animales machos (a) y hembras (b). Media ± SEM, ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples Tukey, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Modelo Ambiental: VPA

A todos los ratones utilizados para la caracterización fenotípica de este modelo se les administró tratamiento del mismo modo que a los animales del modelo genético, durante las semanas seis y siete de edad, y en la octava semana se realizaron las pruebas de comportamiento.

Dados los resultados observados a partir de la administración eTHCA en el modelo genético, se decidió no administrar este tratamiento en el modelo ambiental. En su lugar, se utilizó CBDA puro, con el objetivo de dilucidar si el efecto que esperábamos ver con eCBDA correspondía al cannabinoide principal, o al efecto del extracto dado por la presencia de cannabinoides menores u otros componentes, como ser por ejemplo terpenos¹⁴².

Los grupos experimentales del modelo ácido valproico fueron entonces: animales tratados con solución salina o VPA durante su desarrollo prenatal, a los que se les administró vehículo (control macho $n=2$, control hembra $n=2$, VPA macho $n=12$, VPA hembra $n=12$), CBDAp (control macho $n=2$, control hembra $n=2$, VPA macho $n=6$, VPA hembra $n=6$), o eCBDA (VPA macho $n=12$, VPA hembra $n=8$). Al igual que en el modelo genético, se llevó un registro de peso de los animales desde la semana anterior al inicio del tratamiento, hasta el día de su sacrificio.

Tasa de cambio de peso

Al igual que en el modelo genético, se comenzaron a realizar registros de peso en los días previos al primer día de tratamiento, identificado como día 0 en las gráficas. Los pesos de los animales fueron normalizados, tomando como 100% el peso en el día de su primera pesada.

En las tasas de aumento de peso de los animales VPA (**Figura 24**) puede observarse que machos y hembras presentaron diferencias similares entre grupos. En ninguno de los dos sexos existe una diferencia entre los grupos controles, es decir, aquellos animales a los que se les administró solución salina durante su gestación, y tratados con vehículo o CBDAp. Además, puede observarse una diferencia significativa en las diferencias entre las tasas de aumento de peso entre animales control tratados con vehículo y animales VPA tratados con vehículo. Además, en ambos sexos se observa una diferencia significativa en la tasa de aumento de peso de animales VPA tratados con CBDAp en comparación con aquellos tratados con eCBDA, y esta diferencia es mayor en hembras. Finalmente, las hembras del modelo VPA tratadas con vehículo tienen una tasa de aumento de peso significativamente distinta a las de las hembras VPA tratadas con ambos extractos, pero esta diferencia es opuesta para cada uno de ellos. Tienen un aumento de peso mayor que las tratadas con eCBDA, pero menor que las tratadas con CBDAp. En machos, no se observan diferencias entre los animales VPA tratados con vehículo y ninguno de los dos tratamientos.

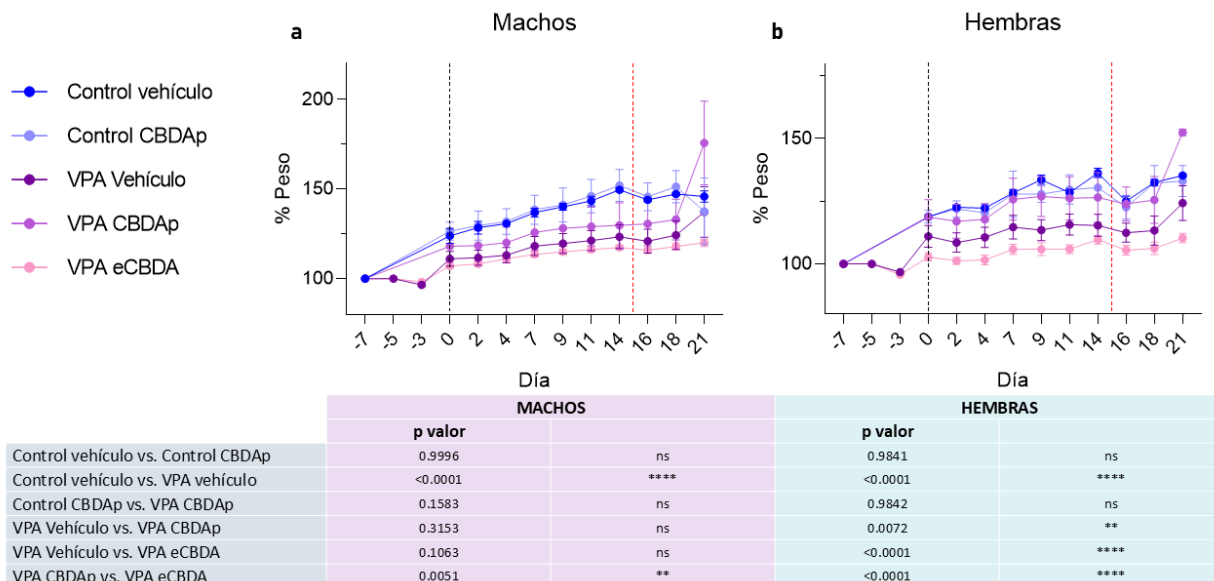


Figura 24 - Seguimiento de peso durante el tratamiento con eCBDA o CBDap de ratones del modelo ambiental VPA y sus controles. Los pesos de los animales están expresados como promedio, siendo 100% su peso el día del primer pesaje. Se establece como día 0 el primer día de inyección (línea punteada negra). La línea roja representa el primer día de prueba de comportamiento, y el último peso corresponde al día de su eutanasia. Pueden observarse machos (a) y hembras (b), divididos por grupos: control vehículo, control CBDap, VPA vehículo, VPA CBDap y VPA eCBDA. Debajo, puede observarse una tabla con los resultados de la prueba estadística ANOVA de dos vías, con corrección de Geisser-Greenhouse, y test posthoc de Tukey-Kramer, identificando los grupos donde se observa una variación en la tasa de cambio de los pesos de los animales. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Comportamiento

Dado el muy bajo n de los grupos control, el análisis de los fenotipos comportamentales se llevó a cabo con los dos sexos de forma conjunta. En el análisis comportamental de los animales tratados con VPA durante su gestación no se encontraron diferencias con los animales control, ni luego de los tratamientos con CBDap ni eCBDA en actividad motora evaluada en el campo abierto (Ctrl veh vs Ctrl CBDap $p = 0.9951$, Ctrl veh vs VPA veh $p > 0.9999$, VPA veh vs VPA CBDap $p = 0.9955$, VPA veh vs VPA eCBDA $p = 0.9999$, VPA CBDap vs VPA eCBDA $p = 0.9881$) (**Figura 25a**), comportamientos de tipo ansioso, evaluados a través del tiempo en el centro del campo abierto (Ctrl veh vs Ctrl CBDap $p = 0.9961$, Ctrl veh vs VPA veh $p = 0.9999$, VPA veh vs VPA CBDap $p = 0.7982$, VPA veh vs VPA eCBDA $p = 0.9484$, VPA CBDap vs VPA eCBDA $p = 0.9895$) (**Figura 25b**) y en el tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz (Ctrl veh vs Ctrl CBDap $p = 0.8612$, Ctrl veh vs VPA veh $p = 0.9903$, VPA veh vs VPA CBDap $p = 0.9988$, VPA veh vs VPA eCBDA $p = 0.6273$, VPA CBDap vs VPA eCBDA $p = 0.8449$) (**Figura 25d**), en comportamientos repetitivos y restringidos, evaluado en la prueba de auto-acicalamiento (Ctrl veh vs Ctrl CBDap $p = 0.9222$, Ctrl veh vs VPA veh $p = 0.6682$, VPA veh vs VPA CBDap $p = 0.7152$, VPA veh vs VPA eCBDA $p = 0.9999$, VPA CBDap vs VPA eCBDA $p = 0.8105$) (**Figura 25c**) y la prueba de enterramiento de bolitas (Ctrl veh vs Ctrl CBDap $p = 0.9860$, Ctrl veh vs VPA veh $p = 0.8448$, VPA veh vs VPA CBDap $p = 0.1842$, VPA veh vs VPA eCBDA $p = 0.6226$, VPA CBDap vs VPA eCBDA $p = 0.9428$) (**Figura 25e**), ni en los procesos cognitivos, evaluados con la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (VPA veh conocido vs novedoso $p = 0.0004$, VPA eCBDA conocido vs novedoso $p = 0.0012$) (**Figura 25f**).

Para el análisis de la prueba de interacción recíproca, dado el muy bajo n de los grupos control, se analizó por separado los controles, tratados con vehículo o CBDAp, y los animales VPA, tratados con vehículo, donde no se diferenció por sexo, y los animales VPA tratados con vehículo, eCBDA o CBDAp, donde machos y hembras se analizaron por separado. En primer lugar, al analizar el comportamiento de los animales de los grupos control se observó que el tratamiento con CBDAp no afecta ninguno de los comportamientos observados, en comparación con el tratamiento con vehículo (olfateos anogenitales $p= 0.6242$, olfateos oronasales $p> 0.9999$, olfateos laterales $p= 0.4720$, auto-acicalamiento $p= 3428$, exploración vertical $p= 9239$) (**Figura 26a**). Sin embargo, al comparar los controles con los animales VPA tratados con vehículo, encontramos que presentan un déficit significativo en los comportamientos de olfateos oronasales ($p< 0.0001$) y laterales ($p< 0.0001$) (olfateos anogenitales $p= 0.6242$, auto-acicalamiento $p= 7928$, exploración vertical $p= 3895$).

Por otra parte, al analizar la prueba de interacción social de animales VPA tratados con vehículo, CBDAp, o eCBDA, se pudo observar que, en los dos comportamientos donde se observó el déficit, los animales VPA machos presentan una recuperación luego del tratamiento tanto con eCBDA (olfateos anogenitales $p= 0.8250$, olfateos oronasales $p= 0.0005$, olfateos laterales $p< 0.0001$, auto-acicalamiento $p= 0.8599$) como CBDAp (olfateos anogenitales $p= 0.9827$, olfateos oronasales $p= 0.0144$, olfateos laterales $p= 0.0019$, auto-acicalamiento $p= 0.4404$). Además, en machos, se observó una disminución en las exploraciones verticales tras los tratamientos con eCBDA ($p= 0.0003$) y CBDAp ($p= 0.0067$) (**Figura 26b**).

En hembras, los déficits encontrados en los animales VPA tratados con vehículo en comparación con los controles, fueron revertidos con el tratamiento con eCBDA (olfateos anogenitales $p= 0.0689$, olfateos oronasales $p< 0.0001$, olfateos laterales $p< 0.0001$, auto-acicalamiento $p= 0.2356$), pero no con el de CBDAp (olfateos anogenitales $p= 0.5033$, olfateos oronasales $p= 0.1370$, olfateos laterales $p= 0.3785$, auto-acicalamiento $p> 0.9999$). Además, en hembras también observamos que ambos tratamientos redujeron el número de exploraciones verticales sin apoyo (VPA veh vs VPA eCBDA $p= 0.0327$, VPA veh vs VPA CBDAp $p= 0.0079$) (**Figura 26c**).

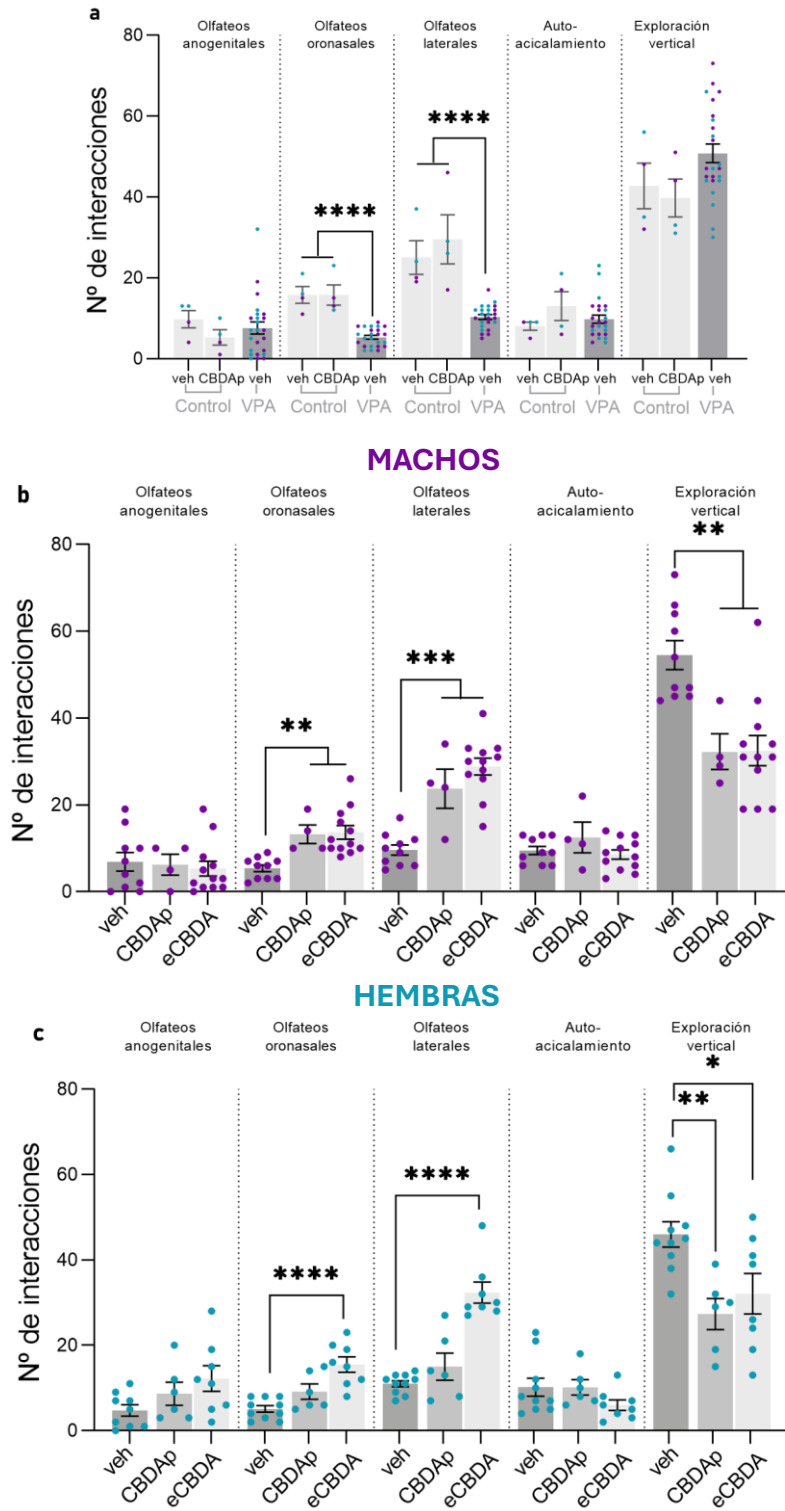


Figura 26 - Prueba de interacción recíproca de animales del modelo VPA y su control, luego de la administración crónica de CBDap, eCBDA o vehículo. Cuantificación de tres comportamientos de interacción social (olfateos anogenitales, oronasales y laterales) y dos comportamientos individuales durante una prueba de 10 minutos, en una arena neutra con un ratón WT del mismo sexo y edad. **a)** comparación de animales control tratados con vehículo o CBDap, y animales VPA tratados con vehículo. **b)** animales machos y **c)** hembras VPA tratados con vehículo, CBDap o eCBDA. Media $\pm$ SEM, ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples Tukey, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS MICROGLIALES

Modelo genético: Shank3B

En primer lugar, se analizó la microglía mediante inmunomarcado de Iba1 en animales macho y hembra Shank3B KO y WT, de entre nueve y doce semanas de edad, tratados con vehículo o eCBDA. Se observó que, en la corteza cerebral, tanto en machos como en hembras, los animales WT tratados con vehículo presentan menor cantidad de células microgliales que los animales KO tratados con vehículo (machos $p = 0.0318$, hembras $p = 0.0421$). Como puede observarse en la **Figura 27a**, la administración crónica de eCBDA fue capaz de revertir este aumento, es decir, el número de microglía contabilizado en la corteza cerebral de animales KO tratados con el extracto, tanto machos como hembras, fue estadísticamente igual al encontrado en animales WT tanto tratados con vehículo como eCBDA (machos: WT veh vs KO eCBDA $p = 0.4968$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p = 0.8073$, KO veh vs KO eCBDA $p = 0.0030$, hembras: WT veh vs KO eCBDA $p = 0.9947$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p > 0.9999$, KO veh vs KO eCBDA $p = 0.0356$). Por otra parte, al observar el cuerpo estriado (**Figura 27b**) se encontró un número similar de células microgliales en todos los grupos analizados (machos: WT veh vs WT eCBDA $p = 0.9633$, WT veh vs KO veh $p = 0.9996$, WT veh vs KO eCBDA $p = 0.9967$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p = 0.9024$, KO veh vs KO eCBDA $p = 0.9996$, hembras: WT veh vs WT eCBDA $p = 0.6466$, WT veh vs KO veh $p > 0.9999$, WT veh vs KO eCBDA $p = 0.7761$, WT eCBDA vs KO eCBDA $p = 0.9846$, KO veh vs KO eCBDA $p = 0.8109$).

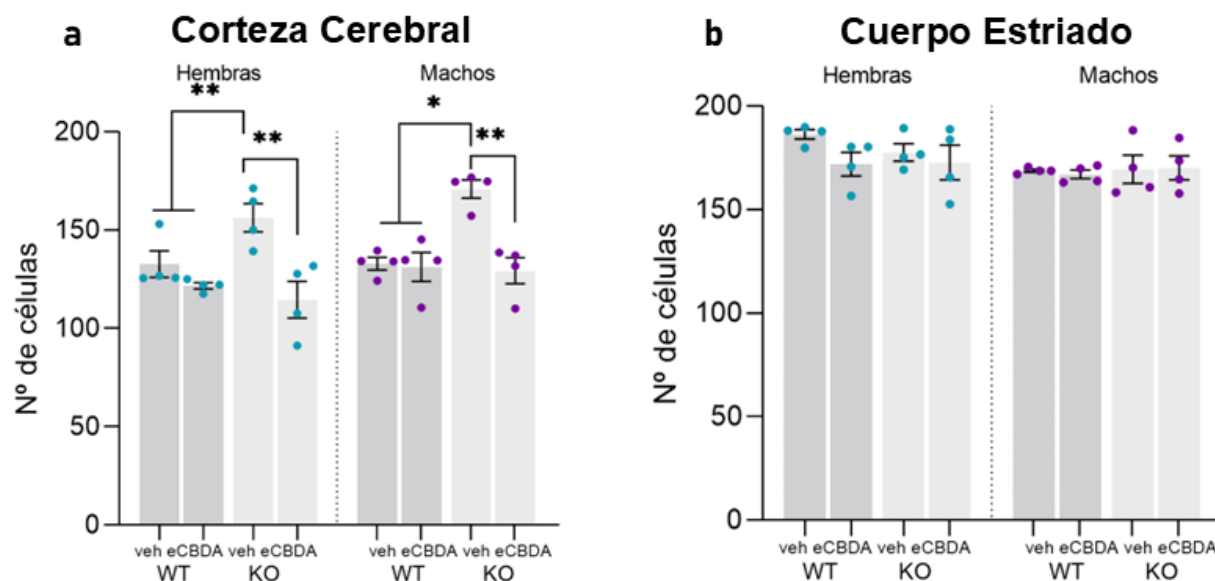


Figura 27 - Cuantificación del número de células positivas para Iba1 en dos áreas del cerebro de animales WT y KO tratados con eCBDA o vehículo de forma crónica, del modelo Shank3B. Número total de células microgliales en **a)** corteza cerebral y **b)** cuerpo estriado de animales de ambos sexos del modelo genético. Media $\pm$ SEM, ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples Tukey, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Modelo ambiental: VPA

Dado el bajo número de animales control para el grupo VPA obtenidos, únicamente se pudo realizar el análisis de animales VPA con tratamiento de vehículo, eCBDA o CBDAp. Dado que los animales VPA eran C57BL/6, el mismo trasfondo genético de los animales Shank3B, se utilizaron los valores obtenidos de animales Shank3B WT tratados con vehículo como grupo control. Este análisis fue llevado a cabo con cuatro animales VPA por grupo, por sexo, de entre ocho y diez semanas de edad. Tanto en machos como en hembras, en el cuerpo estriado no se encontraron diferencias entre grupos (machos: WT veh vs VPA veh $p = 0.3394$, VPA veh vs VPA CBDAp $p = 0.2761$, VPA veh vs VPA eCBDA $p = 0.8856$, hembras: WT veh vs VPA veh $p = 0.4338$, VPA veh vs VPA CBDAp $p = 0.9954$, VPA veh vs VPA eCBDA $p = 0.9829$) (**Figura 28b**). Por otra parte, en la corteza se observó que machos y hembras no respondieron de igual manera a los tratamientos. En los machos VPA tratados con vehículo se encontró el número de células positivas para Iba1 aumentado respecto al control ($p = 0.0107$), y esto no se revirtió con ninguno de los dos tratamientos (VPA veh vs VPA CBDAp $p = 0.6193$, VPA veh vs VPA eCBDA $p > 0.9999$) (**Figura 28a**). Sin embargo, si bien en hembras también se encontró aumentado este valor en animales VPA tratados con vehículo respecto al control ($p < 0.0001$), observamos el tratamiento con eCBDA es capaz de atenuar esto parcialmente, pero no así el tratamiento con CBDAp (VPA veh vs VPA CBDAp $p = 0.6545$, VPA veh vs VPA eCBDA $p = 0.0055$) (**Figura 28a**).

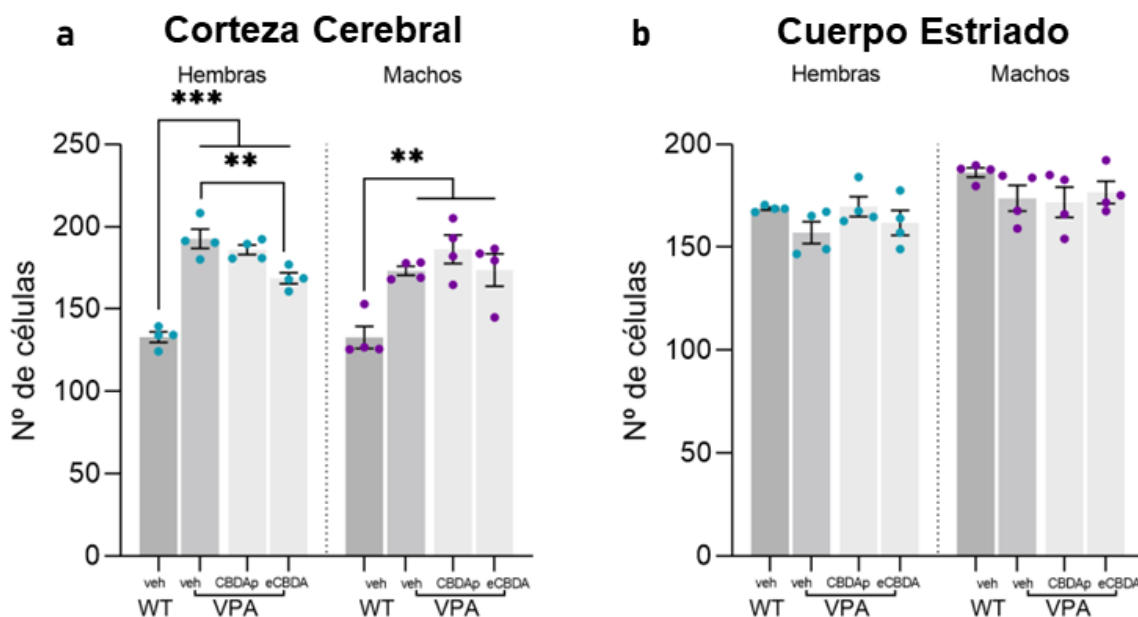


Figura 28 - Cuantificación del número de células microgliales en dos áreas del cerebro de animales del modelo VPA y su control, tratados con CBDAp, eCBDA o vehículo de forma crónica. Número total de células positivas para Iba1 en **a)** corteza cerebral y **b)** cuerpo estriado de animales hembra y macho del modelo ambiental. Media $\pm$ SEM, ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

Los trastornos del espectro autista son desórdenes que se dan únicamente en humanos, y su etiología es variada, y puede llegar a ser multifactorial. Existe una gran heterogeneidad entre personas diagnosticadas con TEA, por lo cual es de vital importancia utilizar modelos murinos con distintas causales, y distinto perfil comportamental. Además, el TEA se manifiesta de forma distinta en hombres y mujeres. Las mujeres y niñas presentan diferencias tanto en comorbilidades psiquiátricas como en la manifestación comportamental, y tienden a utilizar “camuflaje social” y “enmascaramiento” como estrategias compensatorias, que dificultan su diagnóstico^{11,143}. Mujeres y niñas con TEA también manifiestan diferencias en la respuesta a tratamientos farmacológicos respecto a sus contrapartes masculinas¹⁴³. En consecuencia, es de gran importancia analizar de forma diferencial el fenotipo comportamental según el sexo biológico, así como la respuesta a los posibles tratamientos.

Evidencia anecdótica indica que aceites preparados con extractos de cannabis producen mejoras comportamentales y comunicacionales en pacientes con casos severos de TEA. En base a esto, se establecieron modelos preclínicos murinos de TEA para evaluar el efecto de estos extractos. En este estudio, se pusieron a punto dos modelos, uno genético (Shank3B knockout) y uno ambiental (VPA), y se investigaron los efectos de la administración crónica de extractos de dos quimiotipos de cannabis sobre esos modelos en ambos sexos. Los modelos murinos estudiados son apropiados como plataforma para el análisis farmacológico de distintos compuestos en la búsqueda de sustancias que puedan revertir comportamientos de tipo autista; así como para el análisis de blancos celulares donde estos compuestos podrían estar actuando. Dado el rol de la microglía en el establecimiento y mantenimiento de los circuitos neurales durante el desarrollo, en este estudio se evaluó también el número de células microgliales en la corteza cerebral y el cuerpo estriado de animales de estos modelos tras la administración de distintos tratamientos, como posibles blancos celulares de acción de los extractos.

En primer lugar, se caracterizaron los modelos para asegurarse de que presentaran un fenotipo conductual evidente. En ambos modelos se observaron comportamientos acordes a los observados por otros autores en la literatura. Los animales del modelo genético mostraron acicalamiento excesivo y déficits en la interacción social^{17,18}, especialmente en animales adultos, mientras que los del modelo ambiental mostraron déficits comportamentales únicamente en la interacción social¹⁴⁴.

En el modelo genético, el tratamiento con extracto alto en Δ^9 -THCA no revierte los comportamientos en términos de actividad motora y déficits sociales ninguno de los dos sexos. Sin embargo, el tratamiento con extracto alto en CBDA revirtió el exceso de auto-acicalamiento en condiciones sociales en hembras, mientras que en machos se observó una tendencia a revertir este fenotipo.

En el modelo ambiental, tanto el extracto alto en CBDA como el CBDA puro fueron capaces de revertir los déficits en la interacción social en animales machos del modelo, pero en hembras únicamente el extracto alto en CBDA fue capaz de revertir el fenotipo observado. Estos resultados podrían sugerir la existencia de un efecto sinérgico con otros componentes presentes en el extracto, que estarían afectando a los dos sexos de forma diferencial.

Por otra parte, en este estudio se evaluó también el número de células microgliales en la corteza cerebral y el cuerpo estriado de animales de ambos modelos tras la administración de los

distintos tratamientos. En la corteza cerebral se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles en ambos modelos. El tratamiento con extracto alto en CBDA revirtió el aumento observado en el número de microglía en animales de ambos sexos del modelo genético, y se observó una reversión parcial en hembras del modelo ambiental. En el modelo ambiental, el tratamiento con CBDAp no afectó el número de células microgliales en machos ni hembras.

Si bien muchos de los grupos tienen un n pequeño, que debería aumentarse para reforzar estos resultados, estos hallazgos muestran un efecto de CBDA en modelos murinos de TEA dependiente del sexo y un posible rol de la microglía como blanco celular. Además, sugieren un potencial terapéutico de CBDA en el tratamiento del autismo, particularmente en relación con los síntomas comportamentales y los cambios en la microglía de la corteza cerebral. Sin embargo, se requieren más investigaciones para comprender completamente los mecanismos subyacentes y determinar la eficacia y seguridad a largo plazo de estos tratamientos en humanos.

Tabla 5 - Resumen de los resultados obtenidos en la tesis. Los resultados de caracterización son de animales del modelo en comparación con sus respectivos controles. IR: interacción recíproca.

	Shank3B	VPA
Caracterización	4-6 semanas de edad: ♂ ♀ ↓ Olfateos anogenitales, oronasales y laterales en IR	♂ ↓ Olfateos oronasales y laterales en IR ↑ Exploración vertical en IR ♀ ↓ Olfateos anogenitales, oronasales y laterales en IR
	7-10 semanas de edad: ♂ ♀ ↑ Auto-acicalamiento ↓ Olfateos anogenitales, oronasales y laterales en IR ↑ Auto-acicalamiento y exploración vertical en IR	
eTHCA	Comportamiento: ♂ ♀ No revierte comportamientos	Comportamiento: —
	Microglía (corteza cerebral): —	Microglía (corteza cerebral): —
eCBDA	Comportamiento: ♂ Tendencia a revertir auto-acicalamiento en IR ♀ Revierte auto-acicalamiento en IR Microglía (corteza cerebral): ♂ ♀ Revierte número de células	Comportamiento: ♂ ♀ Revierte olfateos oronasales y laterales en IR Microglía (corteza cerebral): ♂ No revierte ♀ Revierte parcialmente
	Comportamiento: —	Comportamiento: ♂ Revierte olfateos oronasales y laterales en IR ♀ No revierte comportamiento
	Microglía (corteza cerebral): —	Microglía (corteza cerebral): ♂ No revierte ♀ No revierte
CBDAp		

Fenotipo comportamental del modelo genético: Shank3B

El modelo murino genético escogido en este estudio fue Shank3B-KO^{17,18}. Se trata de una mutación en el gen *Shank3*, que elimina la expresión de dos de las tres isoformas de la proteína producidas por este locus, y reduce la expresión de la tercera. Las proteínas *SHANK3* tienen funciones de andamiaje postsináptico en neuronas excitatorias. Este modelo se asemeja al perfil genético de cerca del 0.5% de casos diagnosticados de TEA. Este modelo fue analizado en cohortes de dos edades, que denominamos jóvenes y adultos, que corresponden a una edad de adolescencia tardía y una de adultez temprana. Durante la adolescencia, al igual que en el periodo perinatal, existen periodos sensibles, en los cuales se da la maduración de circuitos corticolímbicos, y se ve afectado el balance E/I^{69,145}. Por esta razón, es interesante comparar los déficits comportamentales en estas dos edades, así como comenzar la administración de tratamiento en esta edad tan crítica para la formación y el establecimiento de circuitos.

En el modelo genético, el tratamiento crónico con eTHCA no fue capaz de revertir los fenotipos comportamentales observados (**Tabla 5**). Un estudio realizado en 2021 con ratones macho de un modelo genético de autismo al que se le elimina completamente el gen *Shank3*, encontró que el tratamiento agudo con Δ^9 -THC (1mg/kg) tiende a disminuir el tiempo de auto-acicalamiento y aumentar el tiempo que el ratón permanece en una zona de sociabilización, mediado por CB₁¹⁴⁶. Si bien tanto Δ^9 -THC como Δ^9 -THCA interactúan con CB₁, la forma neutra de este compuesto es un agonista parcial de este receptor, mientras que Δ^9 -THCA tiene efectos no-agonistas en CB₁.⁹⁵ Además, Δ^9 -THCA, a diferencia de su forma neutra, es un compuesto no psicotrópico. Es probable que estas variaciones expliquen las diferencias en los efectos observados.

Por otra parte, en este modelo, el tratamiento con eCBDA revirtió el exceso de auto-acicalamiento en hembras en la prueba de interacción social, donde se evalúa el comportamiento al enfrentarse con un coespecífico desconocido, pero no en la prueba individual. En machos se observó que no hay diferencias entre grupos en la prueba individual de auto-acicalamiento, pero en la prueba de interacción recíproca hay una tendencia a la disminución de este comportamiento (**Tabla 5**). Es posible entonces que el extracto esté influyendo no de forma exclusiva en movimientos repetitivos sino en el cerebro social. El cerebro social es una red neural que procesa de forma conjunta la información contextual externa (sensorial) e interna (emocional y cognitiva), y genera una respuesta a estímulos sociales. Está compuesta por múltiples áreas del cerebro, incluyendo la amígdala, la corteza prefrontal, el hipocampo, la ínsula anterior, y el surco temporal superior, entre otras²¹. Dada la amplia distribución de receptores del sEC en el cerebro, así como de otros receptores donde CBDA es capaz de actuar (por ejemplo, 5-HT_{1A}), sería interesante analizar el efecto de la administración de extracto alto en CBDA en estas áreas y su posible influencia en comportamientos sociales y comportamientos individuales en contexto social.

Fenotipo comportamental del modelo ambiental: Ácido Valproico

En el modelo ambiental elegido para este estudio, la administración de ácido valproico en el día 12.5 de gestación, encontramos que, en las pruebas realizadas, machos y hembras únicamente presentan déficits en la interacción social, y dichos déficits son similares entre sexos. En este modelo se evaluó el efecto del tratamiento crónico con extracto alto en CBDA, así como con CBDA puro. Se encontró que, si bien en machos ambos tratamientos son capaces de revertir los déficits en interacción social, en hembras únicamente el extracto alto en CBDA fue capaz de revertir el fenotipo observado (**Tabla 5**).

Si bien estudios previos realizados en ratas de este modelo describen diferencias comportamentales entre sexos, las mismas se observan en comportamientos no evaluados en esta tesis, como ser comunicación social o performance cognitivo¹⁴⁷. Todos los estudios que analizan el dimorfismo sexual comportamental del modelo establecen que machos y hembras no tienen diferencias significativas en interacción social^{148,149}. Dado que el receptor CB₁ mediaría la modulación por AEA de la recompensa social, un estudio comportamental en ratas de este modelo evalúa la presencia de receptor CB₁ fosforilado (CB₁f), que indicaría un estado de activación, en corteza prefrontal, estriado dorsal, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens y cerebelo, a cinco y doce semanas de edad, en ambos sexos. Los animales macho de este modelo en ambas edades tienen CB₁f aumentado en estriado dorsal y reducido en hipocampo, y, únicamente a las doce semanas de edad, reducido en amígdala. Por otra parte, las hembras únicamente muestran un aumento en CB₁f en la corteza prefrontal a las cinco semanas de edad. Además, encuentran que, en ambos sexos, la inhibición de la degradación de AEA revierte los déficits en comportamientos sociales que observan en el estudio¹⁴⁸.

En otro estudio, realizado con ratas de cinco semanas de edad sin tratamiento, se comparan los niveles de AEA frente a un estímulo social desconocido en comparación con uno conocido, o sin estímulo social. Encuentran que el estímulo social desconocido aumenta los niveles de AEA en el estriado dorsal en comparación con los otros grupos, y existe una tendencia al aumento en la corteza prefrontal frente a cualquiera de los estímulos sociales, en comparación con la ausencia de estímulo. Interesantemente, no encuentran diferencias en hipocampo¹⁵⁰. Otro estudio, llevado a cabo con ratas del modelo VPA de cinco semanas de edad, establece que los niveles basales de 2-AG y AEA no están alterados, pero inmediatamente después de una prueba de interacción social, la concentración de AEA se encuentra aumentada en el hipocampo, pero no se ve alterada en corteza frontal ni cerebelo¹⁵¹. Finalmente, un estudio realizado en humanos, con niños y niñas de aproximadamente siete años de edad, encuentran que los niveles de AEA en plasma son significativamente menores en aquellos diagnosticados con TEA¹⁵². En resumen, es posible especular que disfunciones en el sistema endocannabinoide podrían subyacer parcialmente los déficits en las interacciones sociales, características del autismo. Dado que AEA es un agonista de CB₁, la administración de agonistas exógenos podría compensar su falta o degradación temprana. Si bien no hay muchos estudios sobre la función de CBDA sobre CB₁, estudios in vitro mostraron que se une a CB₁ y produce un agonismo con selectividad funcional por la beta-arrestina¹⁵³, por lo cual podría estar compensando la disminución en los niveles de AEA, presentando así mejoras en los comportamientos sociales de machos y hembras del modelo VPA. Es una posibilidad que el efecto generado no sea el mismo, y la unión de CBDA con los receptores no active la misma vía.

Si bien el tratamiento con eCBDA es capaz de revertir los déficits sociales tanto de machos como hembras del modelo VPA, el tratamiento con CBDAp únicamente es efectivo en machos. Esto podría sugerir que en hembras es necesaria la acción sinérgica de CBDA con otros componentes del extracto, pero en machos la acción de CBDA sería suficiente. El análisis del extracto alto en CBDA, llevado a cabo en Facultad de Química muestra la presencia en cantidades no despreciables de otro fitocannabinoide, el ácido cannabicroménico (CBCA), el cual se administró en una dosis de 1.6mg/kg en el extracto alto en CBDA (**Tabla 3**). Es posible que se necesite la actividad de CBDA junto con CBCA, actuando sobre diferentes blancos farmacológicos, para revertir los déficits sociales en hembras. Si bien aún no se conocen los blancos farmacológicos del CBCA, se sabe que tiene efectos anticonvulsivos en un modelo murino del Síndrome de Dravet¹⁵⁴. Sería de interés entonces, analizar los efectos CBCA puro,

así como de la co-administración de CBDA y CBCA puros en hembras de este modelo, y evaluar la posible reversión fenotípica. Por otra parte, es posible que existan componentes no identificados en el extracto. Si bien los extractos de plantas de cannabis incluyen otras moléculas como terpenos y flavonoides, análisis realizados en Facultad de Química utilizando RMN sugieren que no se encuentran en concentraciones detectables en las condiciones de extracción etanólica en las que se obtuvo el extracto⁶⁶.

Microglía en modelos murinos de TEA

Si bien las bases neurobiológicas que subyacen los TEA no están completamente definidas, cada vez mayor cantidad de evidencia apunta tanto a un rol de las vías inmunitarias innatas, como a anomalías en la sinaptogénesis neural¹⁵⁵. Las células microgliales son un objetivo de estudio interesante en los TEA, ya que no solo conforman la inmunidad innata del SNC, sino también tienen funciones homeostáticas, en particular durante el desarrollo cerebral, cumpliendo funciones de remodelación tales como sinaptogénesis y poda sináptica⁴⁸. La ausencia de microglía durante esta etapa tiene como consecuencia neuronas que forman un exceso de conexiones sinápticas débiles, y una mayor densidad de espinas dendríticas¹⁵⁶. Se ha descrito que alteraciones en la funcionalidad de la microglía durante el desarrollo y etapas tempranas posnatales, tanto aumento en su reactividad como disminución de su respuesta, podría afectar negativamente la maduración del SNC¹⁵⁷, teniendo como consecuencia trastornos tales como esquizofrenia, psicosis, depresión o TEA, entre otros¹⁵⁸.

La poda sináptica durante el desarrollo es esencial para el modelado de los circuitos, y su correcto funcionamiento. En humanos, este proceso se da principalmente en la etapa perinatal, hasta aproximadamente los primeros tres años de edad. La estabilización de ciertos contactos sinápticos, y la pérdida de los otros, en respuesta a la actividad neuronal, es esencial para el desarrollo cognitivo¹⁵⁹. Déficits en la maduración sináptica tienen como consecuencia conectividad funcional débil entre regiones cerebrales, las cuales en autismo están relacionadas con déficits en el comportamiento social y aumento de comportamientos repetitivos¹⁵⁸. Déficits en la función microglial durante el desarrollo son suficientes para reducir las conexiones funcionales¹⁵⁸. Se ha sugerido que, en TEA, se encuentra afectada la integración de información gracias a un exceso y desorganización de conexiones locales dentro del lóbulo frontal, y una reducción de fuerza y número de conexiones de larga distancia entre la corteza frontal y otros sistemas¹⁶⁰. Por otra parte, cambios pequeños en la cantidad relativa de sinapsis inhibitorias y excitatorias podrían alterar significativamente el procesamiento de información^{159,161}.

Muchos estudios, tanto en tejidos humanos post-mortem como en modelos murinos, muestran que alteraciones en el sistema inmune son uno de los factores más importantes en la incidencia de los TEA¹⁶², en particular el número de células microgliales se encuentra aumentado en cerebros de personas con TEA en comparación con controles en distintas áreas de la corteza cerebral¹⁶³. Además, estudios transcriptómicos demostraron que en cerebros de humanos con TEA se encuentran especialmente enriquecidos los genes de microglía pro-inflamatoria¹⁶⁴. Por tanto, la neuroinflamación sería una de las causas de la patogénesis de TEA, caracterizada por la presencia de microglía reactiva en distintas zonas del cerebro, así como aumentos en el número de células microgliales, alteraciones morfológicas y cambios fenotípicos⁵⁵.

Dado que las células microgliales poseen todos los elementos funcionales del sistema de señalización endocannabinoide, incluyendo los componentes de síntesis y degradación de CB₁ y CB₂, así como AEA y AG-2, es interesante su estudio como diana terapéutica de compuestos

cannabinoides para la reducción de la neuroinflamación. En condiciones de neuroinflamación, la microglía aumenta significativamente la síntesis de endocannabinoides, produciendo cerca de veinte veces más que las neuronas u otras células gliales, e incrementa la expresión del receptor CB₂¹⁶² (**Figura 29**). La activación de los receptores CB₂ tiene como consecuencia el aumento de producción de factores neuroprotectores y la reducción de producción y liberación de factores proinflamatorios¹⁶². Es importante destacar que los receptores CB₁ y CB₂ son capaces de formar receptores heterómeros funcionales en el cerebro, y cuando se encuentran en forma heteromérica, los antagonistas de cada uno de los receptores son capaces de bloquear el efecto de los agonistas del otro, en un fenómeno conocido como antagonismo cruzado bidireccional¹⁶⁵. La microglía homeostática expresa receptores CB₁ que forman heterómeros con receptores CB₂, los cuales no se encuentran unidos a proteína G. Sin embargo, en la microglía reactiva no solo aumenta la expresión de CB₂, sino que estos receptores se acoplan mediante proteína G a la maquinaria de señalización. Estos receptores heterómeros son un blanco biológico de cannabinoides tanto endógenos como exógenos, y en microglía reactiva median los efectos neuroprotectores de los cannabinoides¹⁶⁶. Estudios en los que se co-expresa CB₁ y CB₂ en líneas celulares han encontrado que CBDA aumenta de forma significativa la formación de heterómeros CB₁-CB₂¹⁵³, por lo cual puede sugerirse que los receptores que se encuentran en esta conformación sean los mediadores de los cambios comportamentales observados. Recientemente, se ha identificado el rol del sEC como modulador de las respuestas emocionales frente a estímulos externos¹⁶⁷, por lo cual es posible que el tratamiento con eCBDA afecte en mayor medida las áreas que componen el cerebro social, revirtiendo el fenotipo comportamental observado. Sería interesante entonces, en el futuro, estudiar la microglía y su respuesta frente al tratamiento con eCBDA, en áreas implicadas en la respuesta social. La señalización a través de los receptores CB₁ y CB₂, como otros receptores GPCRs, presenta agonismo sesgado, donde un mismo receptor puede activar distintas vías de señalización según el ligando que se una¹⁵³, lo que complejiza prever los efectos sobre estos receptores. Por otro lado, tampoco es posible descartar el efecto de CBDA sobre otros blancos farmacológicos aun no descritos.

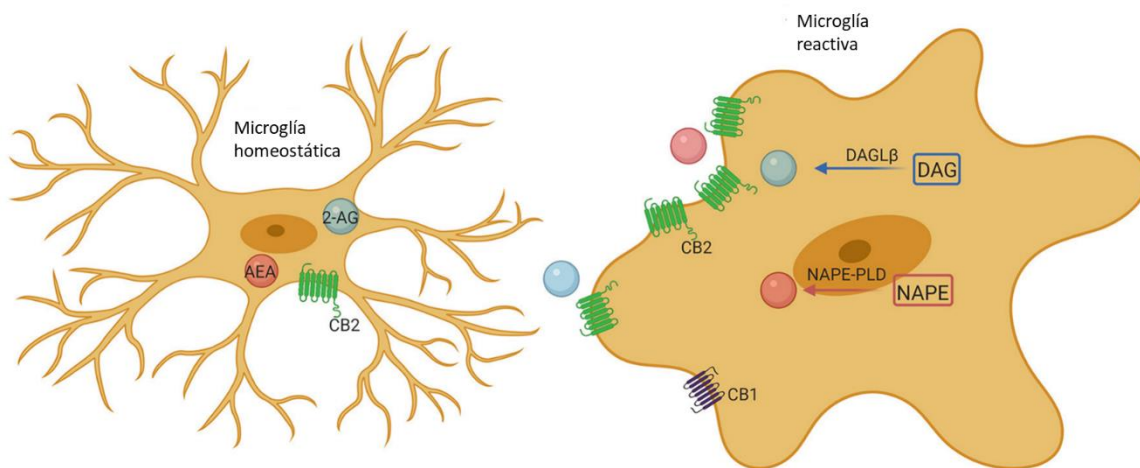


Figura 29 - Las células microgliales poseen todos los elementos funcionales del sistema endocannabinoide. En condiciones de neuroinflamación, la microglía aumenta significativamente la síntesis de endocannabinoides, siendo capaces de producir veinte veces más endocannabinoides que las neuronas. Adaptado de Tangfeng et al, Front Psychiatry, 2021.

En el modelo Shank3B, Peça et al.¹⁸ describió alteraciones en los circuitos cortico-estriatales, incluyendo alteraciones en la composición molecular de la maquinaria postsináptica, aumento en el tamaño y complejidad de los árboles dendríticos de neuronas estriatales, así como aumento en el largo total de sus dendritas, reducción en la densidad de las espinas dendríticas, y reducción en el número de sinapsis funcionales. Además, encuentra hipertrofia del caudado¹⁸. Estos resultados indican alteraciones de los circuitos cortico-estriatales. Por otra parte, otra investigación señala que un aumento en el número de sinapsis excitatorias podría estar mediando comportamientos de tipo autista, tales como déficits sociales y de comunicación, así como el aumento de la presencia de intereses restringidos y comportamientos repetitivos⁵². Finalmente, un aumento de sinapsis locales, pero una disminución de sinapsis de proyección conectando entre distintas áreas del cerebro podrían ser la causa de los comportamientos observados en TEA, mediante déficits en la integración de información proveniente de distintos sistemas¹⁶⁰. Hasta la fecha, no se han publicado trabajos evaluando la microglía en este modelo genético.

En nuestro laboratorio, observamos que tanto hembras como machos KO tratados con vehículo presentan un aumento significativo de células microgliales respecto a los animales WT tratados tanto con vehículo como eCBDA, y este aumento se revierte cuando los animales KO son tratados con eCBDA (**Tabla 5**). El aumento de células microgliales observado en la corteza cerebral de animales Shank3B KO tratados con vehículo podría ser consecuencia de las alteraciones descritas en los circuitos cortico-estriatales, como ser déficits en el ensamblaje de proteínas postsinápticas, que estarían generando desequilibrios en la interacción neurona-glia. Es posible que en los animales de este modelo también presenten alteraciones en astrocitos. Los componentes del extracto alto en CBDA podrían estar actuando sobre receptores del sEC u otros blancos farmacológicos. Por otra parte, es posible que se dé la interacción con receptores CB₂ microgliales, transformando la microglía neuroinflamatoria en neuroprotectora, aunque estudios más profundos a nivel transcriptómico serían necesarios para confirmar dicha hipótesis. A su vez, este efecto podría tener como consecuencia el cambio comportamental observado, revirtiendo el exceso de auto-acicalamiento en el contexto social, especialmente de hembras.

Por otra parte, Shank forma parte de una vía esencial para la formación, maduración, plasticidad y mantenimiento de las sinapsis, la vía neurexina- neuroligina- Shank (NRXN-NLGN-SHANK)^{159,168}. La neurexina y la neuroligina son proteínas de adhesión molecular, pre y postsinápticas respectivamente. En esta vía, la neurexina presináptica forma complejos trans-sinápticos con la neuroligina postsináptica en sinapsis glutamatérgicas, que se unen a Shank en la densidad postsináptica^{159,169}. Mutaciones en los genes que codifican para estas tres proteínas están asociados con la patogénesis de TEA¹⁶⁹, posiblemente porque alteraciones en la proporción de moléculas de adhesión y proteínas de andamiaje afectan el balance E/I^{170,171}.

En el modelo ambiental también se encontró que tanto machos como hembras presentan un aumento en el número de células microgliales luego del tratamiento con vehículo, respecto a animales no tratados con VPA durante su gestación (**Tabla 5**). Es importante destacar que los animales utilizados como control para este experimento son animales WT del modelo Shank3B, dado que tienen el mismo trasfondo genético que los animales VPA, sin embargo, otros experimentos realizados en animales del modelo VPA también reportan este aumento⁵⁸. Si bien en machos ninguno de los tratamientos administrados fue capaz de afectar el número de microglía encontrada en la corteza cerebral, en hembras este número disminuyó parcialmente tras la administración de eCBDA.

La expresión genética de los receptores CB₁ y CB₂ no difiere en corteza frontal, hipocampo ni cerebelo de ratas de cinco semanas de edad tratadas con VPA durante su gestación en comparación con aquellas tratadas con solución salina¹⁵¹. Esto podría estar indicando que no hay mayor número de microglía reactiva, por lo cual el origen fenotípico comportamental de este modelo podría no estar relacionado con neuroinflamación. Es posible que la actividad microglial estuviese alterada durante el período perinatal, en un proceso de neuroinflamación aguda, afectando la poda sináptica y en consecuencia la formación de circuitos y el balance E/I, pero luego del cierre de las ventanas sensibles, esta microglía no generase neuroinflamación crónica.

Es posible que el efecto comportamental observado luego de la administración crónica con eCBDA esté mediado por receptores no-cannabinoides. CBDA es un agonista del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, y es capaz de aumentar su activación, incluso en mayor medida que CBD¹⁰². La serotonina es un neurotransmisor muy ampliamente distribuido, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Además de ser un neurotransmisor, también es una hormona, y cumple una gran cantidad de funciones, desde regulación cardiovascular y del sistema gastrointestinal, sensibilidad al dolor, y termorregulación, hasta el mantenimiento del ciclo circadiano, el apetito, la agresión, la conducta sexual, el humor, la cognición, el aprendizaje y la memoria. Además, la serotonina es esencial para la plasticidad sináptica y el desarrollo cerebral, y existe una gran abundancia de inervaciones serotoninérgicas en las áreas límbicas del cerebro, fundamentales para la expresión emocional y el comportamiento social¹⁷². Los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} son receptores metabotrópicos, unidos a proteína G. Es uno de los subtipos de receptores serotoninérgicos más abundantes y ampliamente distribuidos en el SNC, y pueden clasificarse en dos poblaciones: autoreceptores y heteroreceptores. Los autoreceptores se encuentran en neuronas serotoninérgicas del núcleo de Rafe, e inhiben la liberación de serotonina mediante regulación negativa. Los heteroreceptores se encuentran en neuronas no serotoninérgicas, ubicadas en áreas de proyección de neuronas serotoninérgicas, como ser hipocampo, amígdala y corteza prefrontal, y median respuestas de miedo, ansiedad, estrés, depresión y funciones cognitivas¹⁷³.

Más del 25% de niños diagnosticados con autismo tienen niveles elevados de serotonina en sangre¹⁷⁴. Además, ratones con una mutación que elimina la producción de serotonina en el cerebro presentan déficits en interacción social, y aumento muy significativo de comportamientos repetitivos¹⁷⁵. Una de las posibilidades planteadas para la etiología de los TEA implica la función de la serotonina sobre la plasticidad sináptica durante el desarrollo embrionario, afectando el desarrollo de las regiones cerebrales implicadas en la comunicación y las emociones¹⁷². Además, se plantea que los altos niveles de serotonina en el SNC durante el desarrollo podrían estar generando una disminución de las terminales nerviosas serotoninérgicas¹⁷². En la actualidad, uno de los tratamientos utilizados para los pacientes con TEA son fármacos que afectan este sistema, como ser los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (SSRIs), sin embargo, a pesar de su extendido uso, los estudios realizados en humanos no son conclusivos sobre su efectividad, y se destacan efectos secundarios severos, tales como retención urinaria y convulsiones, especialmente en niños^{176,177}. Futuros estudios deberían evaluar si, en el caso de TEA mediado por alteraciones serotoninérgicas, eCBDA tiene efectos similares a los SSRIs, con menores efectos secundarios.

En el presente trabajo solo se ha evaluado el número de células microgliales mediante recuento utilizando el marcador microglial Iba1. En el modelo Shank3B aún no está estudiado el papel de la microglía, por lo cual sería interesante analizar marcadores específicos de microglía

homeostática, como P2ry12^{178,179}. Una aproximación más ambiciosa sería la utilización de técnicas de transcriptómica para evaluar el fenotipo microglial en el modelo y luego del tratamiento con CBDA.

Además, en ninguno de los grupos analizados se observaron diferencias en el número de células microgliales en el cuerpo estriado. Sin embargo, sería importante evaluar la posibilidad de cambios morfológicos en esta área. Además, en estudios a futuro sería interesante también analizar la microglía en otras áreas del cerebro, y estudiar otras características de las células microgliales como ser su morfología, su expresión de receptores CB₁ y CB₂, o liberación de agentes neuroinflamatorios. Además, podría evaluarse el número de espinas dendríticas como indicador de la poda sináptica, en particular en neuronas glutamatérgicas.

Consideraciones finales, conclusiones y perspectivas

La caracterización comportamental de modelos preclínicos de TEA llevada a cabo en esta tesis evidenció que tanto el modelo murino genético como el ambiental analizados presentan fenotipo comportamental de tipo autista, en ambos sexos. Además, se observó que, en el modelo genético, este fenotipo varía con la edad de los animales.

Por otra parte, la administración crónica de eTHCA no presentó efectos de reversión comportamental, mientras que el tratamiento con eCBDA es capaz de revertir comportamientos de tipo autista en ambos sexos. Además, este tratamiento reduce el número de microglía en la corteza cerebral de animales en ambos sexos del modelo genético y parcialmente en hembras del modelo ambiental. Finalmente, la administración de CBDAp únicamente revierte los comportamientos de tipo autista en machos. Sin embargo, no es capaz de disminuir el número de células microgliales en la corteza cerebral de ninguno de los dos sexos.

A pesar de que los resultados de esta tesis son sumamente prometedores, es imperativo incrementar el tamaño de la muestra en varios de los experimentos realizados para garantizar la robustez de los resultados obtenidos.

Es importante destacar que, en ninguno de los modelos ni sexos, el tratamiento administrado afectó de ninguna manera ningún comportamiento que no estuviese alterado previamente, por lo que la administración de los distintos tratamientos no estaría generando efectos secundarios dentro de los comportamientos evaluados.

Finalmente, en el contexto de este estudio, el tratamiento comenzó a administrarse en la adolescencia tardía de los animales, ya que el objetivo era analizar su efecto en el caso de diagnósticos tempranos. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un aumento muy significativo de diagnósticos tardíos, realizados en la edad adulta, especialmente en mujeres^{180,181}. Por esta razón, sería interesante evaluar la eficacia de estos tratamientos comenzando en la edad adulta, y evaluar su eficacia cuando la administración comienza significativamente después del cierre de las ventanas sensibles observadas en el período perinatal y la adolescencia.

Si bien son necesarios ensayos clínicos para validar la eficacia y seguridad de los tratamientos basados en cannabinoides en humanos, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren nuevas moléculas para el desarrollo de terapias novedosas para personas con trastornos del espectro autista.

BIBLIOGRAFÍA

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association; 2013. doi:10.1176/appi.books.9780890425596
2. Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. Psychiatric Disorders in Children With Autism Spectrum Disorders: Prevalence, Comorbidity, and Associated Factors in a Population-Derived Sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008;47(8):921-929. doi:10.1097/CHI.0b013e318179964f
3. Mannion A, Leader G. Comorbidity in autism spectrum disorder: A literature review. *Res Autism Spectr Disord*. 2013;7(12):1595-1616. doi:10.1016/j.rasd.2013.09.006
4. Leyfer OT, Folstein SE, Bacalman S, et al. Comorbid Psychiatric Disorders in Children with Autism: Interview Development and Rates of Disorders. *J Autism Dev Disord*. 2006;36(7):849-861. doi:10.1007/s10803-006-0123-0
5. Casanova EL, Baeza-Velasco C, Buchanan CB, Casanova MF. The Relationship between Autism and Ehlers-Danlos Syndromes/Hypermobility Spectrum Disorders. *J Pers Med*. 2020;10(4):260. doi:10.3390/jpm10040260
6. Raz N, Heller I, Lombardi T, Marino G, Davidson EM, Eyal AM. Terpene-Enriched CBD oil for treating autism-derived symptoms unresponsive to pure CBD: Case report. *Front Pharmacol*. 2022;13. doi:10.3389/fphar.2022.979403
7. Chavez B, Chavez-Brown M, Rey JA. Psychiatry: Role of Risperidone in Children with Autism Spectrum Disorder. *Ann Pharmacother*. 2006;40(5):909-916. doi:10.1345/aph.1G389
8. Wink LK, Plawecki MH, Erickson CA, Stigler KA, McDougale CJ. Emerging drugs for the treatment of symptoms associated with autism spectrum disorders. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2010;15(3):481-494. doi:10.1517/14728214.2010.487860
9. Rivet TT, Matson JL. Review of gender differences in core symptomatology in autism spectrum disorders. *Res Autism Spectr Disord*. 2011;5(3):957-976. doi:10.1016/j.rasd.2010.12.003
10. Hiller RM, Young RL, Weber N. Sex Differences in Autism Spectrum Disorder based on DSM-5 Criteria: Evidence from Clinician and Teacher Reporting. *J Abnorm Child Psychol*. 2014;42(8):1381-1393. doi:10.1007/s10802-014-9881-x
11. Dean M, Harwood R, Kasari C. The art of camouflage: Gender differences in the social behaviors of girls and boys with autism spectrum disorder. *Autism*. 2017;21(6):678-689. doi:10.1177/1362361316671845
12. Anderson GD. Chapter 1 Gender Differences in Pharmacological Response. In: ; 2008:1-10. doi:10.1016/S0074-7742(08)00001-9
13. Madla CM, Gavins FKH, Merchant HA, Orlu M, Murdan S, Basit AW. Let's talk about sex: Differences in drug therapy in males and females. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;175:113804. doi:10.1016/j.addr.2021.05.014
14. Franconi F, Brunelleschi S, Steardo L, Cuomo V. Gender differences in drug responses. *Pharmacol Res*. 2007;55(2):81-95. doi:10.1016/j.phrs.2006.11.001
15. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Hultman C, Larsson H, Reichenberg A. The

- Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA*. 2017;318(12):1182. doi:10.1001/jama.2017.12141
16. Leblond CS, Nava C, Polge A, et al. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments. Barsh GS, ed. *PLoS Genet*. 2014;10(9):e1004580. doi:10.1371/journal.pgen.1004580
 17. Dhamne SC, Silverman JL, Super CE, et al. Replicable in vivo physiological and behavioral phenotypes of the Shank3B null mutant mouse model of autism. *Mol Autism*. 2017;8(1):26. doi:10.1186/s13229-017-0142-z
 18. Peça J, Feliciano C, Ting JT, et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*. 2011;472(7344):437-442. doi:10.1038/nature09965
 19. Costales JL, Kolevzon A. Phelan–McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. *Neurotherapeutics*. 2015;12(3):620-630. doi:10.1007/s13311-015-0352-z
 20. Grabrucker AM, Schmeisser MJ, Schoen M, Boeckers TM. Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. *Trends Cell Biol*. 2011;21(10):594-603. doi:10.1016/j.tcb.2011.07.003
 21. Monteiro P, Feng G. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18(3):147-157. doi:10.1038/nrn.2016.183
 22. Peça J, Ting J, Feng G. SnapShot: Autism and the Synapse. *Cell*. 2011;147(3):706-706.e1. doi:10.1016/j.cell.2011.10.015
 23. Betancur C, Buxbaum JD. SHANK3 haploinsufficiency: a “common” but underdiagnosed highly penetrant monogenic cause of autism spectrum disorders. *Mol Autism*. 2013;4(1):17. doi:10.1186/2040-2392-4-17
 24. Balaan C, Corley MJ, Eulalio T, et al. Juvenile Shank3b deficient mice present with behavioral phenotype relevant to autism spectrum disorder. *Behav Brain Res*. 2019;356:137-147. doi:10.1016/j.bbr.2018.08.005
 25. Grabrucker AM. Environmental Factors in Autism. *Front Psychiatry*. 2013;3. doi:10.3389/fpsy.2012.00118
 26. Adab N. The longer term outcome of children born to mothers with epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(11):1575-1583. doi:10.1136/jnnp.2003.029132
 27. Christensen J, Grønborg TK, Sørensen MJ, et al. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *JAMA*. 2013;309(16):1696. doi:10.1001/jama.2013.2270
 28. Smith V, Brown N. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2014;99(5):198. doi:10.1136/archdischild-2013-305636
 29. Bromley RL, Mawer GE, Briggs M, et al. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(6):637-643. doi:10.1136/jnnp-2012-304270
 30. Bromley RL, Mawer G, Love J, et al. Early cognitive development in children born to women with epilepsy: A prospective report. *Epilepsia*. 2010;51(10):2058-2065. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02668.x

31. Favre MR, Barkat TR, LaMendola D, Khazen G, Markram H, Markram K. General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Front Behav Neurosci.* 2013;7. doi:10.3389/fnbeh.2013.00088
32. Sui L, Chen M. Prenatal exposure to valproic acid enhances synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex and fear memories. *Brain Res Bull.* 2012;87(6):556-563. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.01.011
33. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(23):15089-15094. doi:10.1073/pnas.222550499
34. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36734-36741. doi:10.1074/jbc.M101287200
35. Hou Q, Wang Y, Li Y, Chen D, Yang F, Wang S. A Developmental Study of Abnormal Behaviors and Altered GABAergic Signaling in the VPA-Treated Rat Model of Autism. *Front Behav Neurosci.* 2018;12. doi:10.3389/fnbeh.2018.00182
36. Al Sagheer T, Haida O, Balbous A, et al. Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018;21(9):871-882. doi:10.1093/ijnp/pyy043
37. Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16(1):91-103. doi:10.1017/S1461145711001714
38. Matcovitch-Natan O, Winter DR, Giladi A, et al. Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science.* 2016;353(6301). doi:10.1126/science.aad8670
39. Thion MS, Garel S. On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. *Curr Opin Neurobiol.* 2017;47:121-130. doi:10.1016/j.conb.2017.10.004
40. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med.* 2017;23(9):1018-1027. doi:10.1038/nm.4397
41. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Neuroforum.* 2005;11(3):95-96. doi:10.1515/nf-2005-0304
42. Kumar M, Arora P, Sandhir R. Biphasic Role of Microglia in Healthy and Diseased Brain. In: *The Biology of Glial Cells: Recent Advances.* Springer Singapore; 2022:507-537. doi:10.1007/978-981-16-8313-8_18
43. Nakamura Y. Regulating Factors for Microglial Activation. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(8):945-953. doi:10.1248/bpb.25.945
44. Rodriguez JI, Kern JK. Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *Neuron Glia Biol.* 2011;7(2-4):205-213. doi:10.1017/S1740925X12000142
45. Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int Rev Psychiatry.* 2005;17(6):485-495. doi:10.1080/02646830500381930

46. Takano T. Role of Microglia in Autism: Recent Advances. *Dev Neurosci*. 2015;37(3):195-202. doi:10.1159/000398791
47. Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*. 2022;110(21):3458-3483. doi:10.1016/j.neuron.2022.10.020
48. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 2011;333(6048):1456-1458. doi:10.1126/science.1202529
49. Katz LC, Shatz CJ. Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits. *Science*. 1996;274(5290):1133-1138. doi:10.1126/science.274.5290.1133
50. Hua JY, Smith SJ. Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci*. 2004;7(4):327-332. doi:10.1038/nn1218
51. Koyama R, Ikegaya Y. Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Neurosci Res*. 2015;100:1-5. doi:10.1016/j.neures.2015.06.005
52. Rubenstein JLR, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain Behav*. 2003;2(5):255-267. doi:10.1034/j.1601-183X.2003.00037.x
53. Fagiolini M, Leblanc JJ. Autism: A critical period disorder? *Neural Plast*. 2011;2011. doi:10.1155/2011/921680
54. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, et al. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*. 2012;74(4):691-705. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.026
55. Liao X, Yang J, Wang H, Li Y. Microglia mediated neuroinflammation in autism spectrum disorder. *J Psychiatr Res*. 2020;130:167-176. doi:10.1016/j.jpsychires.2020.07.013
56. Rinaldi T, Perrodin C, Markram H. Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic acid animal model of autism. *Front Neural Circuits*. 2008;2(OCT). doi:10.3389/neuro.04.004.2008
57. Rinaldi T, Silberberg G, Markram H. Hyperconnectivity of Local Neocortical Microcircuitry Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Cereb Cortex*. 2008;18(4):763-770. doi:10.1093/cercor/bhm117
58. Gąssowska-Dobrowolska M, Cieřlik M, Czapski GA, et al. Prenatal Exposure to Valproic Acid Affects Microglia and Synaptic Ultrastructure in a Brain-Region-Specific Manner in Young-Adult Male Rats: Relevance to Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3576. doi:10.3390/ijms21103576
59. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res*. 1998;57(1):1-9. doi:10.1016/S0169-328X(98)00040-0
60. Lenz KM, Nugent BM, Haliyur R, McCarthy MM. Microglia Are Essential to Masculinization of Brain and Behavior. *J Neurosci*. 2013;33(7):2761-2772. doi:10.1523/JNEUROSCI.1268-12.2013
61. Schwarz JM, Sholar PW, Bilbo SD. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *J Neurochem*. 2012;120(6):948-963. doi:10.1111/j.1471-

4159.2011.07630.x

62. Rebuli ME, Gibson P, Rhodes CL, Cushing BS, Patisaul HB. Sex differences in microglial colonization and vulnerabilities to endocrine disruption in the social brain. *Gen Comp Endocrinol*. 2016;238:39-46. doi:10.1016/j.ygcen.2016.04.018
63. Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res*. 1978;148(2):333-346. doi:10.1016/0006-8993(78)90723-0
64. Lenz KM, Nugent BM, McCarthy MM. Sexual Differentiation of the Rodent Brain: Dogma and Beyond. *Front Neurosci*. 2012;6. doi:10.3389/fnins.2012.00026
65. Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(11):757-764. doi:10.1038/nrn3811
66. Fernández S, Carreras T, Castro R, et al. A comparative study of supercritical fluid and ethanol extracts of cannabis inflorescences: Chemical profile and biological activity. *J Supercrit Fluids*. 2022;179:105385. doi:10.1016/j.supflu.2021.105385
67. de Fonseca FR, del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: Physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol*. 2005;40(1):2-14. doi:10.1093/alcalc/agh110
68. Mechoulam R, Parker LA. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu Rev Psychol*. 2013;64(1):21-47. doi:10.1146/annurev-psych-113011-143739
69. Meyer HC, Lee FS, Gee DG. The Role of the Endocannabinoid System and Genetic Variation in Adolescent Brain Development. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(1):21-33. doi:10.1038/npp.2017.143
70. Lu H-C, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*. 2021;6(6):607-615. doi:10.1016/j.bpsc.2020.07.016
71. Marzo V Di, Bifulco M, Petrocellis L De. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(9):771-784. doi:10.1038/nrd1495
72. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiol Rev*. 2009;89(1):309-380. doi:10.1152/physrev.00019.2008
73. Busquets Garcia A, Soria-Gomez E, Bellocchio L, Marsicano G. Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. *F1000Research*. 2016;5:990. doi:10.12688/f1000research.8245.1
74. Shahbazi F, Grandi V, Banerjee A, Trant JF. Cannabinoids and Cannabinoid Receptors: The Story so Far. *iScience*. 2020;23(7):101301. doi:10.1016/j.isci.2020.101301
75. Chen D, Gao M, Gao F, Su Q, Wu J. Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(3):312-316. doi:10.1038/aps.2016.149
76. Stella N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology*. 2009;56:244-253. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.037
77. Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F. CB 2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol*. 2008;153(2):240-251.

doi:10.1038/sj.bjp.0707584

78. Kim J, Choi P, Park YT, Kim T, Ham J, Kim JC. The Cannabinoids, CBDA and THCA, Rescue Memory Deficits and Reduce Amyloid-Beta and Tau Pathology in an Alzheimer's Disease-like Mouse Model. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7). doi:10.3390/ijms24076827
79. Rivas-Santisteban R, Lillo A, Lillo J, et al. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) and cannabinoid CB2 receptors form functional complexes in cells of the central nervous system: insights into the therapeutic potential of neuronal and microglial NMDA receptors. *Alzheimers Res Ther.* 2021;13(1):184. doi:10.1186/s13195-021-00920-6
80. Katona I, Freund TF. Multiple Functions of Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Annu Rev Neurosci.* 2012;35(1):529-558. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150420
81. Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB 1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2015;172(20):4790-4805. doi:10.1111/bph.13250
82. Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol.* 2011;163(7):1344-1364. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x
83. Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses.* 2006;66(2):234-246. doi:10.1016/j.mehy.2005.08.026
84. Lewis M, Russo E, Smith K. Pharmacological Foundations of Cannabis Chemovars. *Planta Med.* 2018;84(04):225-233. doi:10.1055/s-0043-122240
85. Sime J, Souza JDR, Lisboa JR, et al. Does the "Entourage Effect" in Cannabinoids Exist? A Narrative Scoping Review. *Cannabis Cannabinoid Res.* Published online August 3, 2023. doi:10.1089/can.2023.0052
86. Piomelli D. Waiting for the Entourage. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2019;4(3):137-138. doi:10.1089/can.2019.29014.dpi
87. Howlett AC. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):161-202. doi:10.1124/pr.54.2.161
88. Maroon J, Bost J. Review of the neurological benefits of phytocannabinoids. *Surg Neurol Int.* 2018;9(1):91. doi:10.4103/sni.sni_45_18
89. Fernández-Ruiz J, Sagredo O, Pazos MR, et al. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(2):323-333. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04341.x
90. Hua T, Vemuri K, Pu M, et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell.* 2016;167(3):750-762.e14. doi:10.1016/j.cell.2016.10.004
91. An D, Peigneur S, Hendrickx LA, Tytgat J. Targeting Cannabinoid Receptors: Current Status and Prospects of Natural Products. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):5064. doi:10.3390/ijms21145064
92. Lisboa SF, Gomes F V., Guimaraes FS, Campos AC. Microglial cells as a link between cannabinoids and the immune hypothesis of psychiatric disorders. *Front Neurol.* 2016;7(JAN). doi:10.3389/fneur.2016.00005

93. Walter L, Stella N. Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol*. 2004;141(5):775-785. doi:10.1038/sj.bjp.0705667
94. Moreno-Sanz G. Can You Pass the Acid Test? Critical Review and Novel Therapeutic Perspectives of Δ^9 -Tetrahydrocannabinolic Acid A. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2016;1(1):124-130. doi:10.1089/can.2016.0008
95. Franco R, Rivas-Santisteban R, Reyes-Resina I, et al. Pharmacological potential of varinic-, minor-, and acidic phytocannabinoids. *Pharmacol Res*. 2020;158:104801. doi:10.1016/j.phrs.2020.104801
96. Nallathambi R, Mazuz M, Ion A, et al. Anti-Inflammatory Activity in Colon Models Is Derived from Δ^9 -Tetrahydrocannabinolic Acid That Interacts with Additional Compounds in Cannabis Extracts. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2017;2(1):167-182. doi:10.1089/can.2017.0027
97. Dawidowicz AL, Olszowy-Tomczyk M, Typek R. CBG, CBD, Δ^9 -THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ^9 -THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. *Fitoterapia*. 2021;152:104915. doi:10.1016/j.fitote.2021.104915
98. Boulebd H. Is cannabidiolic acid an overlooked natural antioxidant? Insights from quantum chemistry calculations. *New J Chem*. 2022;46(1):162-168. doi:10.1039/D1NJ04771J
99. Petrovici AR, Simionescu N, Sandu AI, Paraschiv V, Silion M, Pinteala M. New Insights on Hemp Oil Enriched in Cannabidiol: Decarboxylation, Antioxidant Properties and In Vitro Anticancer Effect. *Antioxidants*. 2021;10(5):738. doi:10.3390/antiox10050738
100. Takeda S, Misawa K, Yamamoto I, Watanabe K. Cannabidiolic Acid as a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitory Component in Cannabis. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(9):1917-1921. doi:10.1124/dmd.108.020909
101. Rock EM, Limebeer CL, Parker LA. Effect of cannabidiolic acid and Δ^9 -tetrahydrocannabinol on carrageenan-induced hyperalgesia and edema in a rodent model of inflammatory pain. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018;235(11):3259-3271. doi:10.1007/s00213-018-5034-1
102. Bolognini D, Rock E, Cluny N, et al. Cannabidiolic acid prevents vomiting in *Suncus murinus* and nausea-induced behaviour in rats by enhancing 5-HT_{1A} receptor activation. *Br J Pharmacol*. 2013;168(6):1456-1470. doi:10.1111/bph.12043
103. Assareh N, Gururajan A, Zhou C, Luo JL, Kevin RC, Arnold JC. Cannabidiol disrupts conditioned fear expression and cannabidiolic acid reduces trauma-induced anxiety-related behaviour in mice. *Behav Pharmacol*. 2020;31(6):591-596. doi:10.1097/FBP.0000000000000565
104. Takeda S, Okajima S, Miyoshi H, et al. Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicol Lett*. 2012;214(3):314-319. doi:10.1016/j.toxlet.2012.08.029
105. Suzuki M, Takeda S, Okazaki H, Watanabe K, Takiguchi M, Aramaki H. Cannabidiolic Acid-Mediated Interference with AP-1 Transcriptional Activity in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Nat Prod Commun*. 2017;12(5):1934578X1701200. doi:10.1177/1934578X1701200520

106. Mecha M, Feliú A, Carrillo-Salinas FJ, et al. Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia. *Brain Behav Immun*. 2015;49:233-245. doi:10.1016/j.bbi.2015.06.002
107. Murphy N, Cowley TR, Blau CW, et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 exerts anti-inflammatory effects in hippocampus of aged rats and restores an age-related deficit in long-term potentiation. *J Neuroinflammation*. 2012;9(1):581. doi:10.1186/1742-2094-9-79
108. Ramírez BG, Blázquez C, del Pulgar TG, Guzmán M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's Disease Pathology by Cannabinoids: Neuroprotection Mediated by Blockade of Microglial Activation. *J Neurosci*. 2005;25(8):1904-1913. doi:10.1523/JNEUROSCI.4540-04.2005
109. Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A. Cannabinoids ablate release of TNF α in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia*. 2003;41(2):161-168. doi:10.1002/glia.10177
110. Yuan T-F, Hou G, Zhao Y, Arias-Carrion O. Commentary: The Effects of Psychological Stress on Microglial Cells in the Brain. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*. 2015;14(3):304-308. doi:10.2174/1871527314666150123122851
111. Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, et al. β -Adrenergic Receptor Antagonism Prevents Anxiety-Like Behavior and Microglial Reactivity Induced by Repeated Social Defeat. *J Neurosci*. 2011;31(17):6277-6288. doi:10.1523/JNEUROSCI.0450-11.2011
112. Ortega-Alvaro A, Aracil-Fernández A, García-Gutiérrez MS, Navarrete F, Manzanares J. Deletion of CB2 Cannabinoid Receptor Induces Schizophrenia-Related Behaviors in Mice. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(7):1489-1504. doi:10.1038/npp.2011.34
113. García-Gutiérrez M, Pérez-Ortiz J, Gutiérrez-Adán A, Manzanares J. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB 2 receptors. *Br J Pharmacol*. 2010;160(7):1773-1784. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00819.x
114. García-Gutiérrez MS, Manzanares J. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J Psychopharmacol*. 2011;25(1):111-120. doi:10.1177/0269881110379507
115. Wu J, Chen N, Liu Y, et al. Studies of involvement of G-protein coupled receptor-3 in cannabidiol effects on inflammatory responses of mouse primary astrocytes and microglia. Eugenin EA, ed. *PLoS One*. 2021;16(5):e0251677. doi:10.1371/journal.pone.0251677
116. Fishbein-Kaminietsky M, Gafni M, Sarne Y. Ultralow doses of cannabinoid drugs protect the mouse brain from inflammation-induced cognitive damage. *J Neurosci Res*. 2014;92(12):1669-1677. doi:10.1002/jnr.23452
117. Martín-Moreno AM, Reigada D, Ramírez BG, et al. Cannabidiol and Other Cannabinoids Reduce Microglial Activation In Vitro and In Vivo: Relevance to Alzheimer's Disease. *Mol Pharmacol*. 2011;79(6):964-973. doi:10.1124/mol.111.071290
118. Rodrigues da Silva N, Gomes FV, Sonogo AB, Silva NR da, Guimarães FS. Cannabidiol attenuates behavioral changes in a rodent model of schizophrenia through 5-HT1A, but not CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Res*. 2020;156(March):104749. doi:10.1016/j.phrs.2020.104749

119. Gomes F V., Llorente R, Del Bel EA, Viveros MP, López-Gallardo M, Guimarães FS. Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. *Schizophr Res.* 2015;164(1-3):155-163. doi:10.1016/j.schres.2015.01.015
120. Durieux LJA, Gilissen SRJ, Arckens L. Endocannabinoids and cortical plasticity: CB1R as a possible regulator of the excitation/inhibition balance in health and disease. *Eur J Neurosci.* 2022;55(4):971-988. doi:10.1111/ejn.15110
121. Pretzsch CM, Freyberg J, Voinescu B, et al. Effects of cannabidiol on brain excitation and inhibition systems; a randomised placebo-controlled single dose trial during magnetic resonance spectroscopy in adults with and without autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2019;44(8):1398-1405. doi:10.1038/s41386-019-0333-8
122. Aran A, Cassuto H, Lubotzky A, Wattad N, Hazan E. Brief Report: Cannabidiol-Rich Cannabis in Children with Autism Spectrum Disorder and Severe Behavioral Problems—A Retrospective Feasibility Study. *J Autism Dev Disord.* 2019;49(3):1284-1288. doi:10.1007/s10803-018-3808-2
123. Aran A, Harel M, Cassuto H, et al. Cannabinoid treatment for autism: a proof-of-concept randomized trial. *Mol Autism.* 2021;12(1):6. doi:10.1186/s13229-021-00420-2
124. Fleury-Teixeira P, Caixeta FV, Ramires da Silva LC, Brasil-Neto JP, Malcher-Lopes R. Effects of CBD-Enriched Cannabis sativa Extract on Autism Spectrum Disorder Symptoms: An Observational Study of 18 Participants Undergoing Compassionate Use. *Front Neurol.* 2019;10. doi:10.3389/fneur.2019.01145
125. Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Comp Neurol.* 1996;370(2):247-261. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2
126. ANY-maze (RRID:SCR_014289) Stoelting Co, USA. www.any-maze.com
127. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. The Open Field Test. In: ; 2009:1-20. doi:10.1007/978-1-60761-303-9_1
128. Lipkind D, Sakov A, Kafkafi N, Elmer GI, Benjamini Y, Golani I. New replicable anxiety-related measures of wall vs. center behavior of mice in the open field. *J Appl Physiol.* 2004;97(1):347-359. doi:10.1152/japplphysiol.00148.2004
129. Arakawa H. Implication of the social function of excessive self-grooming behavior in BTBR T+Itpr3tf/J mice as an idiopathic model of autism. *Physiol Behav.* 2021;237:113432. doi:10.1016/j.physbeh.2021.113432
130. Liu H, Huang X, Xu J, et al. Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the Shank3B mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model. *Neurobiol Stress.* 2021;15:100417. doi:10.1016/j.ynstr.2021.100417
131. Chang Y, Cole TB, Costa LG. Behavioral Phenotyping for Autism Spectrum Disorders in Mice. *Curr Protoc Toxicol.* 2017;72(1). doi:10.1002/cptx.19
132. Crawley JN. Mouse Behavioral Assays Relevant to the Symptoms of Autism*. *Brain Pathol.* 2007;17(4):448-459. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00096.x
133. Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. Marble Burying and

- Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice. *J Vis Exp*. 2013;(82). doi:10.3791/50978
134. Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21(6):801-810. doi:10.1016/S0149-7634(96)00058-9
 135. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322-328. doi:10.1038/nprot.2007.44
 136. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*. 2012;13(2):93-110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z
 137. Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*. 2017;(126). doi:10.3791/55718
 138. Paxinos G, Franklin K. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press; 2001.
 139. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
 140. GraphPad Prism v 8.0.0 for Windows, Graphpad Software, San Diego, California, USA. www.graphpad.com
 141. Podgorac J, Pešić V, Pavković Ž, et al. Early physical and motor development of mouse offspring exposed to valproic acid throughout intrauterine development. *Behav Brain Res*. 2016;311:99-109. doi:10.1016/j.bbr.2016.05.023
 142. Ferber SG, Namdar D, Hen-Shoval D, et al. The “Entourage Effect”: Terpenes Coupled with Cannabinoids for the Treatment of Mood Disorders and Anxiety Disorders. *Curr Neuropsychopharmacol*. 2020;18(2):87-96. doi:10.2174/1570159X17666190903103923
 143. Green RM, Travers AM, Howe Y, McDougall CJ. Women and Autism Spectrum Disorder: Diagnosis and Implications for Treatment of Adolescents and Adults. *Curr Psychiatry Rep*. 2019;21(4):22. doi:10.1007/s11920-019-1006-3
 144. Liu H, Tan M, Cheng B, et al. Valproic Acid Induces Autism-Like Synaptic and Behavioral Deficits by Disrupting Histone Acetylation of Prefrontal Cortex ALDH1A1 in Rats. *Front Neurosci*. 2021;15(April):1-14. doi:10.3389/fnins.2021.641284
 145. Caballero A, Orozco A, Tseng KY. Developmental regulation of excitatory-inhibitory synaptic balance in the prefrontal cortex during adolescence. *Semin Cell Dev Biol*. 2021;118:60-63. doi:10.1016/j.semcdb.2021.02.008
 146. Poleg S, Kourieh E, Ruban A, et al. Behavioral aspects and neurobiological properties underlying medical cannabis treatment in Shank3 mouse model of autism spectrum disorder. *Transl Psychiatry*. 2021;11(1):1-11. doi:10.1038/s41398-021-01612-3
 147. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(1):80-89. doi:10.1038/sj.npp.1300518
 148. Melancia F, Schiavi S, Servadio M, et al. Sex-specific autistic endophenotypes induced by prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling. *Br J Pharmacol*. 2018;175(18):3699-3712. doi:10.1111/bph.14435
 149. Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, et al. Gender-specific behavioral and

- immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(6):728-740. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.02.011
150. Marco EM, Rapino C, Caprioli A, Borsini F, Maccarrone M, Laviola G. Social encounter with a novel partner in adolescent rats: Activation of the central endocannabinoid system. *Behav Brain Res*. 2011;220(1):140-145. doi:10.1016/j.bbr.2011.01.044
 151. Kerr DM, Downey L, Conboy M, Finn DP, Roche M. Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism. *Behav Brain Res*. 2013;249:124-132. doi:10.1016/j.bbr.2013.04.043
 152. Karhson DS, Krasinska KM, Dallaire JA, et al. Plasma anandamide concentrations are lower in children with autism spectrum disorder. *Mol Autism*. 2018;9(1):18. doi:10.1186/s13229-018-0203-y
 153. Navarro G, Varani K, Lillo A, et al. Pharmacological data of cannabidiol- and cannabigerol-type phytocannabinoids acting on cannabinoid CB1, CB2 and CB1/CB2 heteromer receptors. *Pharmacol Res*. 2020;159:104940. doi:10.1016/j.phrs.2020.104940
 154. Anderson LL, Ametovski A, Lin Luo J, et al. Cannabichromene, Related Phytocannabinoids, and 5-Fluoro-cannabichromene Have Anticonvulsant Properties in a Mouse Model of Dravet Syndrome. *ACS Chem Neurosci*. 2021;12(2):330-339. doi:10.1021/acschemneuro.0c00677
 155. Edmonson CA, Ziats MN, Rennert OM. A Non-inflammatory Role for Microglia in Autism Spectrum Disorders. *Front Neurol*. 2016;7. doi:10.3389/fneur.2016.00009
 156. Paolicelli RC, Gross CT. Microglia in development: linking brain wiring to brain environment. *Neuron Glia Biol*. 2011;7(1):77-83. doi:10.1017/S1740925X12000105
 157. Gifford JJ, Deshpande P, Mehta P, Wagner GC, Kusnecov AW. The Effect of Valproic Acid Exposure throughout Development on Microglia Number in the Prefrontal Cortex, Hippocampus and Cerebellum. *Neuroscience*. 2022;481:166-177. doi:10.1016/j.neuroscience.2021.11.012
 158. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforazzini F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci*. 2014;17(3):400-406. doi:10.1038/nn.3641
 159. Bourgeron T. A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol*. 2009;19(2):231-234. doi:10.1016/j.conb.2009.06.003
 160. Courchesne E, Pierce K. Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15(2):225-230. doi:10.1016/j.conb.2005.03.001
 161. Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(11):877-888. doi:10.1038/nrn1787
 162. Su T, Yan Y, Li Q, Ye J, Pei L. Endocannabinoid System Unlocks the Puzzle of Autism Treatment via Microglia. *Front Psychiatry*. 2021;12. doi:10.3389/fpsy.2021.734837
 163. Tetreault NA, Hakeem AY, Jiang S, et al. Microglia in the Cerebral Cortex in Autism. *J Autism Dev Disord*. 2012;42(12):2569-2584. doi:10.1007/s10803-012-1513-0

164. Gupta S, Ellis SE, Ashar FN, et al. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nat Commun*. 2014;5(1):5748. doi:10.1038/ncomms6748
165. Callén L, Moreno E, Barroso-Chinea P, et al. Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Form Functional Heteromers in Brain. *J Biol Chem*. 2012;287(25):20851-20865. doi:10.1074/jbc.M111.335273
166. Navarro G, Borroto-Escuela D, Angelats E, et al. Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB1 and CB2 receptors and relevance for Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia. *Brain Behav Immun*. 2018;67:139-151. doi:10.1016/j.bbi.2017.08.015
167. Lutz B. Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(1):46-52. doi:10.1016/j.coph.2008.12.001
168. He L, Liu X, Song Y, Tang Y. Role of NRXN-NLGN-SHANK pathway gene variations in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Chinese J Med Genet*. 2018;35(5):753-756. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2018.05.031
169. Gong X, Wang H. SHANK1 and autism spectrum disorders. *Sci China Life Sci*. 2015;58(10):985-990. doi:10.1007/s11427-015-4892-6
170. Chugh D, Nilsson P, Afjei S-A, Bakochi A, Ekdahl CT. Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons. *Exp Neurol*. 2013;250:176-188. doi:10.1016/j.expneurol.2013.09.005
171. Gkogkas CG, Khoutorsky A, Ran I, et al. Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature*. 2013;493(7432):371-377. doi:10.1038/nature11628
172. Sodhi MS., Sanders-Bush E. Serotonin and brain development. In ; 2004:111-174. doi:10.1016/S0074-7742(04)59006-2
173. Albert PR, Vahid-Ansari F. The 5-HT1A receptor: Signaling to behavior. *Biochimie*. 2019;161:34-45. doi:10.1016/j.biochi.2018.10.015
174. Muller CL, Anacker AMJ, Veenstra-VanderWeele J. The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. *Neuroscience*. 2016;321:24-41. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.11.010
175. Kane MJ, Angoa-Peréz M, Briggs DI, et al. Mice Genetically Depleted of Brain Serotonin Display Social Impairments, Communication Deficits and Repetitive Behaviors: Possible Relevance to Autism. de Erausquin GA, ed. *PLoS One*. 2012;7(11):e48975. doi:10.1371/journal.pone.0048975
176. Williams K, Wheeler DM, Silove N, Hazell P. Cochrane Review: Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for autism spectrum disorders (ASD). *Evidence-Based Child Heal A Cochrane Rev J*. 2011;6(4):1044-1078. doi:10.1002/ebch.804
177. West L, Brunssen SH, Waldrop J. Review of the Evidence for Treatment of Children with Autism with Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *J Spec Pediatr Nurs*. 2009;14(3):183-191. doi:10.1111/j.1744-6155.2009.00196.x
178. Gómez Morillas A, Besson VC, Lerouet D. Microglia and Neuroinflammation: What Place for P2RY12? *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1636. doi:10.3390/ijms22041636

179. Babiec L, Wilkaniec A, Matuszewska M, Pałasz E, Cieślik M, Adamczyk A. Alterations of Purinergic Receptors Levels and Their Involvement in the Glial Cell Morphology in a Pre-Clinical Model of Autism Spectrum Disorders. *Brain Sci.* 2023;13(7):1088. doi:10.3390/brainsci13071088
180. Begeer S, Mandell D, Wijnker-Holmes B, et al. Sex Differences in the Timing of Identification Among Children and Adults with Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord.* 2013;43(5):1151-1156. doi:10.1007/s10803-012-1656-z
181. Leedham A, Thompson AR, Smith R, Freeth M. 'I was exhausted trying to figure it out': The experiences of females receiving an autism diagnosis in middle to late adulthood. *Autism.* 2020;24(1):135-146. doi:10.1177/1362361319853442

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis tutoras, Natalia e Inés. **Natalia**, gracias por abrirme las puertas al laboratorio, por enseñarme tanto, de ciencias y también de lo que significa ser una mujer en la ciencia. Por siempre tener en cuenta mi opinión, darme tiempo de aprender y libertad para probar cosas nuevas. **Inés**, gracias por siempre estar ahí para dar una mano, siempre disponible y siempre ayudando con todo, lo científico y lo no tanto. Gracias a ambas por tenerme paciencia siempre, por escuchar siempre mis propuestas, por tener en cuenta las válidas, y por decirme delicadamente cuando no eran tan buenas. Por siempre empujarme a seguir e intentar llegar más lejos.

A todos en el **Laboratorio de Neuroinflamación y Terapia Génica** del IPMon, **Hugo, Andrés, Bruno, Daniela y Frances**. Fui la última en llegar, me abrieron la puerta y me hicieron sentir bienvenida y cómoda, siempre dispuestos a dar una mano o prestar una oreja. Así como fui la última en llegar, es un honor enorme para mí ser quien apaga la luz y cierra la puerta en este laboratorio, que me dio tantas oportunidades y me enseñó tanto.

Al laboratorio al que entro, o más bien vuelvo, **Neuroendocrinología de los Comportamientos Afiliativos**. A **Nati Uriarte** por tener un lugar para mí cuando lo necesité, y por tenerme infinita paciencia para terminar con este proyecto. A todas por recibirme con los brazos abiertos como si nunca me hubiese ido. A **Laura**, me fui a IBRO con una desconocida y volví con una amiga.

A la **UBAL**, y particularmente a **Sergio y Andrea**, no solo por hacerme sentir cómoda con que mis animales iban a estar bien cuidados siempre, sino por hacerme sentir cómoda en el bioterio, siempre estar para dar una mano, y charlar un ratito por los pasillos, aunque siempre fuese a las corridas.

A **Laura Quintana**, por abrirme las puertas de su laboratorio (e invitarme a las pescas a pesar de no saber ni que es una laguna), y especialmente por sugerirme como candidata para este proyecto y siempre darme para adelante con todo. A todo el resto de la **UBNC**, y del **Laboratorio de Neurociencias** de Facultad de Ciencias. Con ustedes aprendí muchísimo, pero más que nada siento que de esos laboratorios me llevo amigas y amigos.

A **Juani y Valen**, por estar siempre y en todas las circunstancias. Por saber cuándo darme espacio y cuándo alentarme a relajarme y despejar la cabeza. Por estar ahí, siempre al firme. Por mostrarme las cosas maravillosas que pueden hacer los científicos jóvenes en este país, e inspirarme a hacer más, a crecer como científica y como persona.

A **mi padre, mi madre y mi hermana**, siempre dándome para adelante, siempre pensando que puedo más, siempre dándome mi espacio para crecer.

Y por último, a **Nico**. Gracias por estar siempre, por darme tu apoyo incondicional, por siempre tener las palabras adecuadas para darme para adelante, por saber cuándo dejarme descansar y cuando alentarme a escribir un poquito más. Por tu paciencia infinita con mi estrés y mis preocupaciones. Por escucharme hablar de esto constantemente y siempre darme una mano para ordenar las ideas. Por estar desde el principio para darme la mano a través de las cosas complicadas y festejar incluso más que yo cuando salen cosas buenas.

GRACIAS GRACIAS GRACIAS!

