



**UNIMORE**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI  
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in  
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

**VALUTAZIONE QUANTITATIVA DEI LIVELLI DEL  
NEUROSTEROIDE PREGNENOLONE SOLFATO  
IN UN MODELLO ANIMALE DI AUTISMO**

*Relatrice:*

***Prof.ssa Giulia Puja***

*Co-relatrice:*

***Dott.ssa Elisa Berselli***

*Tesi sperimentale  
di Laurea Magistrale in  
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (LM-13) di:  
**Giulia Marolda***

**A.A. 2024/2025**

## Sommario

1. ABSTRACT .....	4
2. INTRODUZIONE .....	6
2.1. Disturbi dello Spettro Autistico .....	6
2.1.1. Fattori di rischio .....	7
2.1.2. Attivazione Immunitaria Materna .....	9
2.1.3. Terapie e trattamenti .....	15
2.2. Neurosteroidi .....	16
2.2.1. Biosintesi .....	17
2.2.2. Meccanismo d'azione .....	19
2.2.3. Pregnenolone solfato .....	23
2.2.4. Neuroinfiammazione e neurosteroidi .....	24
2.2.5. Neurosteroidi e Autismo.....	27
2.2.6. Potenziali effetti terapeutici dei neurosteroidi.....	29
2.3. Enzimi steroidogenici.....	30
2.4. Disturbi neuropsichiatrici e steroidogenesi .....	32
2.5. Differenze tra maschi e femmine nell'autismo.....	33
2.6. La cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa per l'analisi dei neurosteroidi.....	35
3. SCOPO DELLO STUDIO .....	38
4. MATERIALI E METODI.....	38
4.1. Animali .....	38
4.2. Allestimento del modello MIA.....	39
4.3. Sample processing .....	40
4.4. Cromatografia liquida e Spettrometria di Massa.....	44
4.5. Analisi dei dati.....	48
5. RISULTATI.....	50

5.1.1.	Confronto dei livelli di PS nella prole di madri trattate e non trattate a E18, P7, P14, P28 in ippocampo e corteccia .....	50
5.1.2.	Confronto dei livelli di PS in cervelletto e striato nella prole a P7 di madri trattate e non trattate .....	53
5.1.3.	Confronto dei livelli di PS tra maschi e femmine a P7, P14, P28 in ippocampo e corteccia.....	54
6.	DISCUSSIONE .....	55
7.	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	59
8.	BIBLIOGRAFIA .....	60

# 1. ABSTRACT

L'autismo è un disturbo del neurosviluppo che si sta verificando, negli ultimi anni, sempre più frequentemente e che colpisce con maggiore incidenza la popolazione maschile rispetto a quella femminile (rapporto 4:1). Presenta sintomi molto vari che in molti casi ostacolano le attività quotidiane e la possibilità di una normale vita sociale. Dato l'aumento di tale disturbo e le conseguenze che ne derivano, si rende sempre più necessario trovare cure e soluzioni per migliorare la qualità della vita delle persone che ne soffrono.

Solide evidenze scientifiche e studi epidemiologici indicano che l'attivazione immunitaria materna (MIA) e l'infiammazione prenatale sono importanti fattori di rischio nell'insorgenza delle malattie del neurosviluppo (NDD), tra cui il disturbo dello spettro autistico.

I neurosteroidi (NS) sono sintetizzati nel cervello sia dai neuroni sia dalle cellule gliali e agiscono come modulatori endogeni delle funzioni cerebrali come il comportamento, gli stati emotivi e la memoria. I loro livelli variano significativamente durante il neurosviluppo, infatti, i NS, modulando l'eccitabilità neuronale possono modificare la maturazione sinaptica nel sistema nervoso centrale.

I livelli di NS variano anche nei disturbi neuropsichiatrici e lavori recenti evidenziano l'importanza di queste molecole nei processi infiammatori.

Studi inerenti ad uno specifico NS, il pregnenolone solfato (PS), hanno evidenziato, oltre al suo effetto eccitatorio coinvolto nei processi mnemonici e cognitivi, che i suoi livelli variano nelle malattie del neurosviluppo, incluso l'autismo.

Alla luce di queste premesse, lo scopo della mia tesi è stato quello di analizzare i livelli di PS nel cervello di topi nati da madri sottoposte ad un protocollo di immunoattivazione materna (MIA), al fine di indagare se e in quale misura la MIA influenzi i livelli di PS nel cervello della prole.

La MIA induce l'infiammazione durante la gestazione attraverso l'iniezione intraperitoneale al quindicesimo giorno di gravidanza (GD15) di immunogeni LPS o POLY[I:C].

Utilizzando LC-MS/MS è stata fatta l'analisi quantitativa del PS in diverse aree cerebrali della prole murina (ippocampo, corteccia, cervelletto e striato) selezionando alcune età nello sviluppo (E18, P7, P14 e P28).

Si è registrato un aumento significativo di PS nell'ippocampo dei topi MIA-LPS (= madre trattata con LPS) a P7, mentre nei P28 MIA-POLY[I:C] (= madre trattata con POLY[I:C]) i livelli del NS sono significativamente elevati sia in corteccia che in ippocampo.

A P14 non ci sono state alterazioni significative nei livelli di PS nei cervelli della prole di madri trattate con nessuno dei due immunogeni.

Dato che la prima settimana di vita (P7) rappresenta un periodo molto importante nel neurosviluppo, sono stati analizzati a questa età anche il cervelletto e lo striato. Nel cervelletto i livelli di PS diminuiscono significativamente nella prole di madri trattate sia con LPS che con POLY[I:C], mentre nello striato non sono state registrate differenze significative nei gruppi analizzati.

Data la maggiore incidenza di autismo nei maschi rispetto alle femmine (rapporto 4:1), gli stessi esperimenti sono stati analizzati anche confrontando i livelli di PS tra i due sessi, ma non sono state evidenziate differenze significative nei cambiamenti dei livelli del NS nei maschi o nelle femmine.

Dai dati ottenuti è stato possibile dimostrare la correlazione tra un'infezione contratta in gravidanza che provoca un'attivazione immunitaria materna (MIA) e la variazione della concentrazione del PS nella prole. Le differenze nei livelli di PS sono dipendenti dalla regione cerebrale analizzata, dal periodo dello sviluppo considerato e dall'immunogeno utilizzato.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1. Disturbi dello Spettro Autistico

I disturbi dello spettro autistico che coinvolgono il neurosviluppo, comprendono il disturbo autistico, la sindrome di Asperger, il disturbo integrativo dell'infanzia e il disturbo pervasivo dello sviluppo non altrimenti specificato.

Generalmente si manifestano dall'infanzia o dalla prima infanzia con sintomi più o meno severi, anche se potrebbero non essere diagnosticati per diversi anni poiché nei primi anni di vita non sono richieste grandi abilità sociali oppure queste possono essere compensate dai genitori o dai caregiver (Lauritsen, 2013).

L'autismo è caratterizzato da comportamenti ripetitivi e stereotipati, inflessibilità, inaccettabilità dei cambiamenti, interessi fissi e risposte anomale agli stimoli sensoriali.

Questi pazienti generalmente hanno difficoltà nella comunicazione e nell'interazione sociale, soprattutto nella comprensione del linguaggio non verbale tra cui contatto visivo, gesti e linguaggio del corpo.

Nel corso degli anni, la prevalenza è aumentata: secondo un'indagine negli USA, negli anni '70 il rapporto di bambini autistici era di 1 ogni 10000, è aumentata ad 1 ogni 150 bambini nel 2000 fino ad arrivare a 1 ogni 54 nel 2016 (Zawadzka et al., 2021).

La crescente prevalenza dell'autismo (e più in generale delle malattie del neurosviluppo) non è tanto dovuta alla comparsa di nuove varianti di DNA, ma piuttosto dall'aumento delle alterazioni causate dall'ambiente, oltre che dai nuovi approcci diagnostici (Zablotsky et al., 2019).

Il disturbo dello spettro autistico è molto più comune nei maschi, con un'incidenza di 4:1 rispetto alle femmine; nell'eziologia dell'autismo, quindi, potrebbe esserci un coinvolgimento di fattori biologici sesso-specifici. Il meccanismo attraverso cui questi fattori interagiscono per dare origine alla preponderanza maschile tra gli individui con ASD non è ancora stato identificato (Werling & Geschwind, 2013).

Tuttavia, questi dati potrebbero non essere molto precisi: è stato infatti notato che le femmine con ASD mettono in atto dei meccanismi di "coping", ovvero si "camuffano" meglio con le altre persone della società tanto da non mostrare sintomi tipici dell'autismo. Per questo motivo, le pazienti femmine hanno più difficoltà a ricevere una diagnosi accurata rispetto ai maschi, di conseguenza soffrono maggiormente di stress, ansia e depressione (Young et al., 2018).

### 2.1.1. Fattori di rischio

L'autismo, così come gli altri disturbi del neurosviluppo (Neurodevelopmental Disorders: NDDs), ha un'origine multifattoriale.

Le forme monogeniche sono rare e la maggior parte delle forme genetiche identificate non sono causali ma semplicemente predispongono il soggetto alla malattia: è necessaria l'esposizione ad altri fattori di rischio affinché si manifesti un'anomalia del neurosviluppo. Tra i fattori di rischio sono state studiate in maniera approfondita le infezioni in gravidanza e il loro impatto sul neurosviluppo della prole (Matteoli et al., 2023).

Ciò che accomuna le infezioni è l'attivazione del sistema immunitario della madre, il quale comporta un importante rilascio di citochine pro-infiammatorie in grado di attraversare la placenta e la barriera ematoencefalica (BEE), e raggiungere il feto, aumentando così la probabilità che sviluppi una forma di autismo. (Boulanger-Bertolus et al., 2018).

Un effetto simile sul neurosviluppo si verifica anche inseguito all'esposizione della madre ai fattori di rischio non infettivi come stress, alcol, fumo, assunzione di farmaci, inquinamento e dieta ricca di grassi (Han et al., 2021).

Questi fattori di rischio, infettivi e non, vengono presi in considerazione perché incidono sui percorsi infiammatori o immunitari, infatti analisi di cervelli umani post-mortem di pazienti autistici hanno evidenziato la presenza di infiammazione cerebrale rispetto ai controlli. In particolare, lo studio in questione ha utilizzato tecniche di immunoistochimica e multiplex proteico che hanno dimostrato la presenza di neuroinfiammazione cronica in pazienti ASD post-mortem, caratterizzata dall'attivazione di microglia e dall'aumento delle citochine pro-infiammatorie (X. Li et al., 2009).

Queste evidenze sono state ulteriormente confermate da studi più recenti grazie al sequenziamento dell'RNA di ultima generazione, attraverso la quale è stato possibile analizzare l'espressione dei geni coinvolti sia nella neuroinfiammazione sia nella neurogenesì. In particolare, si è riscontrato un aumento dell'espressione genica della microglia, degli astrociti e in generale dell'immunità innata e dell'infiammazione, e una diminuzione dell'espressione dei geni coinvolti nelle sinapsi, confermando così la presenza di una componente neuroinfiammatoria diffusa nell'ASD. Nello studio viene fatto notare come queste alterazioni cerebrali avvengano soprattutto a livello corticale nelle aree sensoriali primarie, le quali potrebbero essere associate alle differenze di elaborazione sensoriale presenti nei disturbi dello spettro autistico (ASD), incluse nei criteri diagnostici del DSM-5. (Gandal et al., 2022).

Un solo fattore di rischio tendenzialmente non causa direttamente un'anomalia del neurosviluppo, ma serve piuttosto una combinazione di diversi fattori di rischio che agiscono in sinergia, come ad esempio lo stress e l'inquinamento. Lo stress aumenta la vulnerabilità della madre facilitando l'ingresso di tossine che scatenano una risposta immunitaria, responsabile dei danni sul neurosviluppo della prole, ed effettivamente lo stress e gli inquinanti agiscono sulle vie immunitarie innate all'interno del sistema nervoso in via di sviluppo (Bilbo et al., 2018).

Anche l'asma e le allergie, che sono risposte infiammatorie croniche, sono rilevanti nei disturbi del neurosviluppo, soprattutto perché negli ultimi anni i soggetti allergici e asmatici sono aumentati notevolmente. Degli studi caso-controllo hanno evidenziato che nelle madri allergiche e asmatiche la prole subisce danni come malattie respiratorie, basso peso alla nascita e aumento del rischio sia di malattie del neurosviluppo sia di malattie psichiatriche tra cui ansia, depressione, disturbo dello spettro autistico e ADHD (Church et al., 2021).

Un maggior rischio di autismo si è riscontrato anche nei bambini con anamnesi familiare di malattie autoimmuni (con maggior impatto da parte di malattie autoimmuni materne o paterne, piuttosto che degli altri famigliari), sia che si tratti di tutte le malattie autoimmuni combinate (28%), sia di malattie autoimmuni singole come ipotiroidismo (64%), diabete di tipo 1 (49%), artrite reumatoide (51%) e psoriasi (59%).

Per quanto riguarda l'ipotiroidismo, solamente quello materno causa una maggior probabilità di autismo nella prole: se il padre o altri famigliari sono affetti da ipotiroidismo, questa tendenza non si riscontra.

Nonostante queste informazioni siano state raccolte da diversi studi, sono comunque suggerite analisi più dettagliate sul possibile background genetico tra malattie autoimmuni e autismo (S. Wu et al., 2015).

Tra i fattori di rischio associati all'autismo vi sono inoltre quelli perinatali e neonatali, come ad esempio complicanze del cordone ombelicale, sofferenza fetale, lesioni o traumi alla nascita, parto multiplo, emorragia materna, basso peso alla nascita, malformazioni congenite e anemia neonatale (Gardener et al., 2011).

In generale, quindi, diversi fattori infiammatori materni tra cui obesità, asma, malattie autoimmuni, infezioni, stress psicologico e complicazioni durante il parto sono associati a un maggiore rischio di disturbi del neurosviluppo nella prole. A questi, si aggiunge l'importante componente epigenetica che gioca un ruolo fondamentale nell'insorgenza di queste malattie, infatti la componente genetica e i fattori ambientali si interfacciano nella patogenesi delle NDDs.

Le malattie del neurosviluppo stanno aumentando, pertanto sta diventando sempre più urgente capire come prevenirle in gravidanza, ma anche come mettere in atto possibili strategie terapeutiche nel neonato affinché ne venga salvaguardato il neurosviluppo (Han et al., 2021).

Studi epidemiologici si stanno svolgendo e si continueranno a svolgere anche per indagare eventuali correlazioni tra l'esposizione al virus Sars-Cov-2 (Covid-19) in gravidanza e la nascita di bambini con NDDs tra cui l'autismo, visto che purtroppo è un'infezione che innesca una massiccia attivazione immunitaria con conseguente alto rilascio di citochine pro-infiammatorie, in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica (BEE) e quindi responsabili dei danni durante il neurosviluppo (Steinman, 2020).

Per intervenire è fondamentale capire i meccanismi con cui l'infiammazione immunitaria materna sia associata alle malattie nel neurosviluppo, tra cui disturbo dello spettro autistico, disturbo di deficit dell'attenzione/iperattività e schizofrenia.

Per studiarli è stato realizzato un modello animale di attivazione immunitaria materna (Han et al., 2021).

### 2.1.2. Attivazione Immunitaria Materna

L'Attivazione Immunitaria Materna (MIA) può essere definita come l'aumento dei livelli dei marcatori infiammatori durante la gravidanza. Questa condizione può essere causata da infezioni, stress psicosociale o indice di massa corporea elevato, i quali sono associati a stati infiammatori correlati ad un maggior rischio di alterazioni del neurosviluppo della prole con conseguente predisposizione a disturbi mentali (Boulangier-Bertolus et al., 2018).

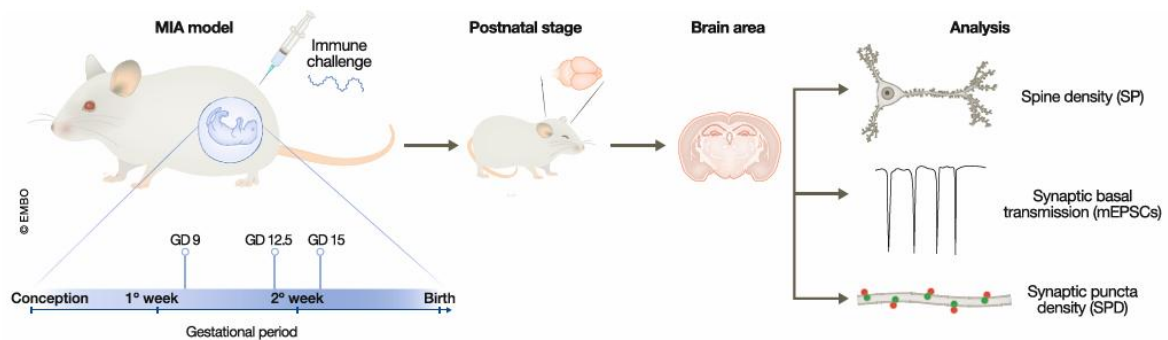
L'autismo e la schizofrenia, infatti, sono tra le malattie del neurosviluppo maggiormente sensibili a danni precoci al sistema nervoso centrale dovuti alle infezioni materne (Brown, 2012).

Questa associazione è stata evidenziata anche grazie ad uno studio in cui è stato analizzato il liquido amniotico di bambini che hanno successivamente sviluppato l'autismo confrontato con quello di controlli sani: si sono registrati livelli particolarmente elevati di citochine proinfiammatorie, tra cui IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , nei campioni dei bambini autistici rispetto ai controlli sani (Abdallah et al., 2013).

Per studiare l'associazione tra le malattie mentali e l'attivazione immunitaria materna sono stati allestiti dei modelli animali (roditori e primati non umani) che hanno infatti dimostrato l'esistenza di una relazione causale tra l'infezione materna prenatale e le anomalie del

neurosviluppo nella prole. Tali modelli MIA vengono utilizzati nella ricerca preclinica per identificare le cause e i meccanismi molecolari alla base di questi disturbi, nonché per sviluppare nuovi strumenti diagnostici e nuove terapie (Kentner et al., 2019).

Il modello animale murino per lo studio dell'attivazione immunitaria materna consiste nell'iniezione di Poly[I:C] (GD 9,5; GD 12,5), LPS (GD 15-16) o IL-6 (GD 15) nei giorni di gestazione rispettivamente specificati tra parentesi e nei dosaggi elencati nella tabella (Figura 2.1). Successivamente nel periodo post-natale l'animale, dopo essere stato sacrificato e decapitato, viene analizzato. L'analisi consiste nell'espianto e dissezione del cervello in corteccia e ippocampo in diversi momenti del periodo post natale per evidenziare la correlazione tra attivazione immunitaria materna e alterazione della densità sinaptica, ovvero gli effetti sulle sinapsi (Matteoli et al., 2023).



Immune challenge	Gestational period	Dosage	Animal model	Post-natal stage	Brain area analyzed	Effect on synapses	References
Poly:IC	GD 9.5	20 mg/kg	Mouse	P60	Cortex	SD ↑, SPD ↓	Soumiya et al (2011)
		5 mg/kg	Mouse	Adult	Hippocampus	SD =	Abazyan et al (2010) Corradini et al (2018)
	GD 12.5	20 mg/kg	Mouse	P19	Cortex	SD ↓; mEPSC ↓	Coiro et al (2015)
LPS	GD 15–16	100 µg/kg	Mouse	P15	Hippocampus	SD ↑	Fernandez de Cossio et al (2017)
			Rat	P10	Cortex	SD =	Baharnoori et al (2009)
IL-6	GD 15	5 µg/mouse	Mouse	P15-30	Hippocampus/ cortex	SPD ↑; mEPSC ↑; SD ↑	Mirabella et al (2021)

Figura 2.1: schematizzazione delle fasi sperimentali necessarie per stabilire una possibile correlazione tra l'attivazione immunitaria materna e alterazioni cerebrali nella prole (Matteoli et al., 2023).

Diversi studi hanno utilizzato questi modelli per indagare tali meccanismi, ognuno dei quali adotta approcci sperimentali differenti.

In uno di questi studi, dei topi in gravidanza sono stati esposti a due diversi ceppi del virus dell'influenza umana al 9,5° giorno di gestazione (GD). In queste condizioni sperimentali, la

madre ha prodotto solo un'infezione respiratoria subclinica moderata, mentre la prole ha mostrato dei comportamenti schizofrenici e autistici (Shi et al., s.d.).

Sono inoltre stati fatti altri esperimenti iniettando nella madre murina incinta l'acido poliinosinico-policitidilico sintetico a doppio filamento di RNA (Poly[I:C]) e l'LPS (lipopolisaccaride, tossina batterica) per mimare rispettivamente l'infezione virale e l'infezione batterica, entrambe responsabili dell'attivazione immunitaria materna, in diversi momenti della gravidanza. Da questi esperimenti è emerso che la MIA ha un effetto tempo-dipendente (Figura 2.2): se la madre murina si infetta durante il periodo di gestazione che va dal 9° al 17° giorno, cioè nel periodo a metà/fine gravidanza, la prole manifesta diverse anomalie comportamentali; questo perché, in quella fase della gravidanza, avvengono importanti processi legati al neurosviluppo come la neurogenesi e la sinaptogenesi (Meyer et al., 2006).

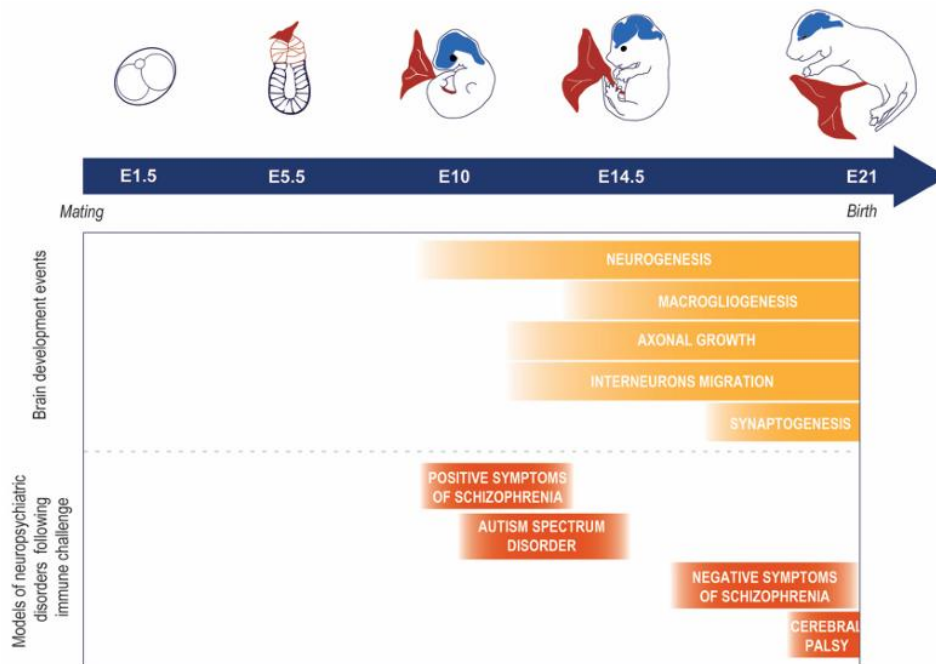


Figura 2.2: Esempio di modelli di disturbi neuropsichiatrici osservati come conseguenza di una attivazione immunitaria prenatale in diversi momenti dello sviluppo cerebrale nei roditori (Meyer et al., 2006).

I diversi studi in modelli animali hanno dunque stabilito che l'attivazione immunitaria materna è sufficiente a causare malattie del neurosviluppo, indipendentemente dal tipo di patogeno o fattore di rischio (Han et al., 2021).

Quello che succede nei topi è simile a ciò che succede negli umani: è stato dimostrato che livelli elevati di citochine nel siero materno negli esseri umani sono associati a un maggior rischio di disturbi del neurosviluppo nella prole (Ratnayake et al., 2013).

Durante il processo infiammatorio innescato dall'attivazione immunitaria materna vengono liberate citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , che sono responsabili dei danni sulla prole a causa della loro capacità di attraversare la placenta e la BEE del feto (Woods et al., 2023).

Uno studio ha analizzato la prole di modelli murini MIA confrontando gli effetti dell'LPS e del POLY[I:C] ed è emerso che il trattamento con POLY[I:C] ha provocato un ritardo nella crescita e nello sviluppo sensomotorio. Sia POLY[I:C] che LPS a livello cellulare hanno innescato una risposta infiammatoria iniziale, ma solo l'LPS ha ridotto l'espressione di marcatori cellulari nei feti, che però non si osserva più da P10 in poi. È stato inoltre rilevato un aumento dei livelli plasmatici di IL-2, IL-5 e IL-6 e un aumento dell'espressione del recettore metabotropico 5 (mGluR5), a cui si lega il glutammato e quindi mediatore della neurotrasmissione eccitatoria, nel cervello fetale della prole a P10 esposta a POLY[I:C] in fase prenatale (Arsenault et al., 2014).

Un altro studio ha studiato gli effetti di POLY[I:C] e LPS sulla prole e ha dimostrato che questi due antigeni sono responsabili dell'alterazione sia delle traiettorie di sviluppo della comunicazione neurone-microglia nel cervello sia degli squilibri del sistema immunitario: l'alterazione dell'espressione dei marcatori microgliali e del profilo delle citochine rilasciate nel cervello della prole giovane ha prodotto alterazioni comportamentali di tipo schizofrenico in età adulta, suggerendo quindi che l'effetto è di lunga durata (Chamera et al., 2020).

Come è mostrato in Figura 2.3, l'attivazione immunitaria materna viene innescata da un'infezione generica della madre che porta al rilascio di citochine proinfiammatorie, tra cui l'interleuchina 6 (IL-6), fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e pentraxina 3 (PTX3) le quali passano all'interno della placenta in cui innescano a loro volta il rilascio di altre citochine pro-infiammatorie a causa dell'attivazione delle cellule immunitarie locali. Le citochine dalla placenta arrivano al feto in cui continua l'infiammazione e di conseguenza il rilascio di altre citochine, le quali attraversano la barriera ematoencefalica ("BBB" nell'immagine) arrivando così al cervello dove innescano ulteriori processi infiammatori: attivazione della microglia, stress ossidativo e disfunzioni mitocondriali. Il risultato è la comparsa della neuroinfiammazione che è responsabile delle alterazioni del neurosviluppo nella prole, incluso l'autismo (Zawadzka et al., 2021).

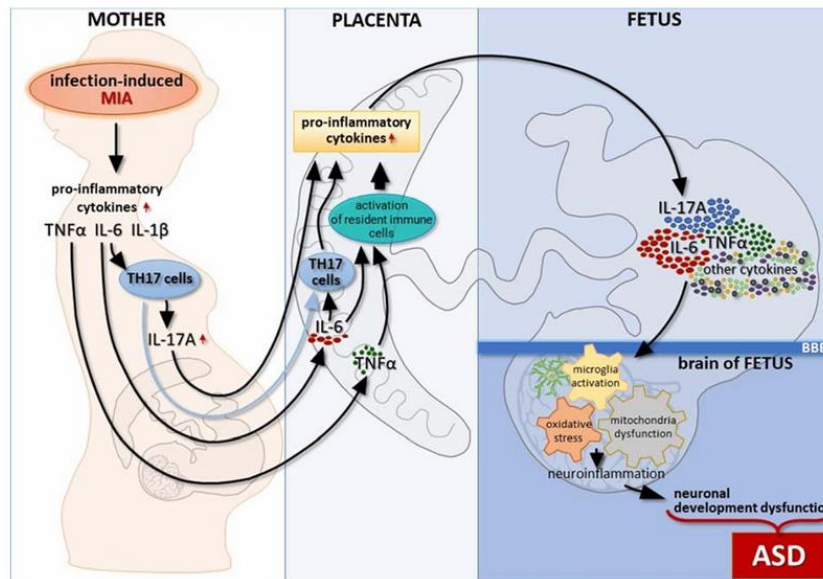


Figura 2.3: schema del rilascio citochinico dovuto all'attivazione immunitaria materna, dalla madre al feto attraverso la placenta, con relative conseguenze sul neurosviluppo della prole (Zawadzka et al., 2021).

**L'interleuchina 6** è una citochina proinfiammatoria responsabile dell'alterazione di processi cellulari fondamentali nel neurosviluppo (S. E. P. Smith et al., 2007).

In particolare, elevati livelli di IL-6 in gravidanza alterano la connettività cerebrale e aumentano il rischio di sviluppare disturbi psichiatrici nei neonati (Rasmussen et al., 2019). Questa citochina agisce attraverso complessi meccanismi d'azione. Uno di questi è la via di segnalazione *Januse Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (JAK/STAT3) a livello dello strato di spongiofoblasto nella placenta, in cui essa legandosi a recettori specifici innesca la dimerizzazione e la fosforilazione di fattori di trascrizione STAT, responsabili dell'aumento dell'espressione dei geni coinvolti nell'infiammazione acuta nel feto. L'IL-6 è inoltre associata all'alterazione dell'asse ormonale della crescita-fattore di crescita insulino-simile (GH-IGF), in particolare è responsabile della riduzione dei livelli di GH, IGF e IGFBP3, molto importanti per lo sviluppo nel feto (Hsiao & Patterson, 2011).

Gli studi attuali hanno inoltre dimostrato che l'esposizione cronica a questa citochina ad alte concentrazioni durante lo sviluppo provoca la perdita neuronale nelle colture primarie di neuroni granulari del cervelletto (Conroy et al., 2004).

Questo mediatore chiave dell'infiammazione è stato trovato a livelli elevati nei pazienti ASD, motivo per cui è un importante oggetto di studio (Hsiao et al., 2012).

È stato infatti possibile osservare che la diminuzione sperimentale di IL-6 è in grado di migliorare parzialmente i comportamenti simil-autistici nei topi, a sostegno della sua rilevanza nella sintomatologia dei disturbi dello spettro autistico (Zhang et al., 2025).

**L'interleuchina-1 $\beta$**  è un altro importante mediatore dell'infiammazione che viene prodotto principalmente da macrofagi e monociti, in seguito al rilascio di frammenti molecolari di patogeni (PAMPs batterici o virali) e di cellule danneggiate (DAMPs) (Redwood, s.d.).

Viene inoltre prodotta nel cervello da astrociti e microglia, in cui determina deficit della consolidazione della memoria dipendente dall'ippocampo (Patterson, 2015).

L'IL-1 $\beta$  si lega al recettore IL-1R1 nel cervello fetale attivando la via di segnalazione *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B), che a sua volta causa l'aumento dell'espressione genica di mediatori pro-infiammatori, contribuendo così all'attivazione della microglia e causando così anomalie del neurosviluppo. (Oskvig et al., 2012). Parallelamente, la via dell'NF- $\kappa$ B funge da segnale di priming, inducendo la trascrizione della pro-IL-1 $\beta$  e l'aumento dell'espressione dell'inflammasoma *Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3* (NLRP3), il quale viene inoltre assemblato in presenza di un segnale di attivazione, tra cui flussi ionici, danno lisosomiale, disfunzione mitocondriale, ROS. Questa struttura, attraverso l'attivazione della caspasi-1, stimola il clivaggio della pro-IL-1 $\beta$  nella forma matura IL-1 $\beta$ , instaurando così un circuito di amplificazione della risposta infiammatoria (Kelley et al., 2019).

Questa citochina è inoltre coinvolta nel ritardo della conversione dell'*Acido  $\gamma$ -Amminobutirrico* (GABA) da eccitatorio a inibitorio durante il neurosviluppo e quindi ad una maggiore suscettibilità alle convulsioni (Corradini et al., 2018).

La **Pentraxina 3** (PTX3) è una molecola di riconoscimento prodotta dalle cellule dell'immunità innata che svolge diversi ruoli fisiopatologici, dalle essenziali funzioni omeostatiche alla difesa contro agenti infettivi, oltre a promuovere la riparazione tissutale e la regolazione della carcinogenesi (Garlanda et al., 2018). È una proteina di fase acuta locale, infatti aumenta rapidamente in risposta a infiammazione/infezione in diversi distretti cellulari. In presenza di patogeni come virus, batteri e funghi, regola l'infiammazione modulando l'attivazione del complemento e l'extravasazione, facilitando così il riconoscimento del patogeno dalle cellule mieloidi (Porte et al., 2019).

Questa molecola è stata trovata nel liquido amniotico, a prova del fatto che è in grado di oltrepassare la placenta, in caso di infezione (Cruciani et al., 2010).

È stato evidenziato in un modello murino MIA indotta da LPS che l'infiammazione così innescata produce l'aumento di PTX3 nella prole, in particolare nel tessuto adiposo, favorendo la suscettibilità all'obesità, effetto associato all'iperattivazione della via MAPK (Qin et al., 2017).

### 2.1.3. Terapie e trattamenti

Ad oggi per i pazienti autistici vengono proposti interventi soprattutto dal punto di vista psicologico e comportamentale: più precoce è la diagnosi, maggiori sono i benefici. È stato infatti notato che gli interventi iniziati prima dei tre anni nel bambino autistico hanno maggiori probabilità di essere efficaci a lungo termine. Questo accade perché prima dei tre anni il cervello è ancora in via di sviluppo quindi presenta una maggiore plasticità (Dawson, 2008). Intervenendo in questo momento infatti si registrano maggiori miglioramenti nella comunicazione sociale, nelle capacità cognitive, nelle capacità adattive e nella riduzione della gravità dei sintomi dello spettro autistico (Landa, 2018).

Gli obiettivi del trattamento per i bambini con ASD includono:

1. minimizzare l'impatto delle difficoltà di comunicazione sociale, ridurre gli interessi ristretti e i comportamenti ripetitivi;
2. massimizzare le capacità adattive per raggiungere una maggiore indipendenza;
3. favorire l'acquisizione delle capacità funzionali prevenendo, riducendo o minimizzando l'impatto dei comportamenti che interferiscono con esse (Hyman et al., 2020).

A livello farmacologico non esistono farmaci in grado di modificare i sintomi principali dell'autismo, ma alcuni si sono mostrati efficaci per il controllo delle condizioni associate. Ad esempio, gli antipsicotici atipici sono utili per iperattività, impulsività, agitazione, crisi e aggressività; in caso di ansia, agitazione e sintomi ossessivo-compulsivi si possono usare antidepressivi come gli inibitori del reuptake della serotonina, mentre per i comportamenti stereotipati la Clonidina e la guanfacina mostrano una certa efficacia (Ruggieri, s.d.).

Negli ultimi anni si stanno indagando anche i potenziali effetti della Cannabis, infatti, il sistema cannabinoide è coinvolto nella regolazione delle emozioni e dei comportamenti sociali. Diversi studi hanno evidenziato una correlazione tra la disfunzione del sistema endocannabinoide e la patogenesi dell'autismo, soprattutto per quanto riguarda i deficit comportamentali e la neuroinfiammazione. Pertanto, il sistema endocannabinoide rappresenta un possibile target per cui la cannabis/cannabinoidi possono essere efficaci come

terapia farmacologica. Nonostante diverse indagini cliniche abbiano dato buoni risultati relativi al trattamento con cannabis nei pazienti autistici, esistono ancora pochi dati sulla loro efficacia nei vari fenotipi dello spettro autistico. È quindi importante proseguire gli studi clinici per mettere a punto un dosaggio che garantisca efficacia e sicurezza (Babayeva et al., 2022).

## 2.2. Neurosteroidi

I neurosteroidi (NS) sono steroidi neuroattivi che vengono prodotti direttamente nel sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP), in particolare nei neuroni e nella glia, sia a livello endogeno sia da steroli circolanti. Il cervello può quindi essere considerato come un organo steroidogenico simile a quelli periferici, ovvero le gonadi (ovaie e testicoli), le ghiandole adrenergiche e la placenta.

I neurosteroidi sono i derivati, inclusi quelli solfatati, dell'androstano e del pregnano, ovvero l'allopregnanolone (**ALLO**), il pregnenolone (**PREG**), il pregnenolone solfato (**PREGS**), pregnanolone, il deidroepiandrosterone (**DHEA**) e il deidroepiandrosterone solfato (**DHEAS**) (Figura 2.4) (Giatti et al., 2012; Lloyd-Evans & Waller-Evans, 2020).

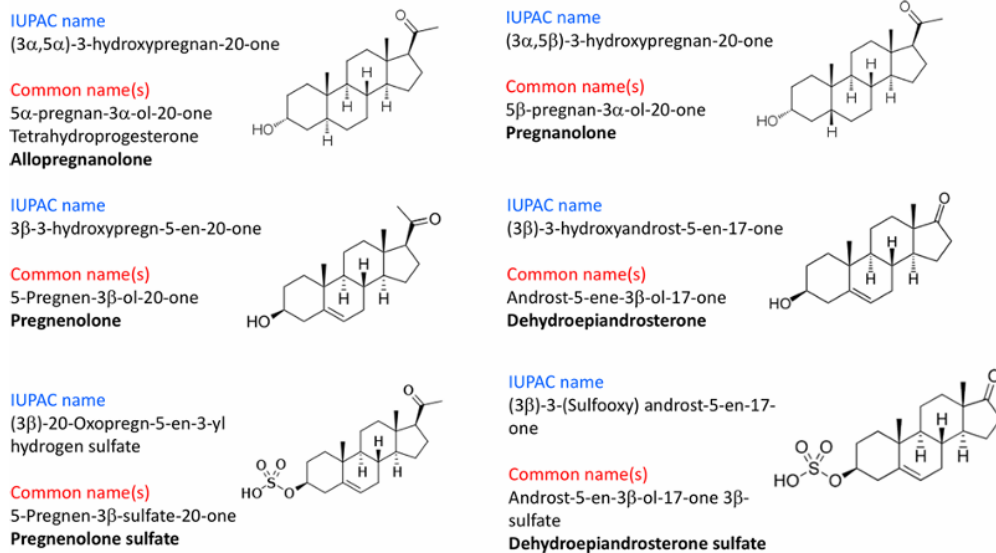


Figura 2.4: nomi IUPAC e nomenclatura comune dei neurosteroidi (Lloyd-Evans & Waller-Evans, 2020).

I NS sono raggruppati in tre classi in base alla loro **struttura chimica**, ognuna delle quali produce effetti diversi grazie alla loro interazione con i recettori di membrana.

I **pregnani** includono l'ALLO, il PREG, l'ISOALLO, l'Epipregnanolone e il THDOC, i quali esercitano effetti ansiolitici, riducono lo stress e migliorano la neurotrasmissione GABAergica (Henderson, 2018; McCurry et al., 2024; Sze & Brunton, 2022).

Gli **androstani**, ovvero l'Androstanediolo e l'Etiocolanone, riducono lo stress, aumentano la resilienza, attenuano la reattività, oltre ad avere effetti ansiolitici e antidepressivi (Almeida et al., 2021; Sripada, Marx, King, Rajaram, et al., 2013).

E infine i **solfati**, PS e DHEAS, hanno mostrato effetti antidepressivi (Sripada, Marx, King, Rajaram, et al., 2013).

### 2.2.1. Biosintesi

La steroidogenesi è il meccanismo biosintetico attraverso il quale vengono sintetizzati i neurosteroidi nei neuroni e nella glia del SNC e del SNP.

Inizia dal trasporto del colesterolo, proveniente dalla biosintesi nel reticolo endoplasmatico (RE) o dall'endocitosi delle proteine a bassa densità (LDL), all'interno dei mitocondri (Figura 2.5).

In alternativa, alcuni steroli che si trovano nel circolo sanguigno (ad esempio il progesterone e il DHEA) sono in grado di attraversare la BEE e vengono quindi utilizzati direttamente come precursori nella via biosintetica dei neurosteroidi. (Lloyd-Evans & Waller-Evans, 2020).

Come riportato in Figura 2.5, il primo step della neurosteroidogenesi consiste nel trasporto del colesterolo dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna grazie a un complesso multiproteico, detto trasducesoma, localizzato nella membrana mitocondriale esterna e formato dalla proteina traslocatrice (TSPO) e dalla proteina regolatoria steroidogenica acuta (StAR).

Una volta entrato nella membrana interna dei mitocondri, il colesterolo viene convertito in pregnenolone (PREG) dall'enzima citocromo P450 della famiglia 11 (CYP11A1). Il pregnenolone, precursore di tutti i neurosteroidi, può poi seguire diverse vie biosintetiche per dare origine a diversi prodotti. Può essere convertito in progesterone (PROG) dall'enzima 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\beta$ -HSD) nella zona di contatto tra mitocondrio e reticolo endoplasmatico (MT-RE), in testosterone (T) dagli enzimi della via metabolica  $\Delta$ 5 che si trovano nel RE, e in deidroepiandrosterone (DHEA) grazie a due diverse reazioni, ovvero idrossilazione e clivaggio (attività liasica), entrambe catalizzate dall'enzima citocromo P450 17 $\alpha$ -idrossilasi (CYP17A1) che agisce nel RE.

Il DHEA può essere convertito nei due intermedi androgeni, androstenediolo dall'enzima 17 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (17  $\beta$ -HSD) nel RE oppure androstenedione dall'enzima 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\beta$ -HSD) nel sito di contatto MT-RE. Questi due prodotti vengono poi trasformati in T, il quale però può essere ottenuto anche a partire dal PROG attraverso la via metabolica  $\Delta$ 4, i cui enzimi si trovano nel RE. Qui il T può essere poi trasformato in diidrotestosterone (DHT) dall'enzima 5 $\alpha$ -reduttasi.

Gli androgeni possono anche essere convertiti in estrogeni. L'androstenedione viene metabolizzato in estrone e il T in 17 $\beta$ -estradiolo (E2). Entrambe queste due reazioni avvengono nel RE per mezzo dell'enzima aromatasi. Il DHT può essere trasformato in 3 $\beta$ -diolo dall'enzima 3 $\beta$ -HSD nel sito di contatto MT-RE.

Il progesterone e il 17 $\alpha$ -idrossiprogesterone partecipano anche in altre reazioni che sono schematizzate sulla sinistra della Figura 2.5, grazie alle quali si ottengono diversi neurosteroidi. Gli enzimi 5 $\alpha$ -R, 5 $\beta$ -R 8 (nel RE) e 3 $\beta$ -HSD (nel sito di contatto MT-RE) sintetizzano l'allopregnanolone (ALLO) e il pregnanolone (PA), mentre il citocromo P450 famiglia 21 subfamiglia A membro 2 (CYP21A2) nel RE e il P450 famiglia 11 subfamiglia B membro 1 (CYP11B1) nel mitocondrio producono cortisolo e cortisone. Quest'ultimo deriva dall'intermedio 11-deossicorticosterone che può a sua volta essere convertito nel neurosteroido tetraidro-deossicorticosterone (THDOC).

I neurosteroidi PREG, DHEA e PA possono inoltre subire delle reazioni di solfatazione grazie agli enzimi sulfonil trasferasi (SULT) che agiscono nel citoplasma e che portano alla formazione dei rispettivi derivati solfati, ovvero pregnenolone solfato (PREG-S), deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) e pregnanolone solfato (PA-S). Queste forme solfatate hanno attività diversa rispetto alle rispettive forme non solfatate (Angeloni et al., 2025a).



(AMPA), il recettore gabaergico dell'Acido  $\gamma$ -amminobutirrico di tipo A (GABA-A) e il recettore  $\sigma 1$  (Schverer et al., 2018).

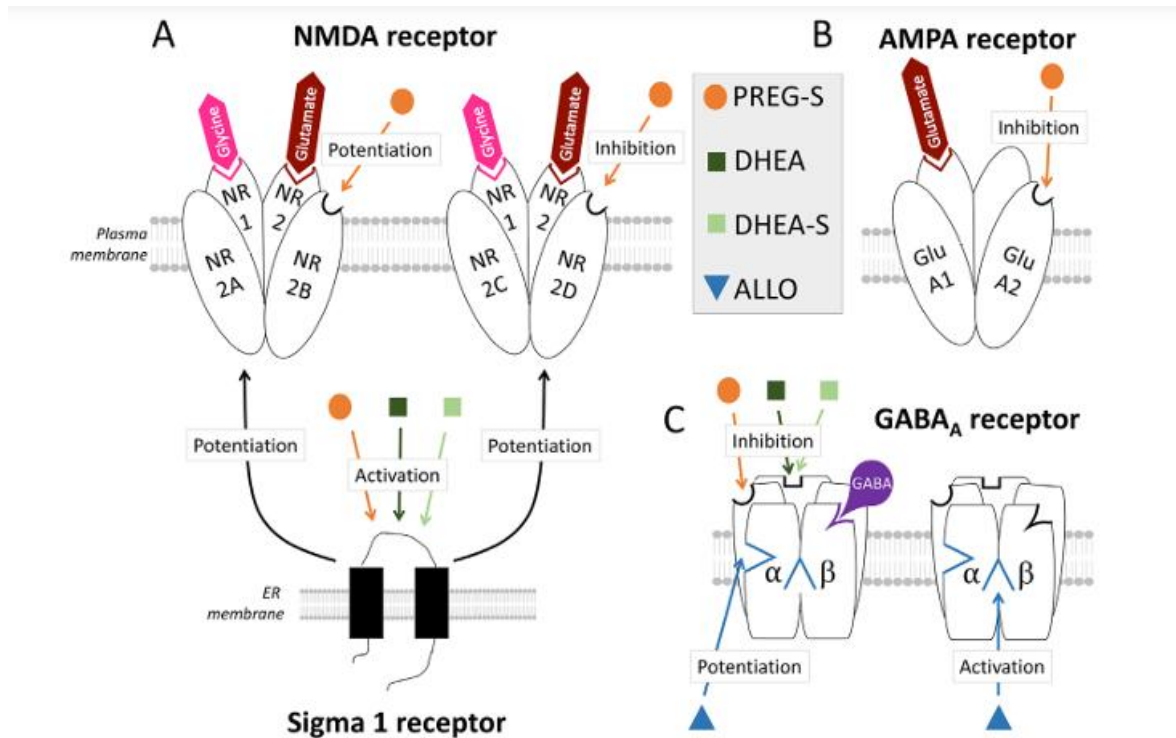


Figura 2.6: effetti rapidi dei neurosteroidi dovuti ai meccanismi non-genomici attraverso la loro interazione con i recettori di membrana (Schverer et al., 2018).

Le due principali classi di neurotrasmissioni sono la **glutammatergica** e la **gabaergica**, e sono modulate dai neurosteroidi (Schverer et al., 2018).

NMDA e AMPA sono recettori ionotropici glutammatergici che contribuiscono alla trasmissione **eccitatoria** nel cervello. I recettori **NMDA** sono complessi proteici eterotetrameriche composti dalla subunità NR1, che lega la glicina e dalle subunità NR2A-D, che lega il glutammato. In normale potenziale di riposo della membrana, il canale NMDA è bloccato dagli ioni  $Mg^{2+}$  i quali vengono scalzati dalla depolarizzazione della membrana. L'attivazione del recettore NMDA richiede il legame simultaneo del glutammato e della glicina (Figura 2.6A) (Stephenson, 2006). Il recettore NMDA si attiva più lentamente rispetto ai recettori AMPA, e una volta attivato permette l'entrata di ioni, incluso il calcio, attraverso cui innesca una plasticità sinaptica a lungo termine dipendente dall'attività, come il potenziamento a lungo termine (LTP), ampiamente ritenuto elemento chiave dell'apprendimento associativo e della memoria (Hansen et al., 2021; Nicoll, 2017).

Questi recettori permettono l'entrata degli ioni  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  e l'uscita di ioni  $K^+$  (Twomey & Sobolevsky, 2018).

I recettori **AMPA** sono complessi proteici eterotetramericici composti dalle subunità GluA1-4 responsabili della neurotrasmissione eccitatoria rapida e il loro principale ligando è il glutammato (Figura 2.6B) (Schverer et al., 2018). Questi recettori permettono l'entrata di  $\text{Na}^+$  e l'uscita di  $\text{K}^+$  (Twomey & Sobolevsky, 2018).

Questi recettori sostengono la neurotrasmissione **eccitatoria** attraverso l'entrata di ioni depolarizzanti aumentando così la probabilità che il neurone postsinaptico raggiunga la soglia di eccitabilità neuronale e generi un potenziale d'azione che permette la propagazione del segnale lungo i circuiti neuronali (Brunetti et al., 2024).

I recettori  **$\sigma 1$**  sono proteine chaperone residenti nel RE, distribuite in neuroni, endociti e oligodendrociti (Alonso et al., 2000). Sono costituiti da proteine lineari che hanno solo due domini transmembrana, con le sequenze C terminale e N terminale dallo stesso lato, o citosolico o extracellulare. Sono coinvolti nella modulazione del dolore: gli agonisti promuovono la nocicezione, gli antagonisti riducono l'iperalgia delle neuropatie. I recettori  $\sigma 1$  associati alle subunità dei recettori NMDA ne modulano la funzione: gli agonisti  $\sigma 1$  promuovono il legame di modulatori positivi degli NMDA, mentre gli antagonisti  $\sigma 1$  promuovono il legame di modulatori negativi degli NMDA (Figura 2.6A) (Rodríguez-Muñoz et al., 2015).

I recettori **GABA-A** mediano la trasmissione **inibitoria** rapida nel sistema nervoso centrale. Sono canali pentamerici composti da diverse subunità, tra cui la  $\alpha$  e la  $\beta$  che sono quelle coinvolte nel legame con gli agonisti che ne mediano l'attivazione (Schverer et al., 2018). Questi recettori attraverso il legame con il principale agonista, il GABA, permettono l'entrata di ioni  $\text{Cl}^-$  che causano l'iperpolarizzazione della membrana e quindi l'inibizione della scarica neuronale (Johnston, 2005).

È quindi possibile classificare i NS in due gruppi in base alla loro interazione con i recettori: NS inibitori e NS eccitatori.

I NS **inibitori** sono i modulatori positivi del recettore GABA-A quindi, grazie al potenziamento della trasmissione inibitoria gabaergica sono in grado di produrre effetti ansiolitici, riduzione dello stress, effetti antidepressivi e prosociali, senso di ricompensa e aumentare la libido. Tra gli altri effetti essi riducono la propensione all'aggressività e promuovono il sonno grazie ai loro effetti sedativi, possono inoltre avere effetti anestetici e analgesici, oltre ad effetti anticonvulsivanti, neurogenici e neuroprotettivi (Diviccaro et al., 2022; Zorumski et al., 2019).

I NS **eccitatori** comprendono i modulatori negativi dei recettori GABA-A, i modulatori positivi degli NMDA e gli agonisti dei recettori  $\sigma 1$ . Favoriscono quindi i processi cognitivi

e rafforzano la memoria, sono però ansiogeni e pro-convulsivanti, ma anche antidepressivi, neurogenici e neuroprotettivi (Morales-Lázaro et al., 2019).

Come mostra la Figura 2.6A, il **PS** è un NS eccitatorio, infatti legandosi alle subunità NR2A e NR2B del recettore NMDA aumenta la probabilità di apertura del canale aumentando così le correnti eccitatorie (Gibbs et al., 2006). Questi effetti sono dovuti sia alla diretta modulazione dei recettori NMDA sia alla loro modulazione indiretta attraverso il legame del PS col recettore  $\sigma 1$  (Monnet & Maurice, 2006). Il PS inoltre inibisce i recettori AMPA (Figura 2.6B) attraverso il legame con la porzione ammino-terminale della subunità GluA2 (Cameron et al., 2012), in modo da prevenire un'eccessiva eccitazione che potrebbe condurre a tossicità da glutammato (Huganir & Nicoll, 2013). Sui recettori GABA-A il PS ha un'azione inibitoria (Figura 2.6C), infatti riduce le correnti del cloro e aumenta la desensitizzazione del recettore (Shen et al., 2000) portando così ad effetti pro-convulsivanti (Kokate et al., 1999).

Il **DHEA** è un NS eccitatorio che, a differenza del PS, non agisce direttamente sui recettori NMDA ma ne potenzia l'attività attraverso il legame col recettore  $\sigma 1$  (Figura 2.6A) (Bergeron et al., 1996), mentre sui recettori GABA-A esercita una azione inibitoria che amplifica ulteriormente gli effetti eccitatori (Figura 2.6C) (Le Foll et al., 1997).

Il **DHEA-S** come mostrato in Figura 2.6B e 2.6C, agisce come il DHEA. Fa parte quindi dei NS eccitatori, in quanto si lega ai recettori  $\sigma 1$ , attraverso i quali potenzia indirettamente i recettori NMDA (Maurice et al., 2001), ed è un inibitore allosterico dei recettori GABA-A per cui amplifica gli effetti eccitatori indirettamente (Majewska et al., 1990).

L'**ALLO** è un NS inibitorio, infatti può sia potenziare l'affinità del GABA per il GABA-A sia attivare direttamente il recettore (Carver & Reddy, 2013). Questi due effetti sono dovuti all'interazione dell'ALLO su due siti di legame diversi: il sito di potenziamento che si trova nella subunità  $\alpha$  e il sito per l'attivazione diretta tra la subunità  $\alpha$  e la subunità  $\beta$  (Figura 2.6C) (Hosie et al., 2006). A concentrazioni nanomolari, l'ALLO aumenta la corrente al cloro potenziando l'effetto del GABA, quindi agisce solo se è presente l'agonista, mentre a concentrazioni micromolari e in assenza del GABA attiva direttamente il recettore GABA-A (Puia et al., 1990).

### 2.2.3. Pregnenolone solfato

Il pregnenolone solfato (PS) è un neurosteroido che deriva dalla solfonazione del PREG grazie agli enzimi sulfotransferasi SULT2A1, SULT2B1a e SULT2B1b mentre gli enzimi solfatasi (STS) lo riconvertono in PREG come mostra la Figura 2.7, nella quale vengono mostrati anche i recettori con cui interagisce e il relativo effetto (Harteneck, 2013a).

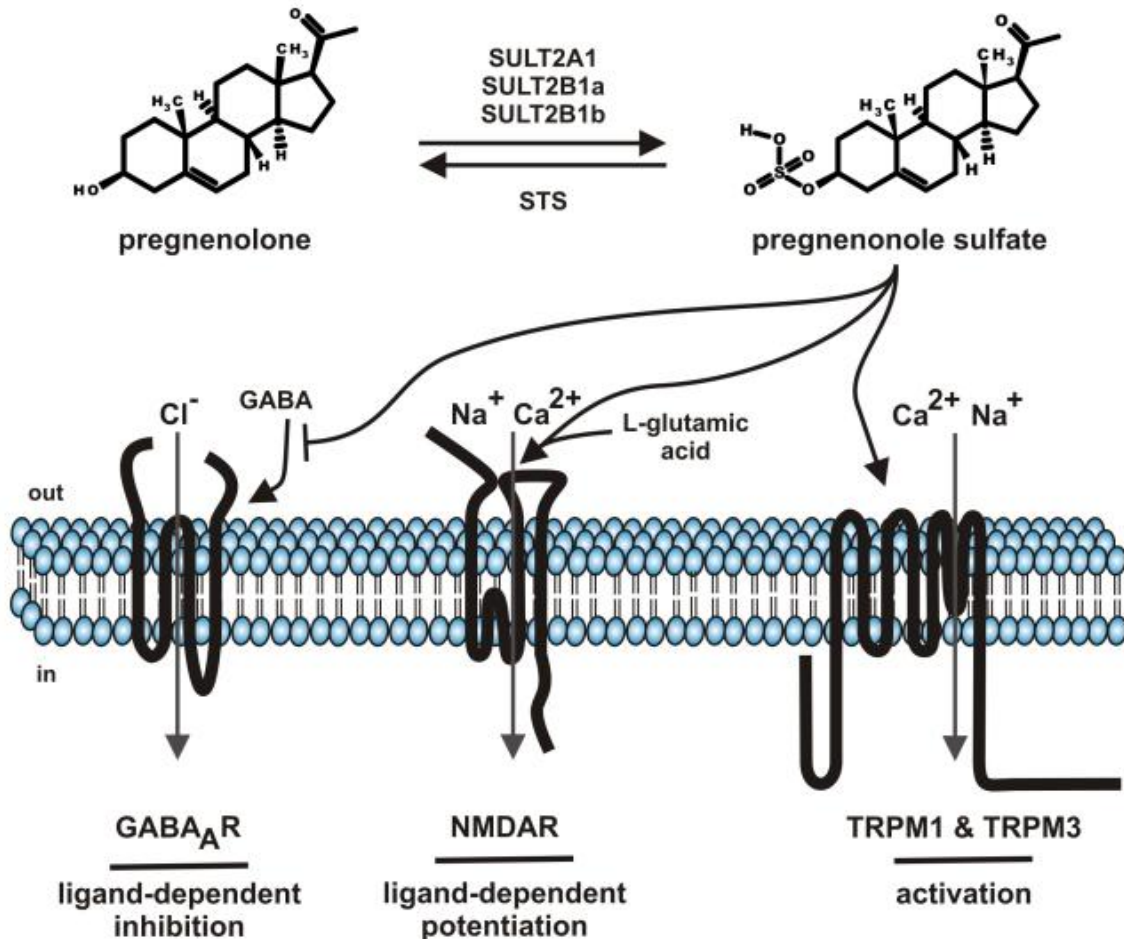


Figura 2.7: sintesi del PS e interazione con i suoi bersagli recettoriali (Harteneck, 2013a).

Il PS **inibisce il recettore GABA-A** inserendosi nel poro del canale, in questo modo blocca la corrente al cloro iperpolarizzante riducendo così la trasmissione inibitoria. Questo avviene quando il canale è attivato, ovvero aperto grazie al legame col GABA, per permettere al PS di inserirsi nel poro. Si chiama infatti “blocco del poro stato-dipendente” perché l’ostruzione del poro da parte del PS dipende dallo stato del canale (Fan et al., 2024).

Sui recettori **NMDA** esercita invece l’effetto opposto, ovvero un’azione di **potenziamento** ligando-dipendente per cui in presenza del legame NMDA-Glutammato è in grado di amplificare la trasmissione glutammatergica, agisce infatti come modulatore allosterico

positivo legandosi all'interfaccia tra le subunità GluN2B e GluN1 (Hrecka Krausova et al., 2020). Il PS amplifica la neurotrasmissione eccitatoria in due modi, uno rapido e uno lento. Il potenziamento rapido prodotto dal PS riguarda il gating del recettore: il PS è infatti in grado di aumentare la probabilità che il canale NMDA si apra favorendo così l'ingresso dello ione calcio; il potenziamento a insorgenza ritardata è invece dovuto alla sua capacità, a basse concentrazioni, di aumentare il trafficking dei recettori NMDA nel giro di alcuni minuti, aumentandone così la quantità esposta sulla membrana neuronale (Ratner et al., 2019). Grazie all'interazione con i recettori NMDA, il PS esercita effetti di potenziamento della memoria e delle funzioni cognitive che lo rendono un potenziale candidato terapeutico per l'Alzheimer e la schizofrenia (C. C. Smith et al., 2014a).

Il PS è inoltre in grado di **attivare** i canali melastatin-like (TRPM), in particolare i **TRPM1** e i **TRPM3**. Il legame tra PS e TRPM3 causa l'aumento di correnti cationiche, soprattutto dello ione calcio, che potenzia il rilascio di glutammato dalle cellule di Purkinje neonatali durante la formazione delle sinapsi glutammatergiche; l'espressione della TRPM3 è infatti associata all'attivazione dei neuroni nel cervello durante lo sviluppo. Il TRPM1 è invece espresso nelle cellule della retina e, siccome la retina può fare steroidogenesi, la sua attivazione dovuta al PS potrebbe causare effetti neurotossici retinici dovuti all'ingresso di calcio attraverso il TRPM1 (C. C. Smith et al., 2014a).

#### 2.2.4. Neuroinfiammazione e neurosteroidi

L'infiammazione è dovuta all'attivazione dell'immunità innata e inizia quando i Toll-like receptors (TLR) riconoscono frammenti molecolari provenienti da patogeni (PAMP) o molecole rilasciate in seguito a danno tissutale (DAMP). Il legame tra queste molecole e i TLR induce la dimerizzazione dei TLR e il reclutamento di proteine adattatrici, tra cui MyD88 e/o TRIF, assieme al TIRAP e TRAM, che fungono da ponte tra TLR e le chinasi che vengono così attivate. La via MyD88 attiva la cascata chinasi che porta all'attivazione di fattori di trascrizione, ovvero NF- $\kappa$ B e AP-1, i quali aumentano l'espressione genica delle citochine e dei mediatori pro-infiammatori. Contemporaneamente la via TRIF attiva TBK1 e i fattori IRF3/IRF7 che portano all'aumento dell'espressione genica degli interferoni di tipo I. Quindi, i TLR riconoscono la presenza di un patogeno o di danno cellulare da cui poi attivano la cascata molecolare che porta all'aumento della trascrizione di molecole pro-infiammatorie, le quali amplificano l'infiammazione (Kawasaki & Kawai, 2014) (Figura 2.8).

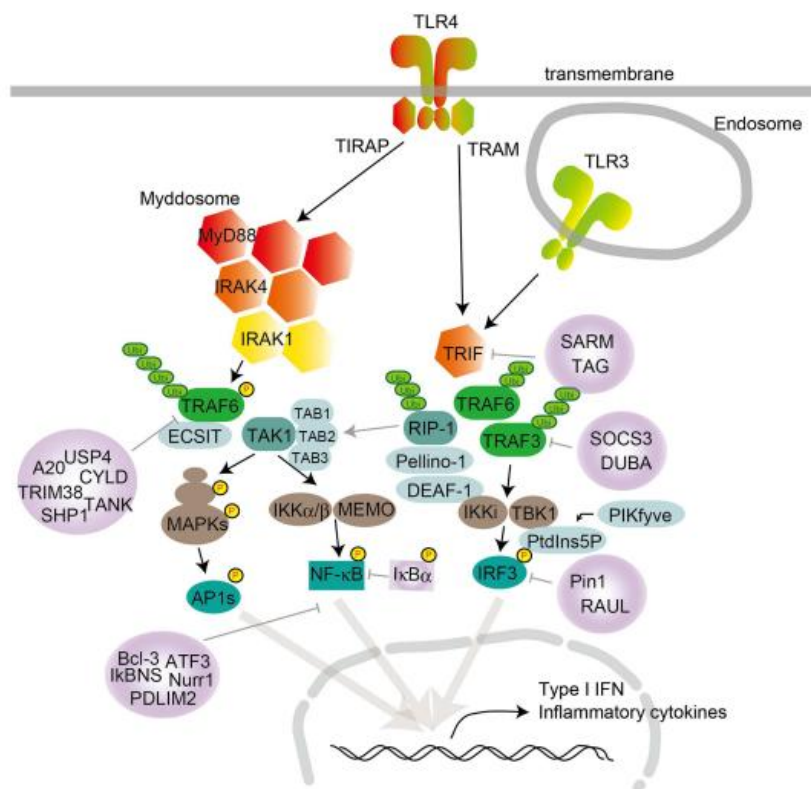


Figura 2.8: segnalazione dei TLR nelle cellule dendritiche convenzionali, nei macrofagi e nei fibroblasti embrionali murini (Kawasaki & Kawai, 2014).

Il PREG e i suoi derivati metabolici come PS, ALLO e DHEA, hanno dimostrato la capacità di migliorare la memoria e l'apprendimento, oltre a ridurre la depressione e modulare le funzioni cognitive del cervello (Vallée et al., 2001). Oltre a queste funzioni, hanno anche un ruolo neuroprotettivo in diverse patologie neuroinfiammatorie, tra cui l'Alzheimer, la Sclerosi Multipla, la schizofrenia, la depressione e l'autismo (Daugherty et al., 2013; Naylor et al., 2010; Vallée, 2016).

L'infiammazione causata da un'infezione batterica inizia dal riconoscimento dell'LPS dal recettore TLR4. È stato dimostrato che il trattamento con PS o ALLO induce una lieve degradazione del TIRAP della via MyD88 (Murugan et al., 2019). Dagli esperimenti condotti sui NS è emerso che PREG, PS e ALLO aumentano la degradazione del TLR (Murugan et al., 2019). L'ALLO è in grado di sopprimere la produzione di citochine pro-infiammatorie indotte dall'LPS nei macrofagi e nella microglia grazie ai suoi effetti antinfiammatori, infatti è stato dimostrato che l'ALLO induce la degradazione del TIRAP e del TLR2 riducendo così la secrezione di TNF e IL-6, mediata appunto dai TLR2 e TLR4, come mostrato in Figura 2.9 (Morrow et al., 2024).

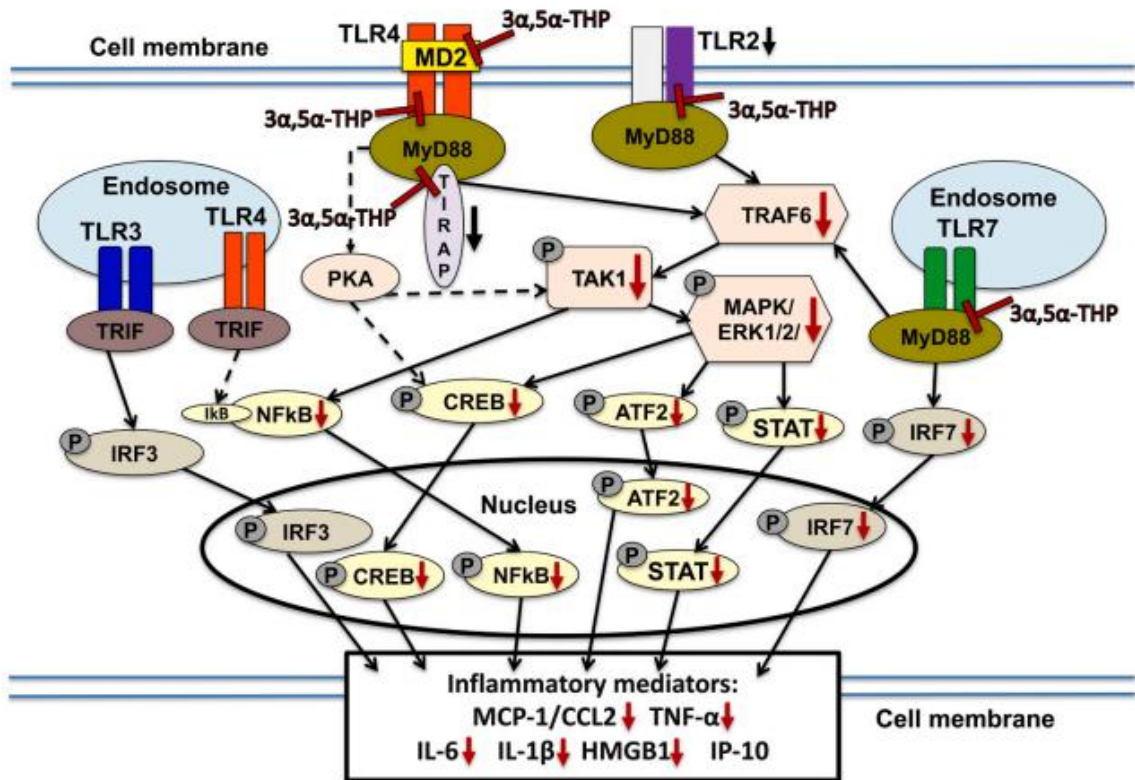


Figura 2.9: effetto antinfiammatorio dell'ALLO sulla cascata citochinica indotta dall'attivazione dei TLR (Morrow et al., 2024).

L'effetto antinfiammatorio mediato dall'ALLO è stato dimostrato anche dal PREG, sebbene al momento non sia ancora definitivamente chiaro quale sia il preciso meccanismo con cui riduca la neuroinfiammazione (Murugan et al., 2019). Degli studi hanno identificato dei bersagli non genomici del PREG tra cui la proteina associata ai microtubuli 2 (MAP-2) e la proteina linker citoplasmatica 170 (CLIP170) (Fontaine-Lenoir et al., 2006; Weng et al., 2013). Questa proteina inoltre svolge un ruolo nello sviluppo neuronale per cui un suo difetto è stato associato a disabilità intellettiva autosomica recessiva (Larti et al., 2015).

Dagli esperimenti condotti è quindi possibile ipotizzare che il PREG sia in grado di eliminare le molecole della via di segnalazione dei TLR attraverso la CLIP170 (Murugan et al., 2019). I NS sono considerati potenziali agenti terapeutici per i disturbi neuroinfiammatori in quanto sono in grado di modulare le risposte immunitarie del cervello (Yilmaz et al., 2019).

L'ALLO e il DHEA inibiscono il rilascio di citochine proinfiammatorie, in particolare l'ALLO riduce l'attivazione della microglia attraverso la soppressione del NF-κB e delle vie dell'inflammasoma NLRP3 (Yilmaz et al., 2019).

Il PS modula la segnalazione GABAergica e glutammatergica, contribuendo alla riduzione dell'infiammazione mediata dagli astrociti. PROG e DHEA limitano lo stress ossidativo

aumentando i livelli di superossido dismutasi (SOD) e del glutatione (GSH) che neutralizzano i radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Estradiolo e progesterone contribuiscono a ridurre l'infiltrazione leucocitaria e l'ingresso di citochine nel SNC (Yilmaz et al., 2019). In tessuti cerebrali di pazienti post-mortem è stata analizzata tramite PET la correlazione tra malattie neurodegenerative, neuroinfiammazione e aumento dell'espressione della proteina TSPO, la quale aumenta la sintesi di mediatori antinfiammatori e riduce quella dei pro-infiammatori. Probabilmente un suo aumento rappresenta una risposta dell'organismo per cercare di ridurre la neuroinfiammazione alla base della malattia neurodegenerativa (Angeloni et al., 2025b).

La TSPO oltre ad essere coinvolta nella regolazione della steroidogenesi e quindi nella sintesi dei NS (Papadopoulos et al., 2015), gioca un ruolo estremamente importante anche nella bioenergetica mitocondriale (Liu et al., 2017) e dell'omeostasi del calcio (Gatliff et al., 2017). È inoltre sovraespressa negli astrociti reattivi in risposta all'infiammazione (Lavisse et al., 2012).

Dal punto di vista terapeutico i ligandi della TSPO si sono dimostrati efficaci sia nel ridurre drasticamente il rilascio di fattori pro-infiammatori, sia nello stimolare il trasporto mitocondriale del colesterolo con conseguente aumento della steroidogenesi. Per questi motivi la TSPO potrebbe essere considerata uno strategico target terapeutico sia per le patologie in cui i livelli di neurosteroidi sono alterati, sia nelle patologie neurodegenerative associate alla neuroinfiammazione (Angeloni et al., 2025b).

L'etifoxina (ligando della TSPO) è attualmente utilizzata in Francia come ansiolitico; si conoscono i suoi potenti effetti antinfiammatori e si stanno studiando i potenziali effetti antidepressivi. Sono in corso di studio diversi ligandi della TSPO (Riebel et al., 2025a).

### 2.2.5. Neurosteroidi e Autismo

Le cause effettive dell'autismo sono ancora tutt'oggi in piena fase di studio, così come le possibili terapie.

In particolare, sono in corso degli studi sulla correlazione tra i NS e i NDDs, tra cui l'ASD, per cercare una correlazione dal punto di vista farmacologico con l'obiettivo di individuare possibili marker diagnostici e/o terapeutici (Baron-Cohen et al., 2020).

Uno dei motivi per cui i NS vengono considerati negli studi sull'autismo sta nella loro implicazione riguardo la regolazione dell'equilibrio eccitazione/inibizione (E/I) (capitolo 2.2.2).

Esistono infatti diversi studi che hanno evidenziato l'associazione tra l'alterazione dell'equilibrio E/I nel SNC e l'autismo, ma senza uniformità nelle conclusioni; infatti, ad esempio uno studio ha evidenziato una ridotta inibizione GABAergica nella regione perisilviana sinistra di bambini ASD (Rojas et al., 2014), mentre un altro studio ha registrato una riduzione del glutammato striatale in adulti ASD e nessuna alterazione del GABA (Horder et al., 2018). Purtroppo, l'ampia variabilità dei dati al momento disponibili non permette di stabilire la direzione dello squilibrio E/I.

Oltre agli studi sull'alterazione dell'equilibrio E/I in relazione all'autismo, sono presenti in letteratura esperimenti che hanno documentato la variazione nei livelli di NS in pazienti autistici.

In particolare, uno studio ha confrontato il plasma di bambine autistiche con quello di bambine sane (controlli) utilizzando la gas-cromatografia: nel plasma delle bambine (4-6 anni) ASD si sono trovati livelli di NS maggiori rispetto ai controlli, soprattutto per quanto riguarda i neurosteroidi solfatati, incluso il **PS** (Janskova et al., 2024), mentre in un altro studio è emerso che il PS nei bambini autistici risulta ridotto rispetto ai controlli (Janšáková et al., 2020a).

Modelli murini di autismo con diverse eziologie condividono la diminuzione dell'espressione dei recettori NMDA (Chau et al., 2017; Krueger et al., 2011; Martin et al., 2016; Martin & Manzoni, 2014; Peça et al., 2011; Schütt et al., 2009). Alla luce di queste evidenze, sono stati fatti diversi studi sulla somministrazione di agonisti del recettore NMDA, e in uno in particolare è stato testato il Zelquistinel, un modulatore allosterico positivo dei recettori NMDA che ha migliorato in modo duraturo i deficit comportamentali in diversi modelli murini ASD (Fonteneau et al., 2024). Anche il PS è un modulatore allosterico positivo dei recettori NMDA (F. S. Wu et al., 1991), in merito a questo fatto uno studio in vitro ha dimostrato che questo NS è in grado di ripristinare almeno in parte i deficit funzionali dei recettori NMDA causati da alcune varianti loss-of-function dei geni GRIN, comuni a diversi disturbi neuropsichiatrici (incluso l'autismo), rendendolo così un potenziale candidato farmacologico (Tang et al., 2020).

Per quanto riguarda l'**ALLO**, è stata documentata la sua carenza in caso di nascita pretermine, la quale infatti interrompe precocemente l'esposizione fetale a questo NS, con conseguenti alterazioni della sostanza bianca e disturbi del neurosviluppo tra cui l'autismo, per cui viene suggerita la somministrazione di ganaxolone (analogo sintetico dell'ALLO) come terapia sostitutiva (Shaw et al., 2019).

Altri studi hanno osservato che nei pazienti ASD i neurosteroidi **DHEA**, **testosterone** e **androstenedione** sono in eccesso (Wang et al., 2024). In particolare, l'esposizione a livelli elevati di testosterone durante la vita fetale è associata all'aumento dei tratti autistici (Auyeung et al., 2009).

#### 2.2.6. Potenziali effetti terapeutici dei neurosteroidi

L'aggressività è uno dei sintomi peggiori nei pazienti autistici, infatti si è sempre cercato di intervenire dal punto di vista comportamentale/psicologico, ma senza ottenere grandi risultati (Fung et al., 2014). Si è quindi resa necessaria una strategia farmacologica che però ad oggi è limitata all'uso di antipsicotici atipici come Risperidone e Aripiprazolo, i quali si sono infatti rivelati efficaci nella riduzione di irritabilità e aggressività (Fung et al., 2014).

L'idea del **PREG** come terapia contro l'autismo nasce dall'ipotesi dell'alterazione dell'equilibrio tra la trasmissione eccitatoria ed inibitoria del SNC, infatti in cervelli post-mortem di pazienti autistici ad alto funzionamento si è notata la riduzione dei recettori GABA- A (Fatemi et al., 2010). Modulare la trasmissione gabaergica può quindi ridurre l'irritabilità, infatti troppo poco GABA porta ad un calo della trasmissione inibitoria a livello del SNC e di conseguenza ad un aumento di quella eccitatoria che causa un aumento dell'irritabilità (Fung et al., 2014).

Il PREG viene prodotto dal colesterolo ed è anche il precursore di tutti gli altri NS, ma in particolare i prodotti più abbondanti sono PS e ALLO i quali sono coinvolti nel mantenimento del giusto equilibrio nel sistema E/I (Sripada, Marx, King, Rampton, et al., 2013).

Il PREG è meno potente nel ridurre l'irritabilità rispetto gli antipsicotici atipici; come integratore orale, si è rivelato moderatamente efficace e nel complesso sicuro e ben tollerato nei soggetti con disturbo dello spettro autistico, migliorando inoltre le capacità sociali e attenuando le anormalità sensoriali (Fung et al., 2014). Grazie alla sua tollerabilità, può essere un buon candidato rispetto ai farmaci attualmente usati per questi sintomi che invece hanno molti più effetti collaterali, inoltre al momento non esistono farmaci per trattare deficit sociali e sensoriali (Fung et al., 2014).

Uno studio ha dimostrato attraverso dei trial clinici che la somministrazione di **risperidone in associazione al PREG** in adolescenti ASD migliora l'irritabilità, l'iperattività e i comportamenti stereotipati rispetto alla sola somministrazione di risperidone (Ayatollahi et al., 2020). Precedenti studi avevano già confermato l'efficacia del PREG in altri disturbi

come ad esempio la schizofrenia, la depressione e l'ansia (Marx et al., 2009; Osuji et al., 2010).

L'effetto benefico del PREG si ottiene grazie alla sua conversione in ALLO e PS: il PS modula i recettori NMDA, i quali sono associati ad alterazioni neuronali nell'epilessia (Williamson et al., 2004) e nella schizofrenia (Kostakis et al., 2013); l'ALLO è un modulatore allosterico positivo dei recettori GABA-A, quindi potenziando questa neurotrasmissione produce effetti anticonvulsivanti (Dhir & Chopra, 2015) e ansiolitici (Bitran et al., s.d.).

Un'altra possibile via terapeutica è stata studiata attraverso la sintesi di un analogo sintetico dell'ALLO, il **ganaxolone**. Questo farmaco è attualmente in fase di sperimentazione per il trattamento di bambini con sindrome dell'*X Fragile*, una forma sindromica di disturbo dello spettro autistico, e sta mostrando risultati promettenti sulla componente sintomatica ansiosa e iperattiva (Ligsay et al., 2017).

### 2.3. Enzimi steroidogenici

Gli enzimi steroidogenici catalizzano le reazioni della steroidogenesi che portano alla produzione di diversi neurosteroidi, spiegata nel paragrafo 2.2.1. e illustrata in Figura 2.5 (Angeloni et al., 2025a).

Le due principali classi di enzimi sono la citocromo P450 (CYP) e la idrossisteroide-deidrogenasi (HSD) (Schiffer et al., 2019).

Gli enzimi **CYP** grazie al loro gruppo eme attivano l'ossigeno molecolare ( $O_2$ ) utilizzando il NADPH come donatore di elettroni: un atomo di ossigeno viene incorporato nel substrato mentre l'altro viene ridotto ad acqua, permettendo così diverse reazioni di idrossilazione e clivaggio dei legami C-C che avvengono durante la steroidogenesi (Guengerich, 2001; Guengerich & Yoshimoto, 2018). Questa classe è suddivisa in due gruppi, ovvero CYP di tipo I e CYP di tipo II: i CYP tipo I si trovano nella membrana mitocondriale interna e dipendono dalla ferredossina e ferredossina reduttasi, proteine che permettono il trasferimento di elettroni dal NADPH al CYP tipo I; i CYP tipo II invece si trovano nel RE e dipendono dal donatore di elettroni citocromo P450 ossidoreduttasi (POR) per il trasferimento degli elettroni (Lin et al., 1993; Yamada et al., 1995).

Gli enzimi **HSD** dipendono dai cofattori NAD(P)H e NAD(P)<sup>+</sup>, a loro volta si dividono in due superfamiglie di enzimi in base alla loro struttura: le deidrogenasi a catena corta e le aldo-cheto reduttasi (Penning, 1997). Entrambe le famiglie catalizzano la conversione di un

idrossisteroide al suo corrispettivo chetosteroide e viceversa, infatti la maggior parte delle reazioni che catalizzano sono reversibili, ad eccezione delle isoforme HSD3B, HSD3B1 e HSD3B2, che catalizzano reazioni irreversibili (Luu The Van et al., 1991; Thomas et al., 1995).

Il **P450c17** porta alla produzione del DHEA e il suo mRNA è stato rilevato nel cervello di ratto solo a partire da E19,5, mentre in ovaie e testicoli già da E15,5 (Compagnone et al., 1995). È presente sia in corteccia sia in ippocampo ad E19,5 ma nel ratto adulto solo in ippocampo, mentre nel cervelletto è presente sia in fase embrionale sia in età adulta (Compagnone et al., 1995a). Nel topo invece l'enzima è espresso sia in corteccia sia in ippocampo ad E18,5 ma solo in ippocampo a P0 e P7, nel cervelletto è espresso sia nell'embrione sia nel periodo neonatale (Compagnone et al., 1995b). Quindi in generale questo enzima è più espresso in fase embrionale rispetto al periodo postnatale.

La **5  $\alpha$ -reduttasi 1** catalizza la reazione che porta all'ALLO ed è stato rilevato il suo mRNA nel cervello di ratto, in particolare nella corteccia in fase embrionale il cui livello rimane costante a P7 ma poi cala in età adulta: questo suggerisce un ruolo trofico a livello corticale durante il neurosviluppo (Kimoto et al., 2010). Nell'ippocampo non è presente in fase embrionale, inizia a vedersi a P2, a P7 aumenta la sua espressione, a P14 inizia a diminuire e nell'adulto è poco espresso (Lauber & Lichtensteiger, 1996). In E18 questo enzima è particolarmente espresso e le femmine presentano livelli maggiori rispetto ai maschi (Spanic et al., 2015a). L'enzima è quindi particolarmente espresso in E18 e a P7.

La **3  $\alpha$ -HSD** produce l'ALLO ed è poco espresso nel cervello di topo a E18 e a differenza della 5  $\alpha$ -reduttasi non c'è differenza di espressione tra i maschi e le femmine (Spanic et al., 2015b); risulta molto espresso nel topo adulto (Agís-Balboa et al., 2006). Non ci sono dati per il periodo postnatale. Si può pertanto dedurre che l'enzima è più espresso nell'adulto.

L'enzima sulfotransferasi catalizza la solfonazione dei neurosteroidi, in particolare le isoforme che sono coinvolte nella solfonazione del PREG a PS sono il **SULT2B1a** che è espresso nel cervello durante tutti gli stadi dell'embrione murino, il **SULT2B1b** che invece è espresso nella pelle e il **SULT2A1** che invece è espresso nel fegato (Shimizu et al., 2003). Esistono studi su queste isoforme anche per quanto riguarda il cervello umano in cui è stata comprovata l'elevata espressione dell'isoforma **SULT2B1b** in particolare in ippocampo, corteccia e cervelletto (Salman et al., 2009).

## 2.4. Disturbi neuropsichiatrici e steroidogenesi

Le alterazioni dei NS e degli enzimi steroidogenici sono fortemente associate ai disturbi neuropsichiatrici e neurodegenerativi (Pinna & Bortolato, 2025).

Uno studio ha analizzato il comportamento di topi carenti di enzimi steroido-solfatasi: meno enzimi solfatasi implicano più NS solfatati, ovvero PREGS e DHEAS, i quali potenziano la neurotrasmissione eccitatoria. L'equilibrio E/I viene perso a favore di uno sbilancio verso l'eccitazione con conseguenti comportamenti **ADHD-like** (Trent et al., 2012a).

L'analisi di donne con **epilessia** refrattaria ai farmaci ha evidenziato che la somministrazione del contraccettivo orale medrossiprogesterone si è rivelata efficace grazie alla sua capacità di aumentare la sintesi di ALLO (Raciti et al., 2023).

Uno studio ha dimostrato che la carenza di ALLO e DHP, i quali regolano il cross talk tra neuroni e glia necessario per il mantenimento della mielina, è correlata alla demielinizzazione e quindi alla predisposizione della **sclerosi multipla** (Ghoumari et al., 2003). I NS sono stati studiati in caso di lesioni traumatiche, ischemia cerebrale, sclerosi multipla ed è stato evidenziato l'effetto trofico e neuroprotettivo di progesterone, DHEA, testosterone ed estradiolo in studi in vitro (Raciti et al., 2023).

Un disturbo psichiatrico ampiamente analizzato è la depressione, che dal punto di vista eziologico viene distinta in due categorie: la depressione post-partum e la depressione da infiammazione.

La **depressione post-partum** è dovuta ad una carenza di ALLO e quindi ad una minor attività della 5- $\alpha$ -R. in questo caso aumentare l'attività dell'enzima è utile per ottenere più ALLO e quindi potenziare la trasmissione gabaergica (Agis-Balboa et al., 2014).

Sono in corso degli studi per vedere se l'etifoxina, ligando della TSPO attualmente usata in Francia come ansiolitico, può avere anche effetti antidepressivi grazie al potenziamento, diretto o indiretto, della trasmissione Gabaergica. Utilizzare sostanze che promuovono la steroidogenesi anziché utilizzare gli steroidi stessi può rivelarsi utile per evitare gli effetti collaterali della somministrazione di neurosteroidi, ovvero sonnolenza, vertigini e mal di testa, a causa dei quali la loro somministrazione è limitata a 2 settimane. È già stato dimostrato che, in pz con depressione post-partum, i ligandi della proteina TSPO sono efficaci nel ridurre i sintomi depressivi (Riebel et al., 2025b).

Per studiare la **depressione da infiammazione** sono stati utilizzati modelli animali murini in cui è stato iniettato l'LPS, il quale ha causato l'aumento dei mediatori pro-infiammatori e la carenza di PREG con aumento della 5- $\alpha$ -R e di conseguenza un peggioramento dei sintomi

depressivi. In questo caso, siccome la causa della depressione è l'infiammazione, è meglio ridurre l'attività dell'enzima per preservare il PREG (che altrimenti verrebbe convertito in ALLO) in quanto ha effetti antinfiammatori e quindi riduce indirettamente i sintomi di questo tipo di depressione (Xu et al., 2023).

Sull'**ansia** sono stati fatti degli esperimenti per misurare l'espressione della proteina TSPO, la quale si è rivelata coinvolta nella regolazione dei sintomi ansiosi.

Lo studio ha evidenziato come l'interazione tra **etifoxina** (ETX) e TSPO sia responsabile di un effetto ansiolitico nelle femmine ad alta ansia innata (HAB) rispetto ai maschi in cui invece non c'è questo effetto ansiolitico marcato.

L'etifoxina legandosi alla TSPO aumenta i livelli di  $3\beta 5 \alpha$ -THDOC il quale è responsabile del miglioramento dell'ansia grazie all'interazione positiva coi recettori GabaA (Fischer et al., 2025).

Uno studio ha correlato l'alterazione della  $5\text{-}\alpha\text{-R}$  alla **schizofrenia** e ha dimostrato che questo enzima è coinvolto nelle vie dopaminergiche le quali, se sregolate, portano a comportamenti schizofrenici. L'inibizione della  $5\text{-}\alpha\text{-R}$  ha portato ad effetti antipsicotici e quindi ad un miglioramento dei sintomi schizofrenici (Devoto et al., 2012).

In generale, l'assenza o la ridotta concentrazione di NS durante il neurosviluppo potrebbe essere associata a vari disturbi neuropsichiatrici e dello sviluppo neurologico come disturbi d'ansia causata dalla carenza di ALLO, schizofrenia, epilessia causata dal calo di progesterone e quindi dalla carenza di ALLO in quanto suo prodotto, o Alzheimer caratterizzata da un calo rilevante degli estrogeni (Raciti et al., 2023).

## 2.5. Differenze tra maschi e femmine nell'autismo

Per dare delle spiegazioni alla notevole discrepanza nell'incidenza tra i maschi e le femmine (4:1), sono stati allestiti diversi studi che hanno permesso di formulare alcune ipotesi.

Innanzitutto, le donne hanno la capacità di "camuffare" meglio i sintomi dell'autismo rispetto ai maschi, infatti, si **mimetizzano** più facilmente con le altre persone della società. Inoltre, molte ragazze e donne autistiche non vengono riconosciute come pazienti ASD dal comune metodo diagnostico perché si basa in gran parte su studi condotti su uomini e ragazzi, infatti gli strumenti diagnostici sono più tarati per i maschi quindi spesso le donne non vengono diagnosticate ASD anche se lo sono (Cook et al., 2024).

È stato riscontrato che la carenza di **ALLO** è correlata a interessi specifici e comportamenti ripetitivi. I pazienti maschi che hanno livelli sierici di ALLO maggiori sono più simili alle

femmine autistiche relativamente alla capacità di mimetizzarsi: oggi l'ALLO è somministrato alle madri che soffrono di depressione post partum, ma alla luce degli studi relativi all'autismo, potrebbe essere una strategia terapeutica anche nel trattamento dei pazienti autistici per ridurre i comportamenti ripetitivi e stereotipati, oltre ad ansia e l'aggressività (Chew et al., 2021).

Un'altra teoria a sostegno della minor incidenza dell'autismo nelle donne è la **Female Protective Effect (FPE)**, ovvero l'Effetto Protettivo Femminile: le donne hanno una soglia più alta rispetto ai maschi perché non sono esse stesse fonte di testosterone, invece nei maschi sia il feto sia la madre sono fonti di testosterone, il quale aumenta il rischio di sviluppare ASD (Wigdor et al., 2022)

**L'Extreme Male Brain (EMB)**, Cervello Estremo Maschile, è l'ipotesi per cui dimensioni maggiori del cervello maschile autistico sono dovute a troppo testosterone (Van Eijk & Zietsch, 2021).

Anche la **genetica** gioca un ruolo importante: se il padre è in età avanzata aumenta il rischio genetico di sviluppare autismo (Berry et al., 2024). Femmine autistiche portano ad un aumento significativo che i propri fratelli siano autistici, in misura maggiore rispetto alle loro sorelle (Wigdor et al., 2022).

Gli studi di aneuploidia dimostrano che una maggiore quantità di **cromosoma Y** è associato a maggior rischio di sviluppare l'autismo; non ci sono effetti invece se aumenta la quantità di **cromosoma X**, il quale però, se diminuisce, la probabilità di sviluppare ASD è maggiore (Berry et al., 2024).

Uno studio condotto sui topi ha dimostrato che somministrando l'inibitore della 5 $\alpha$ -R (e quindi riducendo la produzione di ALLO), nei maschi si sono notati comportamenti ripetitivi e stereotipati, aumento di ansia e riduzione della socievolezza, a differenza delle femmine in cui non si sono notati questi effetti perché l'inibitore non ha causato la riduzione di **ALLO** nelle femmine. Questo perché probabilmente nelle femmine c'è una maggiore espressione dell'enzima 5  $\alpha$ -R oppure hanno una particolare resistenza all'inibitore grazie ad una via biosintetica alternativa per sintetizzare l'ALLO (Ebihara et al., 2017a).

Per quanto riguarda gli altri NS, sono risultati essere in eccesso anche **l'estradiolo** e il **DHEA** nei maschi ma non nelle femmine. In particolare è stato evidenziato che l'estradiolo nel liquido amniotico di progenie maschi risulta essere in eccesso: un aumento di estradiolo insieme ad un aumento di cortisolo si osserva in pazienti autistici con disabilità intellettiva

(ID) rispetto a quelli senza ID (Kosidou et al., 2024). Anche il DHEA è particolarmente elevato nei maschi autistici ma non nelle femmine autistiche (Wang et al., 2024).

Le femmine rispetto ai maschi perdono meno neuroni nel cervelletto durante la MIA quindi possono produrre più ALLO (M. Li et al., 2023). In fase embrionale le femmine hanno più enzima 5  $\alpha$ -R rispetto ai maschi, quindi possono compensare meglio la carenza di ALLO attraverso una maggiore biosintesi (Spanic et al., 2015c) e mostrano un maggior numero di neuroni che producono aromatasi (Wartenberg et al., 2021), infatti sono più protette dal rischio di sviluppare autismo: una carenza di aromatasi, enzimi coinvolti nella produzione di testosterone, può predisporre ad un aumento del rischio di sviluppare il disturbo dello spettro autistico attraverso l'aumento della biosintesi di testosterone (Symeonides et al., 2024).

## 2.6. La cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa per l'analisi dei neurosteroidi

La cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS) è la tecnica maggiormente utilizzata per la quantificazione di molecole steroidee in matrici biologiche (Makin et al., 2010). Il campione, una volta processato, attraversa le colonne cromatografiche a fase inversa (RP) C18, le quali consentono a molecole idrofobe, come i NS non coniugati ALLO DHEA, di essere efficacemente separate (Makin et al., 2010; McDonald et al., 2011). La GC è in realtà più efficiente della LC-MS poiché consente di ottenere una maggior risoluzione cromatografica; se però viene utilizzata una colonna con particelle di diametro più piccole (2 $\mu$ m), la pressione aumenta migliorando così la separazione degli analiti da parte della fase mobile Ultra High Performance Liquid Chromatography) (Keevil, 2013).

La LC-MS presenta tre interfacce di ionizzazione: electrospray ionization (ESI), atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) e atmospheric-pressure photoionization (APPI). La più comune per quantificare le molecole polari e i NS coniugati è la ESI (Keevil, 2013) (Figura 2.10).

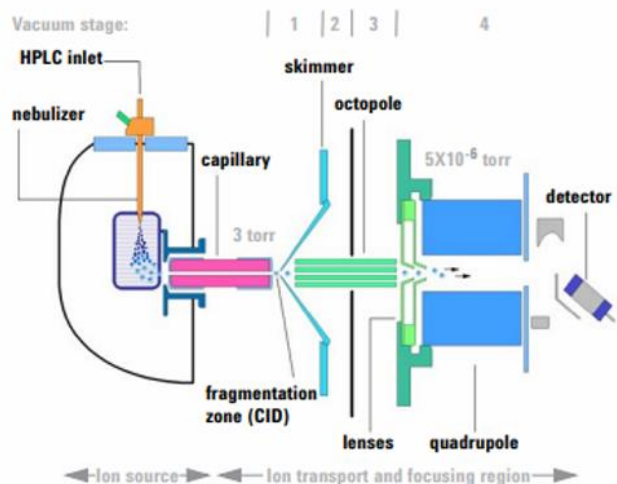


Figura 2.8: interfaccia di ionizzazione ESI (G1960-90104\_ChemStation\_ConceptsGuide.Pdf. [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1960-90104\\_ChemStation\\_ConceptsGuide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1960-90104_ChemStation_ConceptsGuide.pdf), s.d.)

L'ESI è un sistema di elettro-nebulizzazione che trasforma l'analita di interesse in particelle cariche. Il campione in soluzione, una volta avvenuta la separazione cromatografica, viene nebulizzato in micro-goccioline di fase mobile con all'interno l'analita. Nello stesso momento, un gas inerte ad alte temperature (azoto) causa l'evaporazione della fase mobile con conseguente riduzione delle dimensioni delle goccioline che porta le cariche superficiali a concentrarsi. La densità di carica, quindi, aumenta fino a superare il limite di Rayleigh, avviene l'esplosione Coulombiana e di conseguenza gli analiti vengono rilasciati in fase di vapore. L'analita sottoforma di vapore viene così attratto da un capillare tenuto sotto tensione che convoglia le particelle cariche verso l'octopolo, un sistema di focalizzazione che porta l'analita all'analizzatore di massa. Per migliorare l'efficienza della ionizzazione si può ricorrere a diverse strategie, come ad esempio la correzione del pH della fase mobile con l'aggiunta di acidi e basi, in modo da facilitare la formazione di addotti carichi che possono essere rilevati dallo spettrometro di massa (Bruins, 1998).

INS non coniugati presentano basse rese di ionizzazione in ESI e in APCI, per questo motivo vengono derivatizzati chimicamente in modo da ottenere un segnale più visibile e abbassare i limiti di quantificazione (Conklin & Knezevic, 2020). Il reagente più utilizzato per la derivatizzazione chimica è l'Ampliflex Keto Reagent Kit (Sigma-Aldrich).

Uno dei problemi nelle analisi con LC-MS è l'effetto matrice dovuto a molecole che co-eluiscono con gli analiti di interesse e causano un'alterazione del segnale, che può risultare amplificato o soppresso (Zhou et al., 2017).

Questo effetto matrice si può ridurre grazie all'estrazione in fase solida (SPE) che si effettua durante la preparazione del campione, fondamentale prima di passare alla LC-MS (Kaleta et al., 2021). Si tratta di una tecnica utilizzata per purificare e concentrare i campioni liquidi o estratti per migliorare la selettività e la qualità dell'analisi. In particolare, si sfruttano i principi della cromatografia a bassa pressione e si utilizzano dispositivi monouso, sottoforma di tubi dotati di cartucce SPE o cartucce corte, che contengono la fase stazionaria. Per eliminare efficacemente i fosfolipidi di membrana, si utilizzano le fasi stazionarie SPE 96-well plate che sono in grado di trattenere i fosfolipidi ma non gli analiti di interesse (HybridSPE®-Phospholipid Technology. <https://www.sigmaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/solid-phase-extraction/hybridspe-ppt>, s.d.).

Esistono due tipologie di analizzatori in base al tipo di separazione:

- Nello spazio: quadrupolo (Q), time of flight (TOF);
- Nel tempo: trappola ionica tridimensionale (3D trap), trappola ionica lineare (2D trap), Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR), orbitrap;

Per la quantificazione dei NS, il più utilizzato è il triplo quadrupolo (Stachniuk & Fornal, 2016).

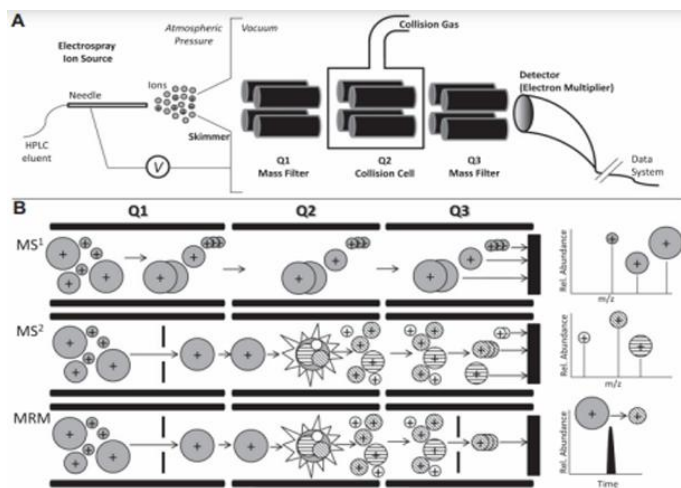


Figura 2.9: triplo quadrupolo accoppiato a interfaccia ESI (Wooding & Auchus, 2013).

Il triplo quadrupolo seleziona nel primo quadrupolo (Q1) lo ione precursore, nel secondo (Q2) lo frammenta e nel terzo (Q3) analizza i frammenti figli, cioè frammenti specifici dello ione precursore che ne forniscono le informazioni strutturali. I valori  $m/z$  di questi frammenti sono infatti direttamente correlati alla struttura dell'analita. Una delle modalità con cui si

lavora è la MRM (Multiple Reaction Monitoring), in cui vengono selezionati solo alcuni dei frammenti prodotti, che quindi permette di lavorare con più analiti contemporaneamente. Per la quantificazione dei NS questa è la tecnica più sfruttata, in quanto permette di effettuare analisi veloci, specifiche, automatiche ed è facile preparare il campione (Krone et al., 2010; Wudy et al., 2018).

### 3. SCOPO DELLO STUDIO

I neurosteroidi sono modulatori endogeni della funzione cerebrale i cui livelli cambiano significativamente durante lo sviluppo, in condizioni fisiologiche e patologiche (Maguire & Mody, 2009), inclusa l'infiammazione (Yilmaz et al., 2019). Influenzando l'eccitabilità neuronale, i NS possono alterare la maturazione delle sinapsi (Mellon, 2008a) e di conseguenza alterare la maturazione degli astrociti. Molti studi hanno evidenziato l'importanza dei NS (in particolare dell'ALLO) nella maturazione del SNC, infatti l'alterazione dei livelli di NS nel periodo neonatale, e in particolare nella prima settimana di vita, causa effetti a lungo termine sul comportamento ippocampo-dipendente e sull'elaborazione sensoriale (Darbra et al., 2014; Darbra & Pallarès, 2011).

Alla luce di queste premesse, ci si è posti l'obiettivo di analizzare come e quanto la MIA influenza i livelli di NS nel cervello della prole grazie ai seguenti esperimenti, in particolare se e come cambiano i livelli del PS in corteccia, ippocampo, striato e cervelletto della prole controllo e MIA di modelli murini in diversi momenti dello sviluppo cerebrale (E18, P7, P14 e P28).

### 4. MATERIALI E METODI

#### 4.1. Animali

In questo studio sono stati utilizzati animali wild type (WT) C57BL/6 J, acquistati da "The Jackson Laboratory". Le colonie sono state ospitate all'interno del BioStab presso l'Università di Modena e Reggio Emilia, in un ambiente controllato (stanza climatizzata, temperatura costante  $21 \pm 1$  °C, 50% di umidità) e un ciclo di luce/buio di 12 ore. Gli animali sono stati trattati secondo le norme vigenti definite dall'Organismo Preposto al benessere dell'Animale (OPBA) e dalle direttive del Consiglio delle Comunità Europee (2010/63/UE).

## 4.2. Allestimento del modello MIA

Il protocollo prevede che la femmina destinata al modello MIA, dopo l'accoppiamento, riceva un'iniezione intraperitoneale di soluzione salina (NaCl 0,9% S.AL.F S.p.a), LPS per mimare l'infezione batterica, o Poly [I:C] per mimare l'infezione virale. Il trattamento con immunogeni, gentilmente donati da Elisabetta Menna (CNR, Humanitas, Milan), stimola il processo infiammatorio nella madre generando una prole con anomalie del comportamento.

La procedura inizia con l'accoppiamento per il quale è necessario seguire diverse fasi:

- Giorno 1: la lettiera del maschio viene in parte spostata nella lettiera della femmina;
- Giorno 2: il maschio viene posto nella stessa gabbia della femmina per l'accoppiamento;
- Giorno 3: si verifica l'avvenuto accoppiamento attraverso il controllo del plug vaginale. Tuttavia, la presenza del tappo non garantisce la gravidanza;

Una volta avvenuto l'accoppiamento, al 15° giorno di gravidanza (GD15) la madre riceve un'iniezione intraperitoneale con soluzione salina, Poly[I:C] (20 mg/ Kg) o LPS (120 ug/Kg). La prole viene poi prelevata a tre età sperimentali: post-natale 7 (P7), post-natale 14 (P14) e post-natale 28 (P28). Ippocampo e corteccia dei topi trattati in fase embrionale (E18) ci sono stati gentilmente donati da Elisabetta Menna (CNR, Humanitas, Milan).

I topi, dopo anestesia per inalazione di isofluorano (marchio) vengono decapitati. I cervelli vengono rimossi dal cranio e successivamente lavati con una soluzione PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich). La dissezione viene eseguita su piastra di vetro refrigerata in modo preservare i tessuti e isolare così le aree cerebrali di interesse. I campioni di corteccia, ippocampo, cervelletto e striato sono stati raccolti, pesati e conservati a -80°C.

Le fasi dell'allestimento del modello MIA sono schematizzate in Figura 4.1.

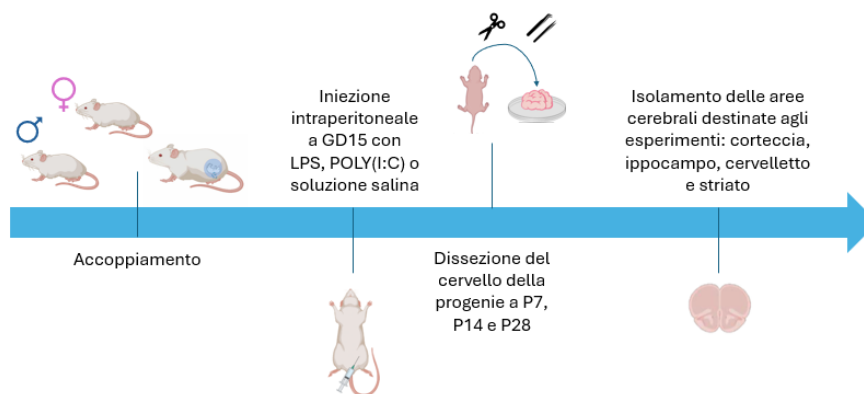


Figura 4.1: schema delle fasi per l'allestimento del modello MIA.

### 4.3. Sample processing

Il primo step consiste nella preparazione dello **standard interno** (IS). Lo standard interno è un composto con una struttura chimica simile all'analita di interesse marcato con isotopi stabili come  $^2\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . L'IS marcato viene aggiunto sia ai calibranti che al campione, permettendo di normalizzare eventuali perdite che si possono verificare durante l'analisi. Gli standard interni isotopici sono largamente utilizzati ma presentano diversi svantaggi: sono più costosi, difficili da preparare, non sempre presenti sul mercato e durante l'analisi possono presentare delle discrepanze nei risultati. In generale, gli standard interni deuterati sono quelli più utilizzati, nonostante durante le analisi abbiano dato problemi con i tempi di ritenzione.

Lo standard utilizzato è il **PS deuterato** (PS-IS): viene acquistato come polvere (marca) e disciolto in metanolo per ottenere la soluzione madre. Attraverso diluizioni successive, si preparano soluzioni di PS-IS a concentrazioni differenti, seguendo il seguente schema:

- PS\_IS madre: concentrazione 100 ug/ml (1 mg polvere + 10 ml MeOH)
- PS-IS\_1: concentrazione 10.0 ug/ml (1:10 della madre)
- PS-IS\_2: concentrazione 1.0 ug/ml (Dil 1:10 di PS-IS\_1)
- PS-IS\_3: concentrazione 100 ng/ml (Dil 1:10 di PS-IS\_2)
- PS-IS\_4: concentrazione 10 ng/ml (Dil 1:10 di PS-IS\_3)

Dopo la preparazione dello standard, si procede al processamento dei campioni che viene eseguito in due giornate.

GIORNO 1:

- Sotto cappa viene preparata la **soluzione deproteinizzante**, composta da: acetonitrile (ACN for HPLC 34851, Sigma-Aldrich) 70%, acido formico (FA, F0507, Sigma-Aldrich) 1% e metanolo (MeOH, 179337, Sigma Aldrich) 30%. Una falcon da 50 mL è stata preparata aggiungendo a 35 mL di ACN, 15 mL di MeOH e 0,5 mL di FA. A causa dell'elevata volatilità dell'acido formico, la soluzione deve essere preparata ad ogni esperimento, non è pertanto possibile conservarla per successivi esperimenti;
- Viene calcolato per ogni campione la quantità di soluzione deproteinizzante da aggiungere, utilizzando la seguente formula:
  - **Corteccia e cervelletto** → 800 mg di tessuto:  $7\text{mL} = \text{mg pesati} : x(\text{mL})$
  - **Ippocampo e striato** → 100 mg:  $2\text{mL} = \text{mg pesati} : x(\text{mL})$

- Se la quantità di campione è minore di 25 mg si aggiungono 500 ul di soluzione deproteinizzante indipendentemente dal peso;
- Per ogni campione, si aggiungono 100 ul di standard interno **PS-IS\_4**, accertandosi di entrare in contatto con la soluzione deproteinizzante, in modo da evitare perdite di standard sulle pareti ed essere sicuri di avere una quantità esatta nel campione;
  - Una volta preparati i campioni si procede con la **sonicazione**. Il sonicatore (B.Braun Labsonic® U, Biotech International) mostrato in Figura 4.2, omogeneizza il campione mediante ultrasuoni. L'operazione deve essere eseguita per qualche minuto, mantenendo costantemente in freddo il campione grazie al becher con ghiaccio, finché la soluzione non diventa lattescente. Tra un campione e l'altro la sonda deve essere lavata con acqua distillata;

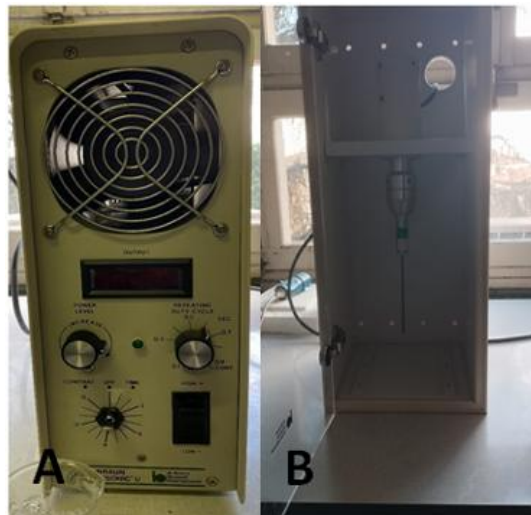


Figura 4.2: nella Figura A sono mostrati i parametri da impostare; nella Figura B come si presenta il sonicatore.

- Dopo la sonicazione, il liquido formato viene posto in **centrifuga** per 10 minuti, a 11.000 rpm ad una temperatura di 4°C, in modo da garantire la separazione del pellet (scarto) dal surnatante (frazione di interesse) (Figura 4.3)

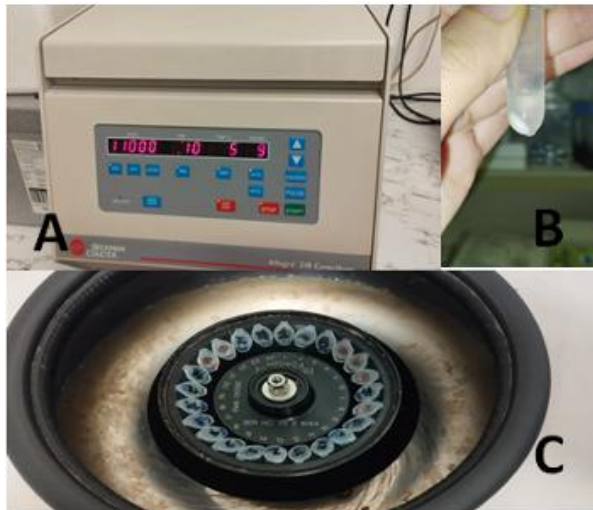


Figura 4.3: la Figura A mostra i parametri da impostare nella centrifuga; la Figura B mostra la divisione del pellet dal surnatante post-centrifugazione; la Figura C mostra invece l'interno della centrifuga con i campioni inseriti.

- Il surnatante viene prelevato e trasferito in una nuova eppendorf (volume massimo da prelevare 1,5 mL). I campioni vengono conservati over-night a  $-20^{\circ}\text{C}$ ;

#### GIORNO 2:

- I campioni posti nuovamente in **centrifuga** per 10 minuti, a 15.000 rpm e alla temperatura di  $4^{\circ}\text{C}$ , in modo da allontanare eventuale pellet rimasto nel surnatante;
- Si procede con l'**estrazione in fase solida** (SPE). Essa si può avvalere o di un dispositivo sottovuoto (Vacuum Manifold) o di un dispositivo che lavora sotto pressione positiva (Positive Pressure Manifold). Il Vacuum Manifold, il più utilizzato fra i due citati, è dotato di un coperchio sulla cui superficie vengono montate le singole colonnine. All'estremità inferiore è presente un alloggiamento per gli aghi, sotto i quali vengono posizionate le eppendorf per la raccolta del campione. Sul supporto è presente un rubinetto di sfiato, necessario per il mantenimento del vuoto all'interno della camera. Al momento del riposizionamento del supporto è necessario posizionare gli aghi in corrispondenza delle eppendorf;

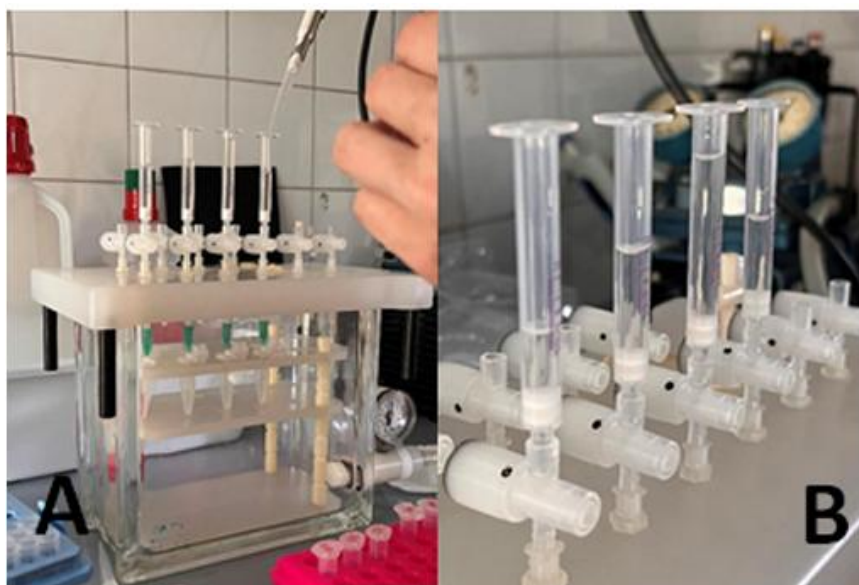
Si montano le colonnine (Phree Phospholipid removal Products, Phenomenex) sui rubinetti e si accende la pompa da vuoto. Le colonnine si presentano come dei tubi alla cui estremità inferiore è impaccata la fase stazionaria, tipicamente C-18 (Figura 4.4).

Si attende che il vuoto arrivi al massimo (il manometro deve segnare 50 Pa) e con lo sfiato laterale si regola la pressione, che deve essere compresa tra 40 e 50 Pa;

Per ciascuna colonnina viene aggiunto un volume massimo di campione pari a 2 mL. A questo punto si aprono i rubinetti lentamente facendo attenzione a regolare il flusso, verificando che il liquido bagni dapprima il filtro. È fondamentale regolare il flusso durante l'intera operazione: il liquido deve scendere goccia a goccia per garantire una corretta purificazione. Per garantire una eluizione appropriata (né troppo veloce, né troppo lenta), il numero di colonnine da montare contemporaneamente è di massimo quattro. Dopo la prima colonnina, si può passare alla successiva;

Quando tutto il liquido è stato eluito, si apre completamente il rubinetto per qualche secondo e si chiude nuovamente. A questo punto si spegne la pompa, si chiude la valvola del vuoto e dal supporto vengono smontati rubinetti, colonnine e aghi. Questo passaggio permette di prelevare i campioni e conservarli a  $-20^{\circ}\text{C}$ ;

Ciascun elemento del manifold viene lavato (supporto, rubinetti e aghi) con una soluzione al 50% di MeOH e 50% di acqua. Dopo averli accuratamente asciugati si può ricominciare con l'analisi.



*Figura 4.4: la Figura A mostra il momento in cui vengono caricati i campioni all'interno delle colonnine, mentre la Figura B mostra le colonnine caricate coi campioni pronte per iniziare l'eluizione.*

- Dopo aver purificato tutti i campioni, si procede portandoli a secco mediante lo SpeedVac (Savant SpeedVac® DNA110-230) (Figura 4.5)



Figura 4.5: nell'immagine A viene mostrato come si presenta lo SpeedVac all'interno; immagine B mostra i parametri da impostare.

Questo strumento, combinando la forza centrifuga, il calore controllato e il vuoto, permette di concentrare il campione e prepararlo alle analisi successive. Si posizionano le eppendorf nei singoli alloggiamenti e si imposta la temperatura in base alle condizioni sperimentali. La procedura termina quando all'interno delle eppendorf non è presente più il liquido e quindi risulta concentrato.

#### 4.4. Cromatografia liquida e Spettrometria di Massa

Il giorno dell'analisi si preparano i calibranti. I calibranti (Cal) sono una serie di soluzioni a concentrazione nota di analita, utilizzate per costruire la curva di calibrazione, la quale correla il segnale rilevato dal LC-MS/MS con la concentrazione del campione. Grazie a questa curva è possibile determinare con precisione la concentrazione di neurosteroidi nei campioni analizzati, garantendo così un'analisi quantitativa accurata e affidabile.

Si parte dal PS madre (720 ug/ml) e per diluizioni successive si ottiene il PS\_4 secondo questo schema:

- PS\_1 → diluizione 1:10 per ottenere concentrazione 72 ug/ml (900ul MeOH+100 ul soluzione madre)
- PS\_2 → diluizione 1:10 per ottenere concentrazione 7.2 ug/mL (900 ul MeOH+100 ul PS 1)
- PS\_3 → diluizione 1:5 per ottenere concentrazione 1440 ng/mL (800 ul MeOH+100ul PS 2)

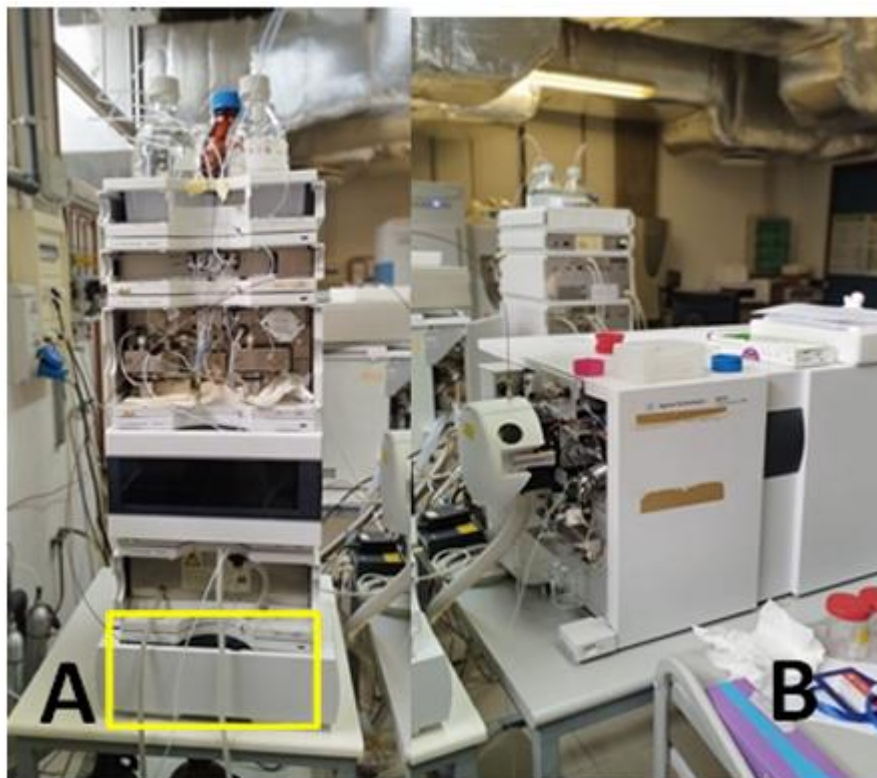
- PS\_4 → diluizione 1:10 per ottenere concentrazione 144 ng/mL (900 ul MeOH+100 ul PS 3)

Dal più diluito PS\_4 si parte per ottenere i calibranti con una diluizione 1:2, 500 ul di MeOH e 500 ul del calibrante precedente.

- Cal I: 144 ng/ml (PS\_4 ha già questa concentrazione, prelevare senza diluire ulteriormente)
- Cal H: 72 ng/ml (Dil 1:2 di Cal I)
- Cal G: 36 ng/ml (Dil 1:2 di Cal H)
- Cal F: 18 ng/ml (Dil 1:2 di Cal G)
- Cal E: 9 ng/ml (Dil 1:2 di Cal F)
- Cal D: 4,5 ng/ml (Dil 1:2 di Cal E)
- Cal C: 2,25 ng/ml (Dil 1:2 di Cal D)
- Cal B: 1,125 ng/ml (Dil 1:2 di Cal C)
- Cal A: 0,56 ng/ml (Dil 1:2 di Cal B)

Dopo aver preparato tutti i calibranti si prelevano 200 ul e, in un'altra eppendorf, si aggiungono 20 ul di standard interno deuterato PS-IS\_3 (che è concentrato 100 ng/ml e si diluisce 1:10 per ottenere una concentrazione di 10 ng/ml).

Dopo la preparazione dei calibranti, si analizzano i campioni allo spettrometro di massa (6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies) presso il Centro Grandi Strumenti (CIGS, Università di Modena e Reggio Emilia). L'interfaccia di ionizzazione scelta è in ESI (Agilent, Waldbronn, Germania); lo strumento è rappresentato in Figura 4.6.



*Figura 4.6: nella Figura A è rappresentato il l'HPLC, in basso è situata la colonna cromatografica (riquadro in giallo); nella Figura B è rappresentato l'analizzatore di massa.*

Prima di trasferire i calibranti nei vial per HPLC (AR0-3930-12 Phenomenex), il contenuto viene “vortexato” per assicurare una completa ri-sospensione dello standard e una distribuzione uniforme della sua concentrazione all'interno della soluzione. Vengono preparati anche i “blank” (blk) e i “wash”. I blank sono soluzioni che non contengono l'analita di interesse e vengono utilizzati per verificare l'assenza di contaminazioni tra un campione e l'altro o interferenze strumentali, contengono lo standard interno deuterato alla stessa concentrazione dei campioni e dei calibranti disciolto in MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30). I wash servono per pulire la colonna cromatografica tra un set di campioni e l'altro e sono costituiti da una miscela di isopropanolo e acqua.

I campioni, previa ri-sospensione con soluzione di MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30), vengono “vortexati” per qualche minuto e centrifugati per 5 minuti a 13.000 rpm. Questo passaggio, similmente ai calibranti, serve per uniformare il contenuto. A questo punto è possibile trasferire 100 ul di campione nei vial da HPLC.

I campioni e i calibranti sono pronti per essere analizzati. Vengono inseriti in un apposito supporto presente all'interno della macchina, costituito da diversi alloggiamenti, ognuno dei quali è identificato da un numero e una lettera precisa. Vengono inseriti, in fila, prima i

calibranti e poi i campioni. Si monta la colonna cromatografica (Phenomenex) (Figura 4.7) C-18 e si assicura un volume adeguato di fase mobile (FM) all'interno dei reservoir presenti al di sopra della macchina.



*Figura 4.7: colonna cromatografica.*

La FM scelta è acqua+acido formico 0,1% (A) e metanolo+acido formico 0,1% (B), utilizzando il seguente programma di gradiente: da 0 a 1 min, isocratico al 45% (B); da 1 a 8,5 min, gradiente lineare dal 45% all'85% (B); Da 8,5 a 10 min, gradiente lineare dall'85% al 100% (B); da 10 a 15 min, isocratico al 100% (B), da 15 a 16 min, gradiente lineare dal 100% al 45% (B). Dopo aver impostato la macchina, si seleziona la worklist (WL). La worklist è una sequenza predefinita di campioni, standard, blank e controlli che viene caricata nel software dello strumento per l'analisi in HPLC (Agilent MassHunter Workstation Acquisition versione B.05.00 (B2043).

La lista è stata settata nel seguente modo:

- blank;
- wash;
- calibranti, dal meno concentrato al più concentrato;
- campioni in ordine progressivo. Tra un set di 5 campioni viene inserito un blank e un wash;

Possono essere analizzati in duplicato o triplicato, in base al numero di campioni da analizzare, avendo cura di modificare l'ordine della WL. L'analisi in ordine casuale riduce il rischio di un'eventuale bias analitico, evitando eventuali variazioni sistematiche (come contaminazioni o instabilità dello strumento). Dopo aver settato la WL si fa partire la macchina: vengono selezionati i singoli elementi della lista e ognuno di questi viene analizzato in 20 minuti. La durata totale dell'analisi dipende dal numero di campioni da analizzare (20 min x num di campioni da analizzare).

Conclusa l'analisi si smonta la colonna cromatografica e si prelevano i vial dal supporto. Quest'ultimi possono essere riutilizzati per una successiva analisi, previo lavaggio con acqua distillata.

#### 4.5. Analisi dei dati

L'analisi dei dati ottenuti viene effettuata su **Agilent MassHunter Quantitative Analysis** accoppiato ad **Agilent MassHunter Qualitative Analysis**. Il sistema, dopo aver importato i dati e delineato un metodo per l'analisi, trasforma il segnale registrato dalla macchina in una serie di picchi. I calibranti sono necessari alla costruzione della curva di calibrazione (Figura 4.8). La curva di calibrazione segue un modello matematico (spesso lineare o quadratico) per determinare la relazione tra segnale e concentrazione, in modo da quantificare l'analita di interesse.

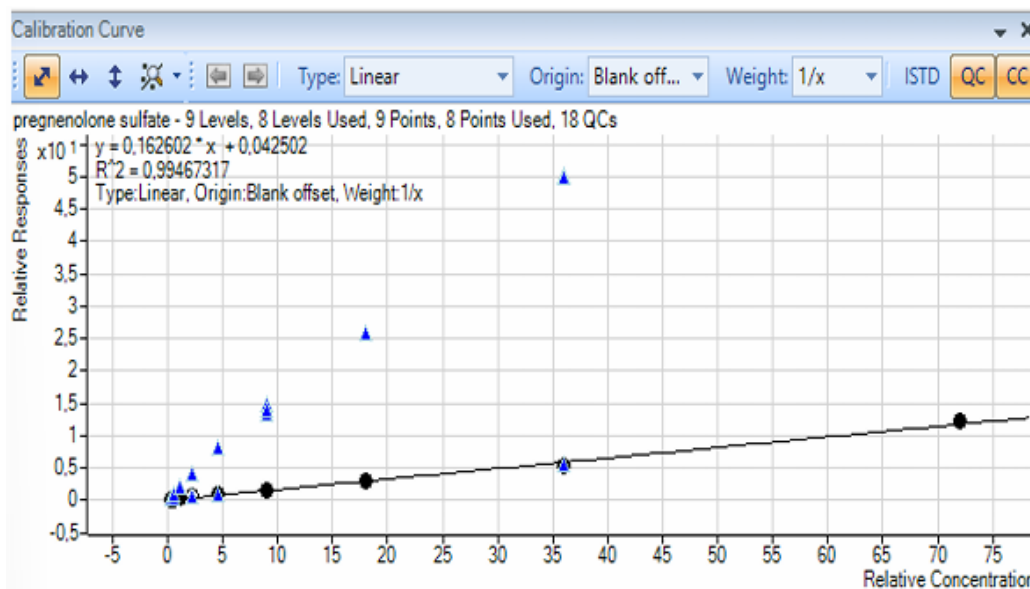


Figura 4.8: esempio di una curva di calibrazione. La bontà della curva è delineata dal valore di  $R^2 = 0,99$  il quale indica che la relazione tra segnale e concentrazione è molto precisa.

L'area sottesa dalla curva del picco corrisponde alla quantità di analita presente nel campione (concentrazione espressa in ng/ml). Più il picco è alto e stretto più il valore è preciso e reale.

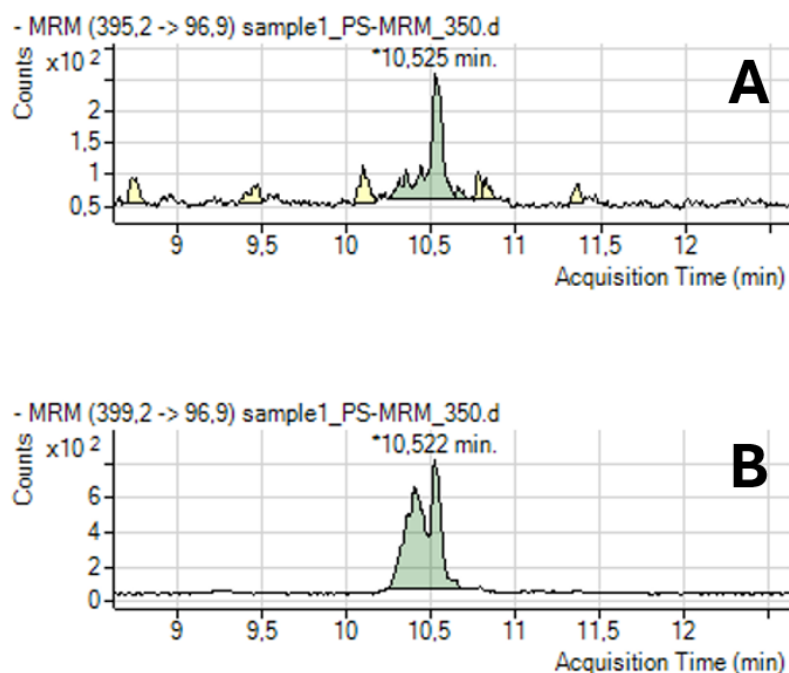


Figura 4.9: rappresentazione grafica dei picchi analizzati con il software. Nella Figura A è rappresentato il picco relativo al PS presente nel campione (analita), nella Figura B il picco corrisponde allo standard interno del PS deuterato.

Come mostrato in Figura 4.9 è necessario integrare il picco in maniera adeguata, questo è possibile tenendo conto del tempo di ritenzione (RT). Il tempo di ritenzione è il tempo che ogni analita impiega per attraversare il sistema cromatografico ed arrivare al rivelatore. Questo parametro permette di identificare un composto confrontandolo con uno standard di riferimento. Essendo il deuterato strutturalmente simile al PS presente nel campione, questi usciranno dalla colonna con un tempo di ritenzione simile, permettendo così di identificare bene il picco dell'analita. L'area del picco del campione viene quindi integrata tenendo conto del tempo di ritenzione dello standard di riferimento, in modo da essere sicuri di integrare il picco che corrisponde all'analita di interesse.

Qualora il campione fosse sporco o i picchi non fossero così delineati, oltre al RT, si procede con un confronto tra i cromatogrammi dei campioni con i rispettivi controlli di qualità, tramite l'utilizzo del software qualitativo, il quale consente, mediante sovrapposizione dei picchi, di capire quale porzione integrare. Questa operazione viene ripetuta per tutti i campioni ed eventuali replicati.

Infine, i dati ottenuti, che misurano le quantità di PS in ng/mL, vengono moltiplicati per il fattore di diluizione utilizzato (0,1) e divisi per i mg di tessuto corrispondenti. Il dato finale è espresso in ng di PS per mg di tessuto.

I grafici sono stati creati mediante il software GraphPad Prism 8 e per l'analisi statistica è stato effettuato il T-test a due campioni (T-test, unpaired) in modo da stabilire la significatività ( $p < 0,05$ ) dei dati ottenuti. Sono stati confrontati i valori medi di PS in ippocampo e corteccia a E18, P7, P14 e P28, nel cervelletto a P7 e P14 e nello striato a P7.

## 5. RISULTATI

Il pregnenolone solfato (PS) è stato quantificato mediante la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa in triplo quadrupolo. Sono state analizzate diverse aree cerebrali in topi maschi e femmine di diverse età.

La concentrazione del neurosteroido è espressa in ng di PS per mg di tessuto.

Per topi MIA-LPS si intende la prole delle madri trattate con LPS in gravidanza.

Per topi MIA-POLY[I:C] si intende la prole delle madri trattate con POLY[I:C] in gravidanza.

### 5.1.1. Confronto dei livelli di PS nella prole di madri trattate e non trattate a E18, P7, P14, P28 in ippocampo e corteccia

In questo esperimento sono state analizzate due aree cerebrali: l'ippocampo e la corteccia. In ippocampo sono stati ottenuti risultati migliori, con variazioni significative tra controlli e trattati, mentre in corteccia le differenze tra controlli e trattati sono meno marcate.

L'analisi è stata condotta su modelli murini in fase embrionale (E18), post-natale (P7 e P14) e al termine dello sviluppo cerebrale (P28), allo scopo di valutare l'andamento della concentrazione del neurosteroido durante il neurosviluppo.

Il valore medio di PS allo stadio embrionale (E18) nell'ippocampo dei topi MIA-POLY[I:C] è significativamente più basso ( $p \leq 0,01$ ) rispetto al valore medio nei controlli ( $0,01 \pm 0,0022$  vs  $0,0269 \pm 0,0002$ ); nella stessa area cerebrale dei topi MIA-LPS non sono state registrate variazioni significative di PS ( $0,0412 \pm 0,0088$  vs  $0,0269 \pm 0,0002$ ) rispetto ai controlli. Nella corteccia, in questa stessa fase dello sviluppo, non si sono registrate differenze significative né tra i topi MIA-LPS e i controlli ( $0,0125 \pm 0,0041$  vs  $0,0241 \pm 0,0067$ ), né tra i topi MIA-POLY[I:C] e i controlli ( $0,0115 \pm 0,0027$  vs  $0,0241 \pm 0,0067$ ).

I relativi grafici sono illustrati in Figura 5.1.

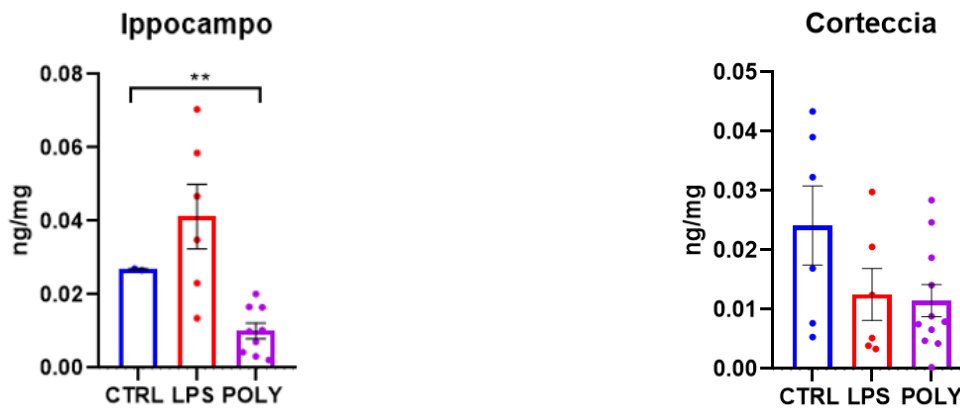


Figura 5.1: concentrazione di PS (ng/mg) in ippocampo e corteccia di topi allo stadio embrionale E18; le colonne rappresentano il valore medio  $\pm$  SEM (errore standard della media) ed i punti rappresentano i valori dei singoli esperimenti.

CTRL = topi controllo;

LPS, POLY[I:C] = topi alla cui madre è stato iniettato LPS o POLY[I:C]

Gli asterischi rappresentano le differenze significative ( $*p \leq 0,01$  T-test, unpaired) tra i gruppi.

Nell'ippocampo di topi MIA-LPS in fase post-natale P7, il PS è significativamente elevato ( $p \leq 0,05$ ) rispetto ai controlli ( $0,0165 \pm 0,0024$  vs  $0,0099 \pm 0,002$ ), mentre tra topi MIA-POLY[I:C] e i controlli in questa area cerebrale non c'è differenza significativa ( $0,0103 \pm 0,0012$  vs  $0,0099 \pm 0,002$ ). Nella corteccia a questa età non si sono registrate differenze significative né tra i topi MIA-POLY[I:C] e i controlli ( $0,0031 \pm 0,0005$  vs  $0,0039 \pm 0,0004$ ) né tra i topi MIA-LPS e i controlli ( $0,0037 \pm 0,0005$  vs  $0,0039 \pm 0,0004$ ).

I relativi grafici sono illustrati in Figura 5.2.

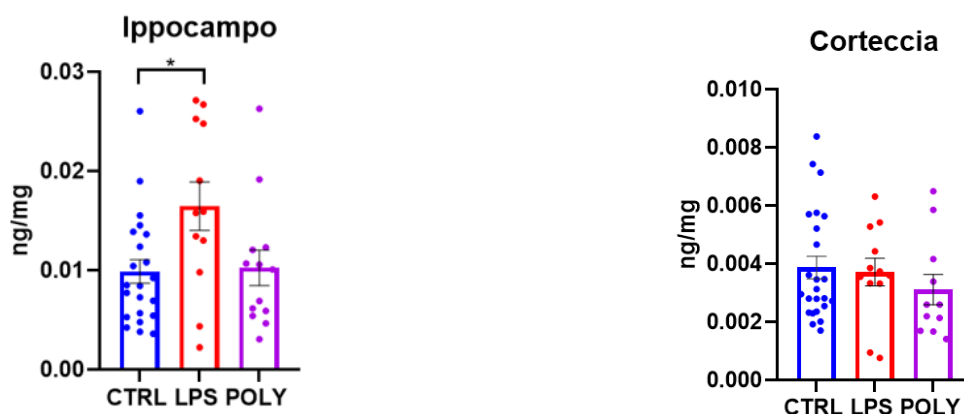


Figura 5.2: concentrazione di PS (ng/mg) in ippocampo e corteccia di topi P7; le colonne rappresentano il valore medio  $\pm$  SEM (errore standard della media) e gli asterischi rappresentano le differenze significative ( $*p \leq 0,05$  T-test, unpaired).

Nei campioni cerebrali di ippocampo a P14 non sono emerse differenze significative tra i topi MIA-LPS ( $0,00117 \pm 0,0036$  vs  $0,0223 \pm 0,0053$ ) e i controlli e nemmeno tra i topi MIA-POLY[I:C] rispetto ai controlli ( $0,0062 \pm 0,0118$  vs  $0,0223 \pm 0,0053$ ). Anche nella corteccia non emergono differenze significative tra i valori medi dei topi MIA-LPS ( $0,0025 \pm 0,0013$  vs  $0,0034 \pm 0,0012$ ) rispetto ai controlli e tra quelli dei topi MIA-POLY[I:C] rispetto ai controlli ( $0,001 \pm 0,0001$  vs  $0,0034 \pm 0,0012$ ).

I relativi grafici sono illustrati in Figura 5.3.

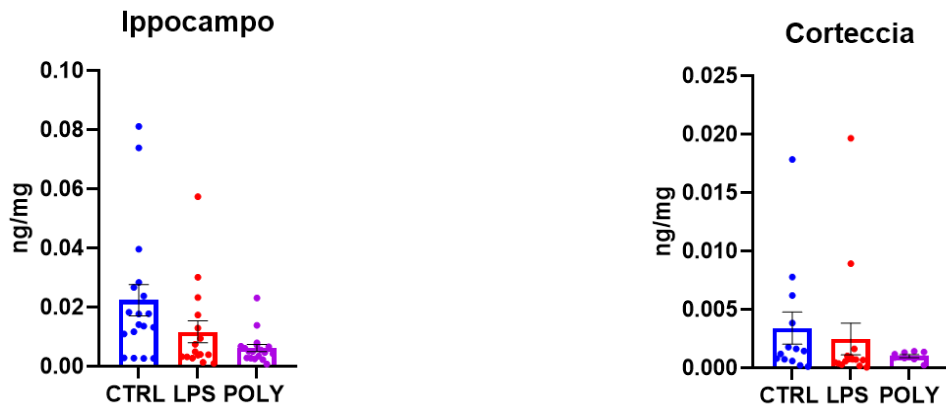


Figura 5.3: concentrazione di PS (ng/mg) in ippocampo e corteccia di topi P14; le colonne rappresentano il valore medio  $\pm$  SEM (errore standard della media).

Nei topi MIA-POLY[I:C] a P28 è stato registrato un aumento significativo di PS sia nell'ippocampo ( $0,0277 \pm 0,0031$  vs  $0,0166 \pm 0,0016$ ;  $p \leq 0,05$ ) sia nella corteccia ( $0,0059 \pm 0,0002$  vs  $0,0029 \pm 0,003$ ;  $p < 0,0001$ ) rispetto ai relativi controlli. A questa stessa età i topi MIA-LPS non presentano differenze significative né in ippocampo ( $0,0128 \pm 0,0013$  vs  $0,0166 \pm 0,0016$ ) né in corteccia ( $0,0027 \pm 0,0002$  vs  $0,0029 \pm 0,003$ ) rispetto ai relativi controlli. I relativi grafici sono illustrati in Figura 5.4.

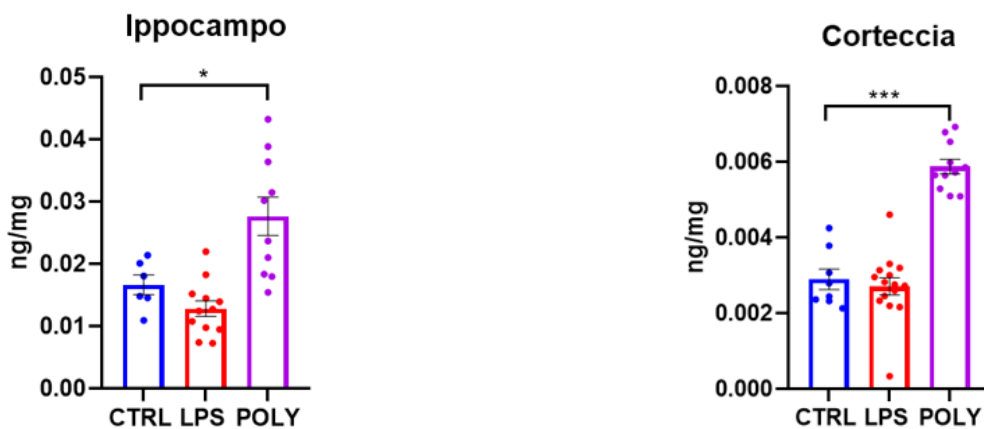


Figura 5.4: concentrazione di PS (ng/mg) in ippocampo e corteccia di topi P28; le colonne rappresentano il valore medio  $\pm$  SEM (errore standard della media) e gli asterischi rappresentano le differenze significative (\* $p \leq 0,05$  T-test, unpaired; \*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

### 5.1.2. Confronto dei livelli di PS in cervelletto e striato nella prole a P7 di madri trattate e non trattate

Negli esperimenti successivi sono state analizzate le concentrazioni di PS nel cervelletto e nello striato a P7, età particolarmente delicata per quanto riguarda il neurosviluppo (Semple et al., 2013).

Nel cervelletto si sono ottenuti risultati piuttosto interessanti: il PS diminuisce significativamente sia nei topi MIA-LPS ( $0,0057 \pm 0,0007$  vs  $0,0126 \pm 0,0019$ ) sia nei topi MIA-POLY[I:C] ( $0,0059 \pm 0,0010$  vs  $0,0126 \pm 0,0019$ ) rispetto ai controlli il cui valore è riportato nelle parentesi. Nello striato invece né il POLY[I:C] ( $0,0264 \pm 0,0019$  vs  $0,0202 \pm 0,0060$ ) né l'LPS ( $0,0159 \pm 0,0021$  vs  $0,0202 \pm 0,0060$ ) hanno causato variazioni nella concentrazione del NS rispetto ai relativi controlli il cui valore è riportato nelle parentesi.

I relativi grafici sono illustrati in Figura 5.5.

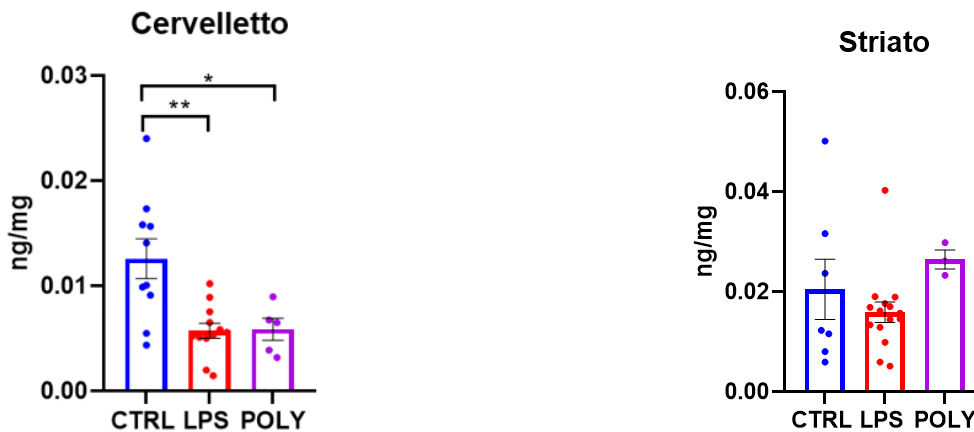


Figura 5.5: concentrazione di PS (ng/mg) in cervelletto e striato di topi P7; le colonne rappresentano il valore medio  $\pm$  SEM (errore standard della media) e gli asterischi rappresentano le differenze significative (\* $p \leq 0,05$  T-test, unpaired; \*\* $p \leq 0,01$ ).

### 5.1.3. Confronto dei livelli di PS tra maschi e femmine a P7, P14, P28 in ippocampo e corteccia

Considerata la differenza di incidenza dei disturbi dello spettro autistico tra maschi e femmine (rapporto 4:1), è stata inoltre indagata la possibile influenza del sesso sulla concentrazione di PS, al fine di valutare un suo eventuale coinvolgimento in tale disparità. In particolare, il NS è stato quantificato nell'ippocampo e nella corteccia di topi P7, P14 e P28. I relativi grafici sono illustrati in Figura 5.6.

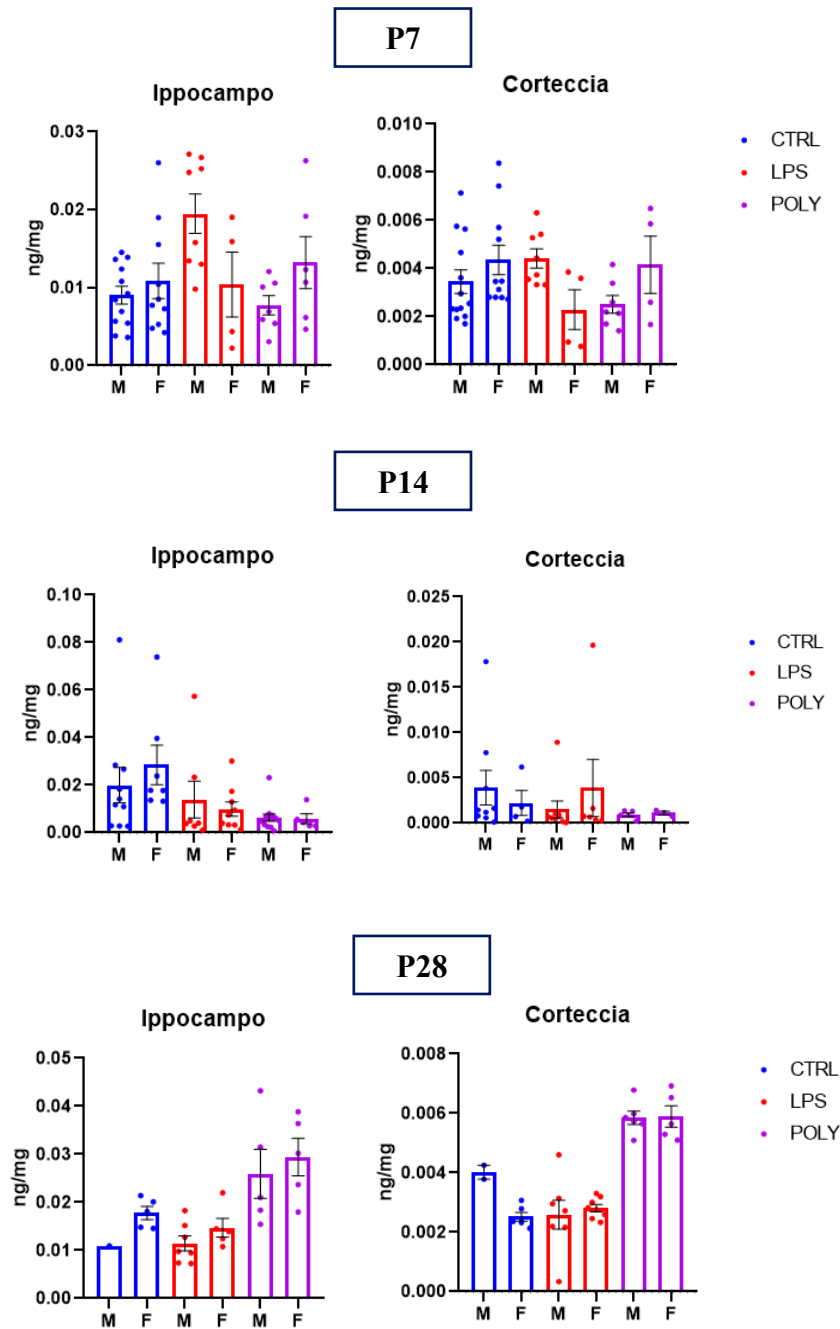


Figura 5.6: confronto della concentrazione di PS (ng/mg) in ippocampo e corteccia di topi P7, P14 e P28; le colonne rappresentano il valore medio  $\pm$  SEM (errore standard della media).

## 6. DISCUSSIONE

I neurosteroidi (NS) sono fortemente coinvolti nella maturazione del SNC (Mellon, 2008b), infatti una loro alterazione durante la vita fetale può causare alterazioni comportamentali e diversi disturbi del neurosviluppo nella prole (Hirst et al., 2016), ad esempio è stato osservato che la riduzione di Allopregnanolone (ALLO) nel cervello induce comportamenti ASD-like nel topo (Ebihara et al., 2017b).

A differenza dell'ALLO, non esistono studi approfonditi sull'effetto del pregnenolone solfato (PS) a livello del neurosviluppo. Per questo motivo abbiamo voluto studiare i livelli di questo NS in un modello di disturbo dello spettro autistico cioè la “Maternal Immune Activation” (MIA).

Il PS, come l'ALLO, ha effetti antinfiammatori e neuroprotettivi grazie alla sua capacità di aumentare la degradazione delle molecole proinfiammatorie TIRAP e TLR2 rilasciate a seguito dell'attivazione dell'immunità innata e di ridurre la secrezione di TNF- $\alpha$  e IL-6 dai macrofagi e dalla microglia (Murugan et al., 2019).

Similmente al pregnenolone, il PS è immunosoppressivo: è stato infatti osservato che induce la morte delle cellule T e ne riduce la proliferazione, diminuisce l'espressione dei geni proinfiammatori e aumenta quella dei geni che codificano per i recettori nucleari degli steroidi (El Hajj et al., 2024).

È stato ipotizzato che i NS abbiano un effetto protettivo nei confronti di alterazioni della funzionalità del SNC grazie alla loro capacità di regolare la plasticità sinaptica, la mielinizzazione e la neurogenesi nel corso della vita (Walton & Maguire, 2025).

I NS favoriscono la sopravvivenza neuronale attraverso la riduzione dello stress ossidativo e dell'infiammazione e contemporaneamente contribuiscono alla crescita e alla differenziazione dei neuroni e delle cellule della glia, promuovendo così lo sviluppo e la plasticità cerebrale (Sienes Bailo et al., 2022).

I NS controllano l'equilibrio tra eccitazione ed inibizione regolando le trasmissioni GABAergica e glutammatergica (Bolneo et al., 2022). Diversi studi hanno infatti correlato l'alterazione dell'equilibrio glutammato/GABA all'aumento della probabilità di sviluppare malattie psichiatriche tra cui schizofrenia, autismo e depressione (Bravo et al., 2011).

In particolare, il PS è un importante modulatore della plasticità sinaptica, infatti potenziando la trasmissione eccitatoria glutammatergica mediata dai recettori NMDA ed i segnali calcio-

dipendenti promuove meccanismi di consolidamento della memoria nell'ippocampo (Smith et al., 2014b).

Pertanto, lo scopo della mia tesi è stato quello di capire in che modo le infezioni virali e batteriche in gravidanza, simulate rispettivamente con iniezioni di POLY[I:C] e LPS, influenzano i livelli di PS nel cervello della prole.

Abbiamo analizzato quindi i cambiamenti nelle concentrazioni di questo NS in aree cerebrali diverse e in momenti diversi del neurosviluppo.

Dai nostri esperimenti è emerso che il trattamento della madre (MIA con POLY[I:C] o LPS) altera la concentrazione di questo NS ed i cambiamenti dipendono dalla regione cerebrale analizzata, dal periodo dello sviluppo della prole e dall'immunogeno utilizzato.

In particolare, è stato riscontrato un aumento significativo della concentrazione di PS in ippocampo a P7 nella prole dei trattati con LPS, e in corteccia e in ippocampo a P28 in topi nati da madri trattate con POLY[I:C].

Visto il coinvolgimento del PS nelle risposte infiammatorie, l'aumento di questo steroide nell'ippocampo può essere interpretato come una risposta antinfiammatoria/neuroprotettiva al fine di proteggere lo sviluppo cerebrale e prevenire alterazioni nella sua maturazione.

I livelli dei NS sono dipendenti dall'attività degli enzimi steroidogenici.

Alcuni ricercatori (Harteneck, 2013b) hanno eseguito test comportamentali su topi geneticamente deficienti per l'enzima STS (permette di ottenere il PREG dalla desolfonazione del PS), e hanno osservato che tali animali hanno comportamenti ADHD-like, ossia caratterizzato principalmente da iperreattività locomotoria e ansia (Trent et al., 2012b). Un altro studio ha evidenziato che topi in cui l'enzima STS era stato inibito mostravano un'augmentata aggressività (Nicolas et al., 2001).

Studi comportamentali hanno dimostrato che il PS aumenta i processi mnemonici (Flood et al., 1995) ed il comportamento ansioso (Martín-García & Pallarés, 2008).

Riguardo all'effetto degli immunogeni sulle variazioni delle concentrazioni di PS abbiamo notato che gli effetti dell'LPS sulla concentrazione del NS in ippocampo sono precoci (P7) rispetto a quelli indotti dal POLY[I:C] che non si manifestano prima del 28° giorno di vita (P28).

Studi precedenti hanno scoperto che la MIA indotta dalla somministrazione di POLY[I:C] causa delle alterazioni epigenetiche nella prole adolescente, attraverso la modificazione della metilazione del DNA, in diverse regioni cerebrali. In particolare, nell'ipotalamo della prole lo studio ha registrato una significativa ipometilazione del gene *Mecp2*, il quale codifica per un'importante proteina regolatrice altamente espressa nei neuroni (MeCP2) responsabile della regolazione dell'espressione di diversi geni coinvolti nello sviluppo neuronale. Gli autori ipotizzano che l'ipometilazione del gene *Mecp2* possa aumentare i livelli della proteina MeCP2 e che questo possa contribuire a silenziare geni attivati dalla risposta immunitaria, con conseguenti ripercussioni sul neurosviluppo (Basil et al., 2014). Studi recenti dimostrano infatti che le alterazioni legate ai processi epigenetici possono contribuire alla fisiopatologia dei NDDs, tra cui la schizofrenia e l'autismo (Reichard & Zimmer-Bensch, 2021).

Si potrebbe quindi ipotizzare che l'aumento di PS registrato nei topi MIA-POLY[I:C] a P28 nell'ippocampo e nella corteccia sia conseguente alle modificazioni epigenetiche indotte dall'immunogeno più che una risposta diretta all'immunogeno come invece potrebbe accadere a P7.

La divergenza temporale tra ippocampo e corteccia nell'aumento del PS (rispettivamente a P7 e a P28) è compatibile con una maturazione regionale asincrona: nel modello murino l'ippocampo a P7 è altamente neurogenico (Gilley et al., 2011), mentre la piena funzionalità dei circuiti corticali si ottiene più avanti nello sviluppo, intorno a P30 (Kumaraguru et al., 2025); ciò può spiegare il ritardo degli effetti in corteccia.

L'analisi dei livelli di PS nei topi MIA-POLY[I:C] a E18 ha rilevato una diminuzione del NS in ippocampo.

Questo risultato, che deve essere confermato dato il numero esiguo di campioni analizzati, è in antitesi con la tendenza osservata nell'ippocampo nelle altre età, ovvero a P7 e a P28 dove invece si verifica un aumento del PS.

A P7 è stata inoltre registrata una diminuzione del PS nel cervelletto sia di topi MIA-LPS sia di quelli MIA-POLY[I:C]. Questo effetto è opposto rispetto a ciò che si osserva a quell'età in ippocampo dove invece il PS aumenta: questo dimostra che l'effetto della MIA sul PS è regione-specifico.

In particolare uno studio ha evidenziato gli effetti della somministrazione dell'LPS sul fegato evidenziando la conseguente carenza dell'isoforma SULT, responsabile della produzione del DHEA-S (Kim et al., 2004). Se il comportamento del SULT nel fegato fosse paragonabile a quello nel cervelletto, si potrebbe correlare l'infezione con LPS ad una diminuzione del SULT e quindi di PS, anche se per confermarlo è necessario misurare il SULT nel cervelletto nelle stesse condizioni in cui è stato misurato il PS.

A P14 non sono state evidenziate alterazioni significative nei livelli di PS nella prole nata da madri MIA.

Dato che l'autismo ha una prevalenza maggiore nei maschi rispetto alle femmine (rapporto 4:1) abbiamo voluto analizzare se nella prole nata da madri MIA vi erano differenze nei livelli del PS tra maschi e femmine. Confrontando i livelli di PS alle diverse età (Figura 5.6) in cervelli provenienti da topi MIA (LPS e Poly[I:C]) non abbiamo trovato differenze significative nei livelli di PS tra i due sessi.

Studi recenti hanno dimostrato differenze significative tra maschi e femmine nei livelli di PS nel plasma di pazienti ASD. In particolare, nel plasma di bambini prepuberi maschi ci sono livelli più bassi di PS rispetto ai controlli sani (Janšáková et al., 2020b), mentre nelle femmine hanno osservato livelli di PS più alti rispetto ai controlli sani (Jansakova et al., 2024).

La carenza di un neurosteroido durante lo sviluppo può provocare danni selettivamente nei maschi ma non nelle femmine. Infatti, uno studio recente condotto sui topi K.O. per il gene che codifica l'enzima steroidogenico  $3\alpha$ -HSD, ha dimostrato che la carenza di ALLO produce delle anomalie nello sviluppo del cervelletto che portano a comportamenti autistici solo nei maschi. La carenza del NS nei maschi induce un'ipomielinizzazione delle fibre nervose del cervelletto che non si evidenzia nelle femmine e che causa alterazioni nello sviluppo della struttura nervosa (Vacher et al., 2021).

Questo studio mette in luce come la stessa diminuzione nei livelli di ALLO produca effetti diversi nei maschi e nelle femmine; è possibile quindi che anche nel nostro modello la stessa diminuzione di PS produca effetti diversi nei due sessi ed è quindi accettabile che non ci siano differenze nei livelli del NS tra maschi e femmine dopo il trattamento.

Dato che gli effetti di un'attivazione immunitaria prenatale in gravidanza sui livelli di PS nella prole sono dipendenti dall'età e dall'area cerebrale analizzata, è possibile che ci sia una

suscettibilità e/o risposta diversa allo stimolo infiammatorio, probabilmente dovuta alla tempistica diversa in cui le aree cerebrali maturano ma anche al diverso effetto modulatore del PS dato che i recettori, bersaglio del NS, possono essere espressi diversamente nelle varie aree del cervello durante lo sviluppo.

## 7. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Dai nostri esperimenti emerge che un'infezione prenatale nella madre influenza i livelli di un neurosteroido, il PS, nel cervello della prole. Possiamo ipotizzare quindi che questo composto endogeno abbia un ruolo importante nella risposta dell'organismo allo stimolo infiammatorio e che le alterazioni dei suoi livelli possano modificare in qualche modo la funzionalità cerebrale portando ad alterazioni comportamentali tipiche dei disturbi dello spettro autistico.

In futuro, nello stesso modello sperimentale, sarà importante studiare l'espressione e l'attività degli enzimi steroidogenici (STS, SULT, 5 $\alpha$ -reduttasi) ed ampliare l'analisi ai livelli di altri neurosteroidi, come per esempio l'allopregnenolone, il pregnenolone ed il testosterone, in modo da avere un quadro più completo delle alterazioni che possono essere indotte da un'infezione prenatale e che portano poi a cambiamenti nel neurosviluppo.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abdallah, M. W., Larsen, N., Grove, J., Nørgaard-Pedersen, B., Thorsen, P., Mortensen, E. L., & Hougaard, D. M. (2013). Amniotic fluid inflammatory cytokines: Potential markers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *The World Journal of Biological Psychiatry*, *14*(7), 528–538. <https://doi.org/10.3109/15622975.2011.639803>
- Agis-Balboa, R. C., Guidotti, A., & Pinna, G. (2014). 5 $\alpha$ -reductase type I expression is downregulated in the prefrontal cortex/Brodman's area 9 (BA9) of depressed patients. *Psychopharmacology*, *231*(17), 3569–3580. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3567-5>
- Agis-Balboa, R. C., Pinna, G., Zhubi, A., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., & Guidotti, A. (2006). Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(39), 14602–14607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606544103>
- Almeida, F. B., Pinna, G., & Barros, H. M. T. (2021). The Role of HPA Axis and Allopregnanolone on the Neurobiology of Major Depressive Disorders and PTSD. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 5495. <https://doi.org/10.3390/ijms22115495>
- Alonso, G., Phan, V.-L., Guillemain, I., Saunier, M., Legrand, A., Anoa, M., & Maurice, T. (2000). Immunocytochemical localization of the sigma1 receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, *97*(1), 155–170. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00014-2)
- Angeloni, E., Germelli, L., Costa, B., Martini, C., & Da Pozzo, E. (2025a). Neurosteroids and Translocator Protein (TSPO) in neuroinflammation. *Neurochemistry International*, *182*, 105916. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105916>

- Angeloni, E., Germelli, L., Costa, B., Martini, C., & Da Pozzo, E. (2025b). Neurosteroids and Translocator Protein (TSPO) in neuroinflammation. *Neurochemistry International*, *182*, 105916. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105916>
- Arsenault, D., St-Amour, I., Cisbani, G., Rousseau, L.-S., & Cicchetti, F. (2014). The different effects of LPS and poly I:C prenatal immune challenges on the behavior, development and inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, *38*, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.016>
- Auyeung, B., Baron-Cohen, S., Ashwin, E., Knickmeyer, R., Taylor, K., & Hackett, G. (2009). Fetal testosterone and autistic traits. *British Journal of Psychology*, *100*(Pt 1), 1–22. <https://doi.org/10.1348/000712608X311731>
- Ayatollahi, A., Bagheri, S., Ashraf-Ganjouei, A., Moradi, K., Mohammadi, M.-R., & Akhondzadeh, S. (2020). Does Pregnenolone Adjunct to Risperidone Ameliorate Irritable Behavior in Adolescents With Autism Spectrum Disorder: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial? *Clinical Neuropharmacology*, *43*(5), 139–145. <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000405>
- Babayeva, M., Assefa, H., Basu, P., & Loewy, Z. (2022). Autism and associated disorders: Cannabis as a potential therapy. *Frontiers in Bioscience-Elite*, *14*(1), 1. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1401001>
- Baron-Cohen, S., Tsompanidis, A., Auyeung, B., Nørgaard-Pedersen, B., Hougaard, D. M., Abdallah, M., Cohen, A., & Pohl, A. (2020). Foetal oestrogens and autism. *Molecular Psychiatry*, *25*(11), 2970–2978. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0454-9>
- Basil, P., Li, Q., Dempster, E. L., Mill, J., Sham, P.-C., Wong, C. C. Y., & McAlonan, G. M. (2014). Prenatal maternal immune activation causes epigenetic differences in adolescent mouse brain. *Translational Psychiatry*, *4*(9), e434–e434. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.80>

- Bergeron, R., De Montigny, C., & Debonnel, G. (1996). Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: Effects mediated via sigma receptors. *The Journal of Neuroscience*, *16*(3), 1193–1202. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01193.1996>
- Berry, A. S. F., Finucane, B. M., Myers, S. M., Walsh, L. K., Seibert, J. M., Martin, C. L., Ledbetter, D. H., & Oetjens, M. T. (2024). A genome-first study of sex chromosome aneuploidies provides evidence of Y chromosome dosage effects on autism risk. *Nature Communications*, *15*(1), 8897. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53211-7>
- Bilbo, S. D., Block, C. L., Bolton, J. L., Hanamsagar, R., & Tran, P. K. (2018). Beyond infection—Maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders. *Experimental Neurology*, *299*, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.07.002>
- Bitran, D., Hilvers, R. J., & Kellogg, C. K. (s.d.). *Anxiolytic effects of 3a-hydroxy-5a[IZ]-pregnan-20-one: Endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA A receptor.*
- Bolneo, E., Chau, P. Y. S., Noakes, P. G., & Bellingham, M. C. (2022). Investigating the Role of GABA in Neural Development and Disease Using Mice Lacking GAD67 or VGAT Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(14), 7965. <https://doi.org/10.3390/ijms23147965>
- Boulanger-Bertolus, J., Pancaro, C., & Mashour, G. A. (2018). Increasing Role of Maternal Immune Activation in Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*, 230. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00230>
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., Bienenstock, J., & Cryan, J. F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus

- nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 16050–16055.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Brown, A. S. (2012). Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Developmental Neurobiology*, 72(10), 1272–1276.  
<https://doi.org/10.1002/dneu.22024>
- Bruins, A. P. (1998). Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794(1–2), 345–357. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01110-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01110-2)
- Brunetti, V., Soda, T., Berra-Romani, R., De Sarro, G., Guerra, G., Scarpellino, G., & Moccia, F. (2024). Two Signaling Modes Are Better than One: Flux-Independent Signaling by Ionotropic Glutamate Receptors Is Coming of Age. *Biomedicines*, 12(4), 880. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040880>
- Cameron, K., Bartle, E., Roark, R., Fanelli, D., Pham, M., Pollard, B., Borkowski, B., Rhoads, S., Kim, J., Rocha, M., Kahlson, M., Kangala, M., & Gentile, L. (2012). Neurosteroid binding to the amino terminal and glutamate binding domains of ionotropic glutamate receptors. *Steroids*, 77(7), 774–779.  
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.03.011>
- Carver, C. M., & Reddy, D. S. (2013). Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors: Regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology*, 230(2), 151–188. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3276-5>
- Chamera, K., Kotarska, K., Szuster-Głuszczyk, M., Trojan, E., Skórkowska, A., Pomierny, B., Krzyżanowska, W., Bryniarska, N., & Basta-Kaim, A. (2020). The prenatal challenge with lipopolysaccharide and polyinosinic:polycytidylic acid disrupts CX3CL1-CX3CR1 and CD200-CD200R signalling in the brains of male rat

- offspring: A link to schizophrenia-like behaviours. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01923-0>
- Chau, D. K.-F., Choi, A. Y.-T., Yang, W., Leung, W. N., & Chan, C. W. (2017). Downregulation of glutamatergic and GABAergic proteins in valproic acid associated social impairment during adolescence in mice. *Behavioural Brain Research*, 316, 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.003>
- Chew, L., Sun, K. L., Sun, W., Wang, Z., Rajadas, J., Flores, R. E., Arnold, E., Jo, B., & Fung, L. K. (2021). Association of serum allopregnanolone with restricted and repetitive behaviors in adult males with autism. *Psychoneuroendocrinology*, 123, 105039. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.105039>
- Church, J. S., Tamayo, J. M., Ashwood, P., & Schwartz, J. J. (2021). Repeated allergic asthma in early versus late pregnancy differentially impacts offspring brain and behavior development. *Brain, Behavior, and Immunity*, 93, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.014>
- Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L., & Mellon, S. H. (1995a). Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology*, 136(11), 5212–5223. <https://doi.org/10.1210/endo.136.11.7588260>
- Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L., & Mellon, S. H. (1995b). Steroidogenic enzyme P450c17 is expressed in the embryonic central nervous system. *Endocrinology*, 136(11), 5212–5223. <https://doi.org/10.1210/endo.136.11.7588260>
- Conklin, S. E., & Knezevic, C. E. (2020). Advancements in the gold standard: Measuring steroid sex hormones by mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 82, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.03.008>
- Conroy, S. M., Nguyen, V., Quina, L. A., Blakely-Gonzales, P., Ur, C., Netzeband, J. G., Prieto, A. L., & Gruol, D. L. (2004). Interleukin-6 produces neuronal loss in

- developing cerebellar granule neuron cultures. *Journal of Neuroimmunology*, 155(1–2), 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.06.014>
- Cook, J., Hull, L., & Mandy, W. (2024). Improving Diagnostic Procedures in Autism for Girls and Women: A Narrative Review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, Volume 20, 505–514. <https://doi.org/10.2147/NDT.S372723>
- Corradini, I., Focchi, E., Rasile, M., Morini, R., Desiato, G., Tomasoni, R., Lizier, M., Ghirardini, E., Fesce, R., Morone, D., Barajon, I., Antonucci, F., Pozzi, D., & Matteoli, M. (2018). Maternal Immune Activation Delays Excitatory-to-Inhibitory Gamma-Aminobutyric Acid Switch in Offspring. *Biological Psychiatry*, 83(8), 680–691. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.09.030>
- Cruciani, L., Romero, R., Vaisbuch, E., Kusanovic, J. P., Chaiworapongsa, T., Mazaki-Tovi, S., Mittal, P., Ogge, G., Gotsch, F., Erez, O., Kim, S. K., Dong, Z., Pacora, P., Lamont, R. F., Yeo, L., Hassan, S. S., & Di Renzo, G. C. (2010). Pentraxin 3 in amniotic fluid: A novel association with intra-amniotic infection and inflammation. *Journal of Perinatal Medicine*, 38(2). <https://doi.org/10.1515/jpm.2009.141>
- Darbra, S., Mòdol, L., Llidó, A., Casas, C., Vallée, M., & Pallarès, M. (2014). Neonatal allopregnanolone levels alteration: Effects on behavior and role of the hippocampus. *Progress in Neurobiology*, 113, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.07.007>
- Darbra, S., & Pallarès, M. (2011). Interaction between early postnatal neurosteroid manipulations and adult infusion of neurosteroids into CA1 hippocampal region on the open field behaviour. *Behavioural Brain Research*, 216(2), 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.018>

- Daugherty, D. J., Selvaraj, V., Chechneva, O. V., Liu, X., Pleasure, D. E., & Deng, W. (2013). A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis. *EMBO Molecular Medicine*, *5*(6), 891–903. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202124>
- Dawson, G. (2008). Early behavioral intervention, brain plasticity, and the prevention of autism spectrum disorder. *Development and Psychopathology*, *20*(3), 775–803. <https://doi.org/10.1017/S0954579408000370>
- Devoto, P., Frau, R., Bini, V., Pillolla, G., Saba, P., Flore, G., Corona, M., Marrosu, F., & Bortolato, M. (2012). Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase in the nucleus accumbens counters sensorimotor gating deficits induced by dopaminergic activation. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(10), 1630–1645. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.018>
- Dhir, A., & Chopra, K. (2015). On the anticonvulsant effect of allopregnanolone (a neurosteroid) in neonatal rats. *Life Sciences*, *143*, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.09.008>
- Diviccaro, S., Cioffi, L., Falvo, E., Giatti, S., & Melcangi, R. C. (2022). Allopregnanolone: An overview on its synthesis and effects. *Journal of Neuroendocrinology*, *34*(2), e12996. <https://doi.org/10.1111/jne.12996>
- Ebihara, K., Fujiwara, H., Awale, S., Dibwe, D. F., Araki, R., Yabe, T., & Matsumoto, K. (2017a). Decrease in endogenous brain allopregnanolone induces autism spectrum disorder (ASD)-like behavior in mice: A novel animal model of ASD. *Behavioural Brain Research*, *334*, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.019>
- Ebihara, K., Fujiwara, H., Awale, S., Dibwe, D. F., Araki, R., Yabe, T., & Matsumoto, K. (2017b). Decrease in endogenous brain allopregnanolone induces autism spectrum disorder (ASD)-like behavior in mice: A novel animal model of ASD. *Behavioural Brain Research*, *334*, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.019>

- El Hajj, Y., Shahin, T., Dieng, M. M., Alshaikh, M., Khair, M., Manikandan, V., & Idaghdour, Y. (2024). Pregnenolone sulfate induces transcriptional and immunoregulatory effects on T cells. *Scientific Reports*, *14*(1), 6782. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57327-0>
- Fan, C., Cowgill, J., Howard, R. J., & Lindahl, E. (2024). Divergent mechanisms of steroid inhibition in the human  $\rho 1$  GABAA receptor. *Nature Communications*, *15*(1), 7795. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51904-7>
- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., Rooney, R. J., Patel, D. H., & Thuras, P. D. (2010). mRNA and Protein Levels for GABAA $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  and GABABR1 Receptors are Altered in Brains from Subjects with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *40*(6), 743–750. <https://doi.org/10.1007/s10803-009-0924-z>
- Fischer, L., Paschke, B., Gareis, F., Schumacher, M., Liere, P., Hiergeist, A., Gessner, A., Rupprecht, R., Neumann, I. D., & Bosch, O. J. (2025). The translocator protein 18 kDa (TSPO) ligand etifoxine in an animal model of anxiety: Line- and sex-dependent effects on emotionality, stress reactivity, spine density, oxytocin receptors, steroids, and microbiome composition. *Neuropharmacology*, *266*, 110282. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.110282>
- Flood, J. F., Morley, J. E., & Roberts, E. (1995). Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: The amygdala is by far the most sensitive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(23), 10806–10810. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10806>
- Fontaine-Lenoir, V., Chambraud, B., Fellous, A., David, S., Duchossoy, Y., Baulieu, E.-E., & Robel, P. (2006). Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid

- receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(12), 4711–4716.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0600113103>
- Fonteneau, M., Brugoux, A., Jaccaz, D., Donello, J. E., Banerjee, P., Le Merrer, J., & Becker, J. A. (2024). The NMDA receptor modulator zelquistinel durably relieves behavioral deficits in three mouse models of autism spectrum disorder. *Neuropharmacology*, *248*, 109889. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.109889>
- Fung, L. K., Libove, R. A., Phillips, J., Haddad, F., & Hardan, A. Y. (2014). Brief Report: An Open-Label Study of the Neurosteroid Pregnenolone in Adults with Autism Spectrum Disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *44*(11), 2971–2977. <https://doi.org/10.1007/s10803-014-2144-4>
- G1960-90104\_ChemStation\_ConceptsGuide.Pdf*.  
[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1960-90104\\_ChemStation\\_ConceptsGuide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1960-90104_ChemStation_ConceptsGuide.pdf). (s.d.).
- Gandal, M. J., Haney, J. R., Wamsley, B., Yap, C. X., Parhami, S., Emani, P. S., Chang, N., Chen, G. T., Hoftman, G. D., De Alba, D., Ramaswami, G., Hartl, C. L., Bhattacharya, A., Luo, C., Jin, T., Wang, D., Kawaguchi, R., Quintero, D., Ou, J., ... Geschwind, D. H. (2022). Broad transcriptomic dysregulation occurs across the cerebral cortex in ASD. *Nature*, *611*(7936), 532–539.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05377-7>
- Gardener, H., Spiegelman, D., & Buka, S. L. (2011). Perinatal and neonatal risk factors for autism: A comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*, *128*(2), 344–355.  
<https://doi.org/10.1542/peds.2010-1036>
- Garlanda, C., Bottazzi, B., Magrini, E., Inforzato, A., & Mantovani, A. (2018). PTX3, a Humoral Pattern Recognition Molecule, in Innate Immunity, Tissue Repair, and

Cancer. *Physiological Reviews*, 98(2), 623–639.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2017>

Gatliff, J., East, D. A., Singh, A., Alvarez, M. S., Frison, M., Matic, I., Ferraina, C., Sampson, N., Turkheimer, F., & Campanella, M. (2017). A role for TSPO in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis and redox stress signaling. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2896–e2896. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.186>

Ghoumari, A. M., Ibanez, C., El-Etr, M., Leclerc, P., Eychenne, B., O'Malley, B. W., Baulieu, E. E., & Schumacher, M. (2003). Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *Journal of Neurochemistry*, 86(4), 848–859. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01881.x>

Giatti, S., Boraso, M., Melcangi, R. C., & Viviani, B. (2012). Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 49(3), R125–R134. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0127>

Gibbs, T. T., Russek, S. J., & Farb, D. H. (2006). Sulfated steroids as endogenous neuromodulators. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 84(4), 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.07.031>

Gilley, J. A., Yang, C., & Kernie, S. G. (2011). Developmental profiling of postnatal dentate gyrus progenitors provides evidence for dynamic cell-autonomous regulation. *Hippocampus*, 21(1), 33–47. <https://doi.org/10.1002/hipo.20719>

Guengerich, F. P. (2001). Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14(6), 611–650. <https://doi.org/10.1021/tx0002583>

- Guengerich, F. P., & Yoshimoto, F. K. (2018). Formation and Cleavage of C–C Bonds by Enzymatic Oxidation–Reduction Reactions. *Chemical Reviews*, *118*(14), 6573–6655. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00031>
- Han, V. X., Patel, S., Jones, H. F., & Dale, R. C. (2021). Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neurology*, *17*(9), 564–579. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00530-8>
- Hansen, K. B., Wollmuth, L. P., Bowie, D., Furukawa, H., Menniti, F. S., Sobolevsky, A. I., Swanson, G. T., Swanger, S. A., Greger, I. H., Nakagawa, T., McBain, C. J., Jayaraman, V., Low, C.-M., Dell’Acqua, M. L., Diamond, J. S., Camp, C. R., Perszyk, R. E., Yuan, H., & Traynelis, S. F. (2021). Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, *73*(4), 1469–1658. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000131>
- Harteneck, C. (2013a). Pregnenolone Sulfate: From Steroid Metabolite to TRP Channel Ligand. *Molecules*, *18*(10), 12012–12028. <https://doi.org/10.3390/molecules181012012>
- Harteneck, C. (2013b). Pregnenolone Sulfate: From Steroid Metabolite to TRP Channel Ligand. *Molecules*, *18*(10), 12012–12028. <https://doi.org/10.3390/molecules181012012>
- Henderson, V. W. (2018). Progesterone and human cognition. *Climacteric*, *21*(4), 333–340. <https://doi.org/10.1080/13697137.2018.1476484>
- Hirst, J. J., Cumberland, A. L., Shaw, J. C., Bennett, G. A., Kelleher, M. A., Walker, D. W., & Palliser, H. K. (2016). Loss of neurosteroid-mediated protection following stress during fetal life. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *160*, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.09.012>

- Horder, J., Petrinovic, M. M., Mendez, M. A., Bruns, A., Takumi, T., Spooren, W., Barker, G. J., Künnecke, B., & Murphy, D. G. (2018). Glutamate and GABA in autism spectrum disorder—A translational magnetic resonance spectroscopy study in man and rodent models. *Translational Psychiatry*, 8(1), 106. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0155-1>
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., Da Silva, H. M. A., & Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, 444(7118), 486–489. <https://doi.org/10.1038/nature05324>
- Hrcka Krausova, B., Kysilov, B., Cerny, J., Vyklicky, V., Smejkalova, T., Ladislav, M., Balik, A., Korinek, M., Chodounska, H., Kudova, E., & Vyklicky, L. (2020). Site of Action of Brain Neurosteroid Pregnenolone Sulfate at the N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *The Journal of Neuroscience*, 40(31), 5922–5936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3010-19.2020>
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Chow, J., Mazmanian, S. K., & Patterson, P. H. (2012). Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12776–12781. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202556109>
- Hsiao, E. Y., & Patterson, P. H. (2011). Activation of the maternal immune system induces endocrine changes in the placenta via IL-6. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(4), 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.12.017>
- Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and Synaptic Plasticity: The Last 25 Years. *Neuron*, 80(3), 704–717. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.025>
- HybridSPE®-Phospholipid Technology. <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/solid-phase-extraction/hybridspe-ppt>. (s.d.).

- Hyman, S. L., Levy, S. E., Myers, S. M., COUNCIL ON CHILDREN WITH DISABILITIES, SECTION ON DEVELOPMENTAL AND BEHAVIORAL PEDIATRICS, Kuo, D. Z., Apkon, S., Davidson, L. F., Ellerbeck, K. A., Foster, J. E. A., Noritz, G. H., Leppert, M. O., Saunders, B. S., Stille, C., Yin, L., Weitzman, C. C., Childers, D. O., Levine, J. M., Peralta-Carcelen, A. M., Poon, J. K., ... Bridgemohan, C. (2020). Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics*, *145*(1), e20193447. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-3447>
- Janšáková, K., Hill, M., Čelárová, D., Celušáková, H., Repiská, G., Bičíková, M., Máčová, L., & Ostatníková, D. (2020a). Alteration of the steroidogenesis in boys with autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, *10*(1), 340. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01017-8>
- Janšáková, K., Hill, M., Čelárová, D., Celušáková, H., Repiská, G., Bičíková, M., Máčová, L., & Ostatníková, D. (2020b). Alteration of the steroidogenesis in boys with autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, *10*(1), 340. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01017-8>
- Janskova, K., Hill, M., Celusakova, H., Repiska, G., Bicikova, M., Macova, L., Polonyiova, K., Kopicova, M., & Ostatnikova, D. (2024). Steroidogenic pathway in girls diagnosed with autism spectrum disorders. *PLOS ONE*, *19*(12), e0312933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312933>
- Johnston, G. (2005). GABAA Receptor Channel Pharmacology. *Current Pharmaceutical Design*, *11*(15), 1867–1885. <https://doi.org/10.2174/1381612054021024>
- Kaleta, M., Oklestkova, J., Novák, O., & Strnad, M. (2021). Analytical Methods for the Determination of Neuroactive Steroids. *Biomolecules*, *11*(4), 553. <https://doi.org/10.3390/biom11040553>

- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Keevil, B. G. (2013). Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(5), 663–674. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.05.015>
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Kentner, A. C., Bilbo, S. D., Brown, A. S., Hsiao, E. Y., McAllister, A. K., Meyer, U., Pearce, B. D., Pletnikov, M. V., Yolken, R. H., & Bauman, M. D. (2019). Maternal immune activation: Reporting guidelines to improve the rigor, reproducibility, and transparency of the model. *Neuropsychopharmacology*, 44(2), 245–258. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0185-7>
- Kim, M. S., Shigenaga, J., Moser, A., Grunfeld, C., & Feingold, K. R. (2004). Suppression of DHEA sulfotransferase (Sult2A1) during the acute-phase response. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287(4), E731–E738. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00130.2004>
- Kimoto, T., Ishii, H., Higo, S., Hojo, Y., & Kawato, S. (2010). Semicomprehensive Analysis of the Postnatal Age-Related Changes in the mRNA Expression of Sex Steroidogenic Enzymes and Sex Steroid Receptors in the Male Rat Hippocampus. *Endocrinology*, 151(12), 5795–5806. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0581>
- Kokate, T. G., Juhng, K. N., Kirkby, R. D., Llamas, J., Yamaguchi, S., & Rogawski, M. A. (1999). Convulsant actions of the neurosteroid pregnenolone sulfate in mice. *Brain Research*, 831(1–2), 119–124. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01287-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01287-1)

- Kosidou, K., Karlsson, H., Arver, S., Bhasin, S., Dalman, C., & Gardner, R. M. (2024). Maternal Steroid Hormone Levels in Early Pregnancy and Autism in the Offspring: A Population-Based, Nested Case-Control Study. *Biological Psychiatry*, *96*(2), 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2024.02.1014>
- Kostakis, E., Smith, C., Jang, M.-K., Martin, S. C., Richards, K. G., Russek, S. J., Gibbs, T. T., & Farb, D. H. (2013). The Neuroactive Steroid Pregnenolone Sulfate Stimulates Trafficking of Functional N-Methyl D-Aspartate Receptors to the Cell Surface via a Noncanonical, G Protein, and Ca<sup>2+</sup>-Dependent Mechanism. *Molecular Pharmacology*, *84*(2), 261–274. <https://doi.org/10.1124/mol.113.085696>
- Krone, N., Hughes, B. A., Lavery, G. G., Stewart, P. M., Arlt, W., & Shackleton, C. H. L. (2010). Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *121*(3–5), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.04.010>
- Krueger, D. D., Osterweil, E. K., Chen, S. P., Tye, L. D., & Bear, M. F. (2011). Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(6), 2587–2592. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013855108>
- Kumaraguru, S., Morgan, J., & Wong, F. K. (2025). Activity-dependent regulation of microglia numbers by pyramidal cells during development shape cortical functions. *Science Advances*, *11*(8), eadq5842. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adq5842>
- Landa, R. J. (2018). Efficacy of early interventions for infants and young children with, and at risk for, autism spectrum disorders. *International Review of Psychiatry*, *30*(1), 25–39. <https://doi.org/10.1080/09540261.2018.1432574>

- Larti, F., Kahrizi, K., Musante, L., Hu, H., Papari, E., Fattahi, Z., Bazazzadegan, N., Liu, Z., Banan, M., Garshasbi, M., Wienker, T. F., Ropers, H. H., Galjart, N., & Najmabadi, H. (2015). A defect in the CLIP1 gene (CLIP-170) can cause autosomal recessive intellectual disability. *European Journal of Human Genetics*, *23*(3), 331–336. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.13>
- Lauber, M. E., & Lichtensteiger, W. (1996). Ontogeny of 5 alpha-reductase (type 1) messenger ribonucleic acid expression in rat brain: Early presence in germinal zones. *Endocrinology*, *137*(7), 2718–2730. <https://doi.org/10.1210/endo.137.7.8770891>
- Lauritsen, M. B. (2013). Autism spectrum disorders. *European Child & Adolescent Psychiatry*, *22*(S1), 37–42. <https://doi.org/10.1007/s00787-012-0359-5>
- Lavisse, S., Guillermier, M., Hérard, A.-S., Petit, F., Delahaye, M., Van Camp, N., Ben Haim, L., Lebon, V., Remy, P., Dollé, F., Delzescaux, T., Bonvento, G., Hantraye, P., & Escartin, C. (2012). Reactive Astrocytes Overexpress TSPO and Are Detected by TSPO Positron Emission Tomography Imaging. *The Journal of Neuroscience*, *32*(32), 10809–10818. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1487-12.2012>
- Le Foll, F., Louiset, E., Castel, H., Vaudry, H., & Cazin, L. (1997). Electrophysiological effects of various neuroactive steroids on the GABAA receptor in pituitary melanotrope cells. *European Journal of Pharmacology*, *331*(2–3), 303–311. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01042-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01042-X)
- Li, M., Usui, N., & Shimada, S. (2023). Prenatal Sex Hormone Exposure Is Associated with the Development of Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 2203. <https://doi.org/10.3390/ijms24032203>
- Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X.-M., Ji, L., Brown, T., & Malik, M. (2009). Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal*

- of *Neuroimmunology*, 207(1–2), 111–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>
- Ligsay, A., Van Dijck, A., Nguyen, D. V., Lozano, R., Chen, Y., Bickel, E. S., Hessel, D., Schneider, A., Angkustsiri, K., Tassone, F., Ceulemans, B., Kooy, R. F., & Hagerman, R. J. (2017). A randomized double-blind, placebo-controlled trial of ganaxolone in children and adolescents with fragile X syndrome. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 9(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s11689-017-9207-8>
- Lin, D., Black, S. M., Nagahama, Y., & Miller, W. L. (1993). Steroid 17 alpha-hydroxylase and 17,20-lyase activities of P450c17: Contributions of serine106 and P450 reductase. *Endocrinology*, 132(6), 2498–2506.  
<https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504753>
- Liu, G.-J., Middleton, R. J., Kam, W. W.-Y., Chin, D. Y., Hatty, C. R., Chan, R. H. Y., & Banati, R. B. (2017). Functional gains in energy and cell metabolism after *TSPO* gene insertion. *Cell Cycle*, 16(5), 436–447.  
<https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1281477>
- Lloyd-Evans, E., & Waller-Evans, H. (2020). Biosynthesis and signalling functions of central and peripheral nervous system neurosteroids in health and disease. *Essays in Biochemistry*, 64(3), 591–606. <https://doi.org/10.1042/EBC20200043>
- Luu The Van, Takahashi, M., De Launoit, Y., Dumont, M., Lachance, Y., & Labrie, F. (1991). Evidence for distinct dehydrogenase and isomerase sites within a single 3.beta.-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase protein. *Biochemistry*, 30(36), 8861–8865. <https://doi.org/10.1021/bi00100a019>
- Maguire, J., & Mody, I. (2009). Steroid hormone fluctuations and GABAAR plasticity. *Psychoneuroendocrinology*, 34, S84–S90.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.06.019>

- Majewska, M. D., Demirgören, S., Spivak, C. E., & London, E. D. (1990). The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Brain Research*, 526(1), 143–146. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90261-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90261-9)
- Makin, H. L. J., Honour, J. W., Shackleton, C. H. L., & Griffiths, W. J. (2010). General Methods for the Extraction, Purification, and Measurement of Steroids by Chromatography and Mass Spectrometry. In H. L. J. Makin & D. B. Gower (A c. Di), *Steroid Analysis* (pp. 163–282). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1023/b135931\\_3](https://doi.org/10.1023/b135931_3)
- Martin, H. G. S., Lassalle, O., Brown, J. T., & Manzoni, O. J. (2016). Age-Dependent Long-Term Potentiation Deficits in the Prefrontal Cortex of the *Fmr1* Knockout Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Cerebral Cortex*, 26(5), 2084–2092. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv031>
- Martin, H. G. S., & Manzoni, O. J. (2014). Late onset deficits in synaptic plasticity in the valproic acid rat model of autism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00023>
- Martín-García, E., & Pallarés, M. (2008). A post-training intrahippocampal anxiogenic dose of the neurosteroid pregnenolone sulfate impairs passive avoidance retention. *Experimental Brain Research*, 191(2), 123–131. <https://doi.org/10.1007/s00221-008-1506-6>
- Marx, C. E., Keefe, R. S. E., Buchanan, R. W., Hamer, R. M., Kilts, J. D., Bradford, D. W., Strauss, J. L., Naylor, J. C., Payne, V. M., Lieberman, J. A., Savitz, A. J., Leimone, L. A., Dunn, L., Porcu, P., Morrow, A. L., & Shampine, L. J. (2009). Proof-of-Concept Trial with the Neurosteroid Pregnenolone Targeting Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 34(8), 1885–1903. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.26>

- Matteoli, M., Pozzi, D., Fossati, M., & Menna, E. (2023). Immune synaptopathies: How maternal immune activation impacts synaptic function during development. *The EMBO Journal*, *42*(13), e113796. <https://doi.org/10.15252/emboj.2023113796>
- Maurice, T., Phan, V., Urani, A., & Guillemain, I. (2001). Differential involvement of the sigma<sub>1</sub> ( $\sigma_1$ ) receptor in the anti-amnesic effect of neuroactive steroids, as demonstrated using an *in vivo* antisense strategy in the mouse. *British Journal of Pharmacology*, *134*(8), 1731–1741. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704355>
- McCurry, M. D., D'Agostino, G. D., Walsh, J. T., Bisanz, J. E., Zalosnik, I., Dong, X., Morris, D. J., Korzenik, J. R., Edlow, A. G., Balskus, E. P., Turnbaugh, P. J., Huh, J. R., & Devlin, A. S. (2024). Gut bacteria convert glucocorticoids into progestins in the presence of hydrogen gas. *Cell*, *187*(12), 2952-2968.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.05.005>
- McDonald, J. G., Matthew, S., & Auchus, R. J. (2011). Steroid Profiling by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Adrenal Diseases. *Hormones and Cancer*, *2*(6), 324–332. <https://doi.org/10.1007/s12672-011-0099-x>
- Mellon, S. H. (2008a). *Neurosteroid regulation of CNS development*.
- Mellon, S. H. (2008b). *Neurosteroid regulation of CNS development*.
- Meyer, U., Nyffeler, M., Engler, A., Urwyler, A., Schedlowski, M., Knuesel, I., Yee, B. K., & Feldon, J. (2006). The Time of Prenatal Immune Challenge Determines the Specificity of Inflammation-Mediated Brain and Behavioral Pathology. *The Journal of Neuroscience*, *26*(18), 4752–4762. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0099-06.2006>
- Monnet, F. P., & Maurice, T. (2006). The Sigma1 Protein as a Target for the Non-genomic Effects of Neuro(active)steroids: Molecular, Physiological, and Behavioral Aspects.

*Journal of Pharmacological Sciences*, 100(2), 93–118.

<https://doi.org/10.1254/jphs.CR0050032>

Morales-Lázaro, S. L., González-Ramírez, R., & Rosenbaum, T. (2019). Molecular Interplay Between the Sigma-1 Receptor, Steroids, and Ion Channels. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 419. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00419>

Morrow, A. L., Boero, G., & Balan, I. (2024). Emerging evidence for endogenous neurosteroid modulation of pro-inflammatory and anti-inflammatory pathways that impact neuropsychiatric disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 158, 105558. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2024.105558>

Murugan, S., Jakka, P., Namani, S., Mujumdar, V., & Radhakrishnan, G. (2019). The neurosteroid pregnenolone promotes degradation of key proteins in the innate immune signaling to suppress inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(12), 4596–4607. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005543>

Naylor, J. C., Kilts, J. D., Hulette, C. M., Steffens, D. C., Blazer, D. G., Ervin, J. F., Strauss, J. L., Allen, T. B., Massing, M. W., & Payne, V. M. (2010). Allopregnanolone levels are reduced in temporal cortex in patients with Alzheimer's disease compared to cognitively intact control subjects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(8), 951–959. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.006>

Nicolas, L. B., Pinoteau, W., Papot, S., Routier, S., Guillaumet, G., & Mortaud, S. (2001). Aggressive behavior induced by the steroid sulfatase inhibitor COUMATE and by DHEAS in CBA/H mice. *Brain Research*, 922(2), 216–222. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03171-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03171-7)

Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.015>

- Oskvig, D. B., Elkahoun, A. G., Johnson, K. R., Phillips, T. M., & Herkenham, M. (2012). Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(4), 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.015>
- Osuji, I. J., Vera-Bolaños, E., Carmody, T. J., & Brown, E. S. (2010). Pregnenolone for cognition and mood in dual diagnosis patients. *Psychiatry Research*, *178*(2), 309–312. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2009.09.006>
- Papadopoulos, V., Aghazadeh, Y., Fan, J., Campioli, E., Zirkin, B., & Midzak, A. (2015). Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *408*, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.03.014>
- Patterson, S. L. (2015). Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 $\beta$ , BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, *96*, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.020>
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., Lascola, C. D., Fu, Z., & Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, *472*(7344), 437–442. <https://doi.org/10.1038/nature09965>
- Penning, T. M. (1997). Molecular Endocrinology of Hydroxysteroid Dehydrogenases\*. *Endocrine Reviews*, *18*(3), 281–305. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.3.0302>
- Pinna, G., & Bortolato, M. (2025). The role of neuroactive steroids in psychiatric and neurological disorders: Neurobiology and therapeutic perspectives. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *179*, 106438. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2025.106438>

- Porte, R., Davoudian, S., Asgari, F., Parente, R., Mantovani, A., Garlanda, C., & Bottazzi, B. (2019). The Long Pentraxin PTX3 as a Humoral Innate Immunity Functional Player and Biomarker of Infections and Sepsis. *Frontiers in Immunology*, *10*, 794. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00794>
- Puia, G., Santi, M., Vicini, S., Pritchett, D. B., Purdy, R. H., Paul, S. M., Seeburg, P. H., & Costa, E. (1990). Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors. *Neuron*, *4*(5), 759–765. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90202-Q](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90202-Q)
- Qin, S., Chen, X., Gao, M., Zhou, J., & Li, X. (2017). Prenatal Exposure to Lipopolysaccharide Induces PTX3 Expression and Results in Obesity in Mouse Offspring. *Inflammation*, *40*(6), 1847–1861. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0626-1>
- Raciti, L., Formica, C., Raciti, G., Quartarone, A., & Calabrò, R. S. (2023). Gender and Neurosteroids: Implications for Brain Function, Neuroplasticity and Rehabilitation. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(5), 4758. <https://doi.org/10.3390/ijms24054758>
- Rasmussen, J. M., Graham, A. M., Entringer, S., Gilmore, J. H., Styner, M., Fair, D. A., Wadhwa, P. D., & Buss, C. (2019). Maternal Interleukin-6 concentration during pregnancy is associated with variation in frontolimbic white matter and cognitive development in early life. *NeuroImage*, *185*, 825–835. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.04.020>
- Ratnayake, U., Quinn, T., Walker, D. W., & Dickinson, H. (2013). Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness. *Frontiers in Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00180>

- Ratner, M. H., Kumaresan, V., & Farb, D. H. (2019). Neurosteroid Actions in Memory and Neurologic/Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 169. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00169>
- Reddy, D. S. (2010). Neurosteroids. In *Progress in Brain Research* (Vol. 186, pp. 113–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7>
- Redwood, C. (s.d.). *Interleukin-1 (IL-1) Pathway*.
- Reichard, J., & Zimmer-Bensch, G. (2021). The Epigenome in Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 776809. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.776809>
- Riebel, M., Brunner, L.-M., Nothdurfter, C., Wein, S., Schwarzbach, J., Liere, P., Schumacher, M., & Rupprecht, R. (2025a). Neurosteroids and translocator protein 18 kDa (TSPO) ligands as novel treatment options in depression. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *275*(6), 1581–1591. <https://doi.org/10.1007/s00406-024-01843-7>
- Riebel, M., Brunner, L.-M., Nothdurfter, C., Wein, S., Schwarzbach, J., Liere, P., Schumacher, M., & Rupprecht, R. (2025b). Neurosteroids and translocator protein 18 kDa (TSPO) ligands as novel treatment options in depression. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *275*(6), 1581–1591. <https://doi.org/10.1007/s00406-024-01843-7>
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Herrero-Labrador, R., Martínez-Murillo, R., Merlos, M., Vela, J. M., & Garzón, J. (2015). The  $\sigma$ 1 Receptor Engages the Redox-Regulated HINT1 Protein to Bring Opioid Analgesia Under NMDA Receptor Negative Control. *Antioxidants & Redox Signaling*, *22*(10), 799–818. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5993>

- Rojas, D. C., Singel, D., Steinmetz, S., Hepburn, S., & Brown, M. S. (2014). Decreased left perisylvian GABA concentration in children with autism and unaffected siblings. *NeuroImage*, *86*, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.01.045>
- Ruggieri, V. (s.d.). *AUTISMO. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO*.
- Salman, E. D., Kadlubar, S. A., & Falany, C. N. (2009). Expression and Localization of Cytosolic Sulfotransferase (SULT) 1A1 and SULT1A3 in Normal Human Brain. *Drug Metabolism and Disposition*, *37*(4), 706–709. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.025767>
- Schiffer, L., Barnard, L., Baranowski, E. S., Gilligan, L. C., Taylor, A. E., Arlt, W., Shackleton, C. H. L., & Storbeck, K.-H. (2019). Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *194*, 105439. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105439>
- Schütt, J., Falley, K., Richter, D., Kreienkamp, H.-J., & Kindler, S. (2009). Fragile X Mental Retardation Protein Regulates the Levels of Scaffold Proteins and Glutamate Receptors in Postsynaptic Densities. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(38), 25479–25487. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042663>
- Schverer, M., Lanfumey, L., Baulieu, E.-E., Froger, N., & Villey, I. (2018). Neurosteroids: Non-genomic pathways in neuroplasticity and involvement in neurological diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, *191*, 190–206. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.06.011>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, *106–107*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>

- Shaw, J. C., Berry, M. J., Dyson, R. M., Crombie, G. K., Hirst, J. J., & Palliser, H. K. (2019). Reduced Neurosteroid Exposure Following Preterm Birth and Its' Contribution to Neurological Impairment: A Novel Avenue for Preventative Therapies. *Frontiers in Physiology*, *10*, 599. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00599>
- Shen, W., Mennerick, S., Covey, D. F., & Zorumski, C. F. (2000). Pregnenolone Sulfate Modulates Inhibitory Synaptic Transmission by Enhancing GABA<sub>A</sub> Receptor Desensitization. *The Journal of Neuroscience*, *20*(10), 3571–3579. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-10-03571.2000>
- Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W., & Patterson, P. H. (s.d.). *Maternal Influenza Infection Causes Marked Behavioral and Pharmacological Changes in the Offspring*.
- Shimizu, C., Fuda, H., Yanai, H., & Strott, C. A. (2003). Conservation of the Hydroxysteroid Sulfotransferase *SULT2B1* Gene Structure in the Mouse: Pre- and Postnatal Expression, Kinetic Analysis of Isoforms, and Comparison with Prototypical SULT2A1. *Endocrinology*, *144*(4), 1186–1193. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221011>
- Siens Bailo, P., Llorente Martín, E., Calmarza, P., Montolio Breva, S., Bravo Gómez, A., Pozo Giráldez, A., Sánchez-Pascuala Callau, J. J., Vaquer Santamaría, J. M., Dayaldasani Khialani, A., Cerdá Micó, C., Camps Andreu, J., Sáez Tormo, G., & Fort Gallifa, I. (2022). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases and potential antioxidant therapies. *Advances in Laboratory Medicine / Avances En Medicina de Laboratorio*, *3*(4), 342–350. <https://doi.org/10.1515/almed-2022-0111>
- Smith, C. C., Gibbs, T. T., & Farb, D. H. (2014a). Pregnenolone sulfate as a modulator of synaptic plasticity. *Psychopharmacology*, *231*(17), 3537–3556. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3643-x>

- Smith, C. C., Gibbs, T. T., & Farb, D. H. (2014b). Pregnenolone sulfate as a modulator of synaptic plasticity. *Psychopharmacology*, *231*(17), 3537–3556. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3643-x>
- Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *The Journal of Neuroscience*, *27*(40), 10695–10702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>
- Spanic, T., Fabjan, T., & Majdic, G. (2015a). Expression levels of mRNA for neurosteroidogenic enzymes 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -reductase, 3 $\alpha$ -HSD and cytochrome P450 aromatase in the fetal wild type and SF-1 knockout mouse brain. *Endocrine Research*, *40*(1), 44–48. <https://doi.org/10.3109/07435800.2014.933974>
- Spanic, T., Fabjan, T., & Majdic, G. (2015b). Expression levels of mRNA for neurosteroidogenic enzymes 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -reductase, 3 $\alpha$ -HSD and cytochrome P450 aromatase in the fetal wild type and SF-1 knockout mouse brain. *Endocrine Research*, *40*(1), 44–48. <https://doi.org/10.3109/07435800.2014.933974>
- Spanic, T., Fabjan, T., & Majdic, G. (2015c). Expression levels of mRNA for neurosteroidogenic enzymes 17 $\beta$ -HSD, 5 $\alpha$ -reductase, 3 $\alpha$ -HSD and cytochrome P450 aromatase in the fetal wild type and SF-1 knockout mouse brain. *Endocrine Research*, *40*(1), 44–48. <https://doi.org/10.3109/07435800.2014.933974>
- Sripada, R. K., Marx, C. E., King, A. P., Rajaram, N., Garfinkel, S. N., Abelson, J. L., & Liberzon, I. (2013). DHEA Enhances Emotion Regulation Neurocircuits and Modulates Memory for Emotional Stimuli. *Neuropsychopharmacology*, *38*(9), 1798–1807. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.79>
- Sripada, R. K., Marx, C. E., King, A. P., Rampton, J. C., Ho, S. S., & Liberzon, I. (2013). Allopregnanolone Elevations Following Pregnenolone Administration Are

- Associated with Enhanced Activation of Emotion Regulation Neurocircuits. *Biological Psychiatry*, 73(11), 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.12.008>
- Stachniuk, A., & Fornal, E. (2016). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Analytical Methods*, 9(6), 1654–1665. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0342-0>
- Steinman, G. (2020). COVID-19 and autism. *Medical Hypotheses*, 142, 109797. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109797>
- Stephenson, F. A. (2006). Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. *Biochemical Society Transactions*, 34(5), 877–881. <https://doi.org/10.1042/BST0340877>
- Symeonides, C., Vacy, K., Thomson, S., Tanner, S., Chua, H. K., Dixit, S., Mansell, T., O’Hely, M., Novakovic, B., Herbstman, J. B., Wang, S., Guo, J., Chia, J., Tran, N. T., Hwang, S. E., Britt, K., Chen, F., Kim, T. H., Reid, C. A., ... Boon, W. C. (2024). Male autism spectrum disorder is linked to brain aromatase disruption by prenatal BPA in multimodal investigations and 10HDA ameliorates the related mouse phenotype. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48897-8>
- Sze, Y., & Brunton, P. J. (2022). Neurosteroids and early-life programming: An updated perspective. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 25, 100367. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2022.100367>
- Tang, W., Liu, D., Traynelis, S. F., & Yuan, H. (2020). Positive allosteric modulators that target NMDA receptors rectify loss-of-function GRIN variants associated with neurological and neuropsychiatric disorders. *Neuropharmacology*, 177, 108247. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108247>

- Thomas, J. L., Frieden, C., Nash, W. E., & Strickler, R. C. (1995). An NADH-induced Conformational Change That Mediates the Sequential 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Isomerase Activities Is Supported by Affinity Labeling and the Time-dependent Activation of Isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(36), 21003–21008. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21003>
- Trent, S., Dennehy, A., Richardson, H., Ojarikre, O. A., Burgoyne, P. S., Humby, T., & Davies, W. (2012a). Steroid sulfatase-deficient mice exhibit endophenotypes relevant to Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 37(2), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.06.006>
- Trent, S., Dennehy, A., Richardson, H., Ojarikre, O. A., Burgoyne, P. S., Humby, T., & Davies, W. (2012b). Steroid sulfatase-deficient mice exhibit endophenotypes relevant to Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 37(2), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.06.006>
- Twomey, E. C., & Sobolevsky, A. I. (2018). Structural Mechanisms of Gating in Ionotropic Glutamate Receptors. *Biochemistry*, 57(3), 267–276. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00891>
- Vacher, C.-M., Lacaille, H., O'Reilly, J. J., Salzbank, J., Bakalar, D., Sebaoui, S., Liere, P., Clarkson-Paredes, C., Sasaki, T., Sathyanesan, A., Kratimenos, P., Ellegood, J., Lerch, J. P., Imamura, Y., Popratiloff, A., Hashimoto-Torii, K., Gallo, V., Schumacher, M., & Penn, A. A. (2021). Placental endocrine function shapes cerebellar development and social behavior. *Nature Neuroscience*, 24(10), 1392–1401. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00896-4>
- Vallée, M. (2016). Neurosteroids and potential therapeutics: Focus on pregnenolone. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 160, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.09.030>

- Vallée, M., Mayo, W., & Le Moal, M. (2001). Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging. *Brain Research Reviews*, *37*(1–3), 301–312. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00135-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00135-7)
- Van Eijk, L., & Zietsch, B. P. (2021). Testing the extreme male brain hypothesis: Is autism spectrum disorder associated with a more MALE-TYPICAL brain? *Autism Research*, *14*(8), 1597–1608. <https://doi.org/10.1002/aur.2537>
- Walton, N. L., & Maguire, J. L. (2025). Neurosteroids: A lifelong impact on brain health. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *19*, 1644615. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2025.1644615>
- Wang, Z., Zhang, B., Mu, C., Qiao, D., Chen, H., Zhao, Y., Cui, H., Zhang, R., & Li, S. (2024). Androgen levels in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology*, *15*, 1371148. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1371148>
- Wartenberg, P., Farkas, I., Csillag, V., Colledge, W. H., Hrabovszky, E., & Boehm, U. (2021). Sexually Dimorphic Neurosteroid Synthesis Regulates Neuronal Activity in the Murine Brain. *The Journal of Neuroscience*, *41*(44), 9177–9191. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0885-21.2021>
- Weng, J.-H., Liang, M.-R., Chen, C.-H., Tong, S.-K., Huang, T.-C., Lee, S.-P., Chen, Y.-R., Chen, C.-T., & Chung, B. (2013). Pregnenolone activates CLIP-170 to promote microtubule growth and cell migration. *Nature Chemical Biology*, *9*(10), 636–642. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1321>
- Werling, D. M., & Geschwind, D. H. (2013). Sex differences in autism spectrum disorders: *Current Opinion in Neurology*, *26*(2), 146–153. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835ee548>

- Wigdor, E. M., Weiner, D. J., Grove, J., Fu, J. M., Thompson, W. K., Carey, C. E., Baya, N., Van Der Merwe, C., Walters, R. K., Satterstrom, F. K., Palmer, D. S., Rosengren, A., Bybjerg-Grauholm, J., Hougaard, D. M., Mortensen, P. B., Daly, M. J., Talkowski, M. E., Sanders, S. J., Bishop, S. L., ... Robinson, E. B. (2022). The female protective effect against autism spectrum disorder. *Cell Genomics*, 2(6), 100134. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100134>
- Williamson, J., Mtchedlishvili, Z., & Kapur, J. (2004). Characterization of the convulsant action of pregnenolone sulfate. *Neuropharmacology*, 46(6), 856–864. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.11.029>
- Wooding, K. M., & Auchus, R. J. (2013). Mass spectrometry theory and application to adrenal diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 371(1–2), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.026>
- Woods, R. M., Lorusso, J. M., Fletcher, J., ElTaher, H., McEwan, F., Harris, I., Kowash, H. M., D'Souza, S. W., Harte, M., Hager, R., & Glazier, J. D. (2023). Maternal immune activation and role of placenta in the prenatal programming of neurodevelopmental disorders. *Neuronal Signaling*, 7(2), NS20220064. <https://doi.org/10.1042/NS20220064>
- Wu, F. S., Gibbs, T. T., & Farb, D. H. (1991). Pregnenolone sulfate: A positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular Pharmacology*, 40(3), 333–336. [https://doi.org/10.1016/S0026-895X\(25\)12923-4](https://doi.org/10.1016/S0026-895X(25)12923-4)
- Wu, S., Ding, Y., Wu, F., Li, R., Xie, G., Hou, J., & Mao, P. (2015). Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 55, 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.05.004>

- Wudy, S. A., Schuler, G., Sánchez-Guijo, A., & Hartmann, M. F. (2018). The art of measuring steroids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *179*, 88–103. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.003>
- Xu, F.-R., Wei, Z.-H., Xu, X.-X., Zhang, X.-G., Wei, C.-J., Qi, X.-M., Li, Y.-H., Gao, X.-L., & Wu, Y. (2023). The hypothalamic steroidogenic pathway mediates susceptibility to inflammation-evoked depression in female mice. *Journal of Neuroinflammation*, *20*(1), 293. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02976-7>
- Yamada, M., Ohta, Y., Bachmanova, G. I., Nishimoto, Y., Archakov, A. I., & Kawato, S. (1995). Dynamic interactions of rabbit liver cytochromes P450IA2 and P450IIB4 with cytochrome b5 and NADPH-cytochrome P450 reductase in proteoliposomes. *Biochemistry*, *34*(32), 10113–10119. <https://doi.org/10.1021/bi00032a003>
- Yilmaz, C., Karali, K., Fodelianaki, G., Gravanis, A., Chavakis, T., Charalampopoulos, I., & Alexaki, V. I. (2019). Neurosteroids as regulators of neuroinflammation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *55*, 100788. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100788>
- Young, H., Oreve, M.-J., & Speranza, M. (2018). Clinical characteristics and problems diagnosing autism spectrum disorder in girls. *Archives de Pédiatrie*, *25*(6), 399–403. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2018.06.008>
- Zablotsky, B., Black, L. I., Maenner, M. J., Schieve, L. A., Danielson, M. L., Bitsko, R. H., Blumberg, S. J., Kogan, M. D., & Boyle, C. A. (2019). Prevalence and Trends of Developmental Disabilities among Children in the United States: 2009–2017. *Pediatrics*, *144*(4), e20190811. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-0811>
- Zawadzka, A., Cieślik, M., & Adamczyk, A. (2021). The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21), 11516. <https://doi.org/10.3390/ijms222111516>

- Zhang, X., Luo, W., He, K., Li, Y., Chen, Y., Xu, Z., & Zhou, Z.-K. (2025). IL-6 Inhibition Partially Ameliorates Maternal Immune Activation-Induced Autism-Like Behavioral Abnormalities in Mice. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(10), 852. <https://doi.org/10.3390/cimb47100852>
- Zhou, W., Yang, S., & Wang, P. G. (2017). Matrix Effects and Application of Matrix Effect Factor. *Bioanalysis*, 9(23), 1839–1844. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0214>
- Zorumski, C. F., Paul, S. M., Covey, D. F., & Mennerick, S. (2019). Neurosteroids as novel antidepressants and anxiolytics: GABA-A receptors and beyond. *Neurobiology of Stress*, 11, 100196. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100196>



