

L'Interleuchina-4 media i danni neurocomportamentali ritardati indotti dalla vaccinazione neonatale contro l'epatite B che coinvolge la down-regulation del recettore IL-4 nell'ippocampo

Xiao Wang¹, Junhua Yang¹, Zhiwei Xing, Hongyang Zhang, Yaru Wen, Fangfang Qi, Zejie Zuo, Jie Xu, Zhibin Yao*

Department of Anatomy and Neurobiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, PR China
Guangdong Province Key Laboratory of Brain Function and Disease, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, PR China

* autore corrispondente a #74, Zhongshan No. 2 Road, Guangzhou 510080, PR China.

E-mail address: yao.zb@163.com (Z. Yao).

¹ Questi autori hanno contribuito in egual misura al lavoro e dovrebbero essere considerati coautori.

ESTRATTO

Abbiamo precedentemente verificato che la vaccinazione neonatale contro l'epatite B ha indotto neuroinfiammazione ippocampale e alterazioni del comportamento nei topi. Tuttavia, l'esatto meccanismo di questi effetti rimane poco chiaro. In questo studio, abbiamo osservato che la vaccinazione neonatale contro l'epatite B ha indotto una risposta nella citochina antinfiammatoria della durata di 4-5 settimane sia nel siero che nell'ippocampo, principalmente indicata dagli elevati livelli di IL-4. Tre settimane dopo il programma di vaccinazione, tuttavia, il vaccino contro l'epatite B (HBV) ha mostrato una neuroinfiammazione ritardata dell'ippocampo. Nella periferia, IL-4 è la principale citochina indotta da questo vaccino. Le analisi di correlazione hanno mostrato una relazione positiva nei livelli di IL-4 tra siero e ippocampo nel gruppo con HBV. Quindi, abbiamo studiato se la sovraesposizione neonatale sistemica a IL-4 influenza cervello e comportamento. Abbiamo osservato che i topi a cui è stato iniettato per via intraperitoneale IL-4 di topo ricombinante (mIL-4) durante la prima fase della vita presentavano una neuroinfiammazione e compromissione della funzione cognitiva simili a quelle indotte dalla vaccinazione neonatale dell'epatite B. Successivamente, il meccanismo alla base degli effetti di IL-4 sul cervello nei topi è stato esplorato utilizzando una serie di esperimenti. In breve, questi esperimenti hanno dimostrato che IL-4 media i danni neurocomportamentali ritardati indotti dalla vaccinazione neonatale dell'epatite B, che comporta la permeabilità della barriera ematoencefalica (BBB) neonatale e la down-regulation del recettore IL-4. Questa scoperta suggerisce che gli eventi clinici riguardanti la sovraesposizione neonatale a IL-4, compresa la vaccinazione neonatale dell'epatite B e l'asma allergica nei neonati umani, possono avere implicazioni avverse per lo sviluppo del cervello e della funzione cognitiva.

1. Introduzione

La vaccinazione contro l'epatite B, raccomandata per i neonati per prevenire l'infezione da virus dell'epatite B e le malattie epatiche associate a livello globale [1], viene somministrata a neonati e bambini. Questo periodo è critico per lo sviluppo del cervello e l'attivazione immunitaria durante il periodo critico può alterare in modo significativo la programmazione dello sviluppo del cervello [2-4], che si traduce in un impatto a lungo termine sullo sviluppo del cervello e sul comportamento [5]. Diversi studi hanno riportato che l'attivazione immunitaria postnatale precoce ha aumentato l'ansia o la vulnerabilità a problemi cognitivi successivi in modelli animali [6-8].

Pertanto, la vaccinazione neonatale contro l'epatite B, che induce una forte attivazione immunitaria durante il periodo critico dello sviluppo cerebrale, può essere un fattore di rischio per

alcuni disturbi dello sviluppo neuropsicologico. In effetti, c'è stata una controversia sul fatto che la vaccinazione neonatale contro l'epatite B possa essere associata all'insorgenza di autismo, sclerosi multipla e mielite, con alcuni rapporti a favore [9-11] e altri rapporti contro [12] questa potenziale associazione. Inoltre, alcuni genitori temono che i vaccini di routine per l'infanzia siano associati a esiti neurologici avversi, in particolare il disturbo dello spettro autistico [13]. Inoltre, il nostro recente studio ha rivelato che la vaccinazione neonatale contro l'epatite B porta a disturbi nei comportamenti correlati all'umore e alla funzione cognitiva, alla neurogenesi e al potenziamento a lungo termine dell'ippocampo nei topi [14].

Abbiamo fornito una prima spiegazione del fatto che la vaccinazione neonatale dell'epatite B abbia indotto disturbi neurocomportamentali attraverso una distorsione da T helper (Th) -2 delle citochine sistemiche. Tuttavia, il meccanismo esatto o il percorso attraverso il quale la distorsione sistemica di Th-2 influenza il sistema nervoso centrale (CNS) non è ancora chiaro. Nel nostro studio precedente, la distorsione di Th-2 periferico indotta da HBV è stato valutato dal valore del rapporto di IFN- γ /IL-4 nel siero [14]. Tuttavia, è stata l'alterazione del livello di IL-4 che ha contribuito alla distorsione del Th-2 senza alcuna significativa alterazione del livello sierico di IFN- γ [14]. Altri studi riguardanti le risposte immunitarie a questo vaccino HBsAg/alum (antigene di superficie del virus epatico B), che è stato utilizzato dal nostro precedente lavoro, hanno anche dimostrato che IL-4 è la principale citochina indotta da questo vaccino [15,16]. Quindi, IL-4 può giocare un ruolo chiave nelle influenze neurocomportamentali indotte dall'HBV.

Esiste un'omeostasi tra l'anti infiammazione e la pro infiammazione nei topi con normale sviluppo che coinvolge una serie di citochine antinfiammatorie e proinfiammatorie. Molte di queste citochine antinfiammatorie e proinfiammatorie hanno ruoli importanti nello sviluppo e nella funzione neurale [17]. Qualsiasi fattore che disturba questa omeostasi può causare anomalie dello sviluppo e funzionali del cervello [17]. IL-4 stessa è una potente citochina antinfiammatoria che induce la risposta antinfiammatoria e inibisce la produzione di citochine proinfiammatorie [18]. Pertanto, è probabile che alti livelli di esposizione a IL-4 durante le fasi critiche dello sviluppo cerebrale rompano il profilo fisiologico antinfiammatorio/proinfiammatorio del cervello, alterando la programmazione dello sviluppo cerebrale.

Il nostro attuale studio ha investigato il potenziale ruolo dell'IL-4 indotta dalla vaccinazione neonatale dell'epatite B nell'influenzare lo sviluppo e la funzionalità cognitiva del cervello e il suo possibile meccanismo.

2. Materiali e metodi

2.1. Animali e allevamento

Le cucciolate di topi C57BL/6 appena nati sono state acquistate dal Centro Animale da Laboratorio dell'Università di Sun Yat-sen (Guangzhou, Cina). Sono stati alloggiati in specifiche condizioni di assenza di agenti patogeni, in condizione di 12 ore di luce / 12 ore di buio con cibo e acqua disponibili ininterrottamente. Sono stati usati topi maschi neonati. Questo studio è stato approvato dal Comitato Istituzionale Etico per gli Animali dell'Università di Sun Yat-sen.

2.2. Procedure di immunizzazione

Gli esperimenti di questo studio hanno utilizzato uno dei due seguenti metodi di iniezione: immunizzazione col vaccino contro l'epatite B e iniezione di IL-4 (mIL-4) ricombinante di topo. Nel metodo di immunizzazione col vaccino contro l'epatite B, i topi sono stati immunizzati con HBV (derivato da lievito, Kangtai Biological Pharmaceutical Company, Cina) in una serie di tre dosi [19] o uno stesso volume di PBS (tampone fosfato salino). La procedura di immunizzazione con l'HBV è iniziata il giorno 0 dopo la nascita (P0) ed è stata seguita da due dosi identiche di HBV il P7 e il P21 come inoculazioni di richiamo. Il dosaggio (1 μ g di HBsAg/50 μ l per cucciolo) di

HBV è stato effettuato secondo la nostra precedente ricerca [14]. Col metodo di iniezione di mIL-4, ai topi è stato iniettato mIL-4 per via intraperitoneale (PeproTech, una volta a giorni alterni; 25 ng/kg in 50 µl di PBS da P0 a P20 e 50 ng/kg in 50 µl di PBS una volta a giorni alterni Da P22 a P34) o uno stesso volume di PBS. Il periodo e il dosaggio per l'iniezione di mIL-4 sono stati determinati per imitare il periodo e l'ampiezza dell'aumento di IL-4 sierica indotta dalla vaccinazione contro l'epatite B. Tutti i topi sono stati svezzati il P21.

2.3. Analisi delle citochine

Per valutare i livelli di interferone (IFN) - γ , fattore di necrosi tumorale (TNF) - α , interleuchina (IL)-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10 nel siero e nell'ippocampo è stato utilizzato un pannello di perline magnetiche per citochine/chemochine di topo (MICYTOMAG- 70K-06; Millipore, Billerica, MA, USA), secondo le istruzioni del produttore. I topi sono stati anestetizzati profondamente e il sangue è stato prelevato immediatamente. Quindi i topi sono stati perfusi per via transcardiaca con NaCl allo 0,9% e sono stati prelevati ippocampi. I campioni di siero sono stati diluiti 1:2 nel tampone di analisi. Sono stati saggiati anche omogenati di ippocampo per valutare i livelli di IL-4 di topo e ratto utilizzando i kit di saggio di immunoassorbimento enzimatico come indicato dal produttore (Cusabio Biotech Co. Ltd. Wuhan, Cina). Gli ippocampi sono stati omogenati in PBS a pH 7,4 integrati con 1% di BSA, 0,1% di Triton X-100 e cocktail di inibitori della proteasi (Sigma), secondo le istruzioni del produttore (Milliplex MAP kit, Millipore). Un kit di analisi proteica BCA (Beyotime, Shanghai, Cina) è stato utilizzato per regolare la concentrazione proteica totale di ciascun campione a 4,5 mg/ml. Quindi, i campioni di siero e ippocampo preparati sono stati utilizzati rigorosamente secondo i protocolli del produttore per le analisi multiplex. I test sono stati eseguiti in triplice copia. I dati sono stati raccolti su un sistema Bio-Plex-200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e analizzati utilizzando un software professionale (Bio-Plex Manager).

2.4. Il labirinto acquatico di Morris

Un'altra coorte di topi è stata sottoposta al test MWM (labirinto acquatico di Morris) a 4, 8 e 12 settimane di età per valutare l'apprendimento spaziale e la memoria dei topi. Una vasca di 100 cm di diametro e 60 cm di altezza è stata riempita d'acqua resa opaca con una tinta bianca atossica a 22 (± 1) °C. La vasca è stata divisa in quattro quadranti immaginari uguali e una piattaforma circolare bianca fissa di 9 cm di diametro ad 1 cm sotto la superficie dell'acqua. Ogni topo è stato sottoposto a 4 prove al giorno e gli è stato dato un tempo massimo di 60 s per trovare la piattaforma nascosta per 5 giorni consecutivi. Quindi, il sesto giorno, ogni topo è stato sottoposto a una prova esplorativa con la piattaforma rimossa e gli è stato permesso di nuotare per 60 s. Il tempo impiegato per trovare la piattaforma e la distanza percorsa da ciascun topo per trovare la piattaforma è stato registrato con un sistema di registrazione del percorso Morris MT- 200 (Chengdu Technology & Market Corp., Cina).

2.5. Iniezione di Blu di Evans

La colorazione Blu di Evans è stata applicata per valutare la permeabilità della barriera ematoencefalica (BBB) descritta in precedenza [20] con piccole modifiche. In breve, ai topi è stata iniettata per via intraperitoneale una soluzione al 2% di colorante blu di Evans (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in NaCl allo 0,9% alla dose di 8 ml/kg il giorno P0 o P14. Quattro ore dopo, tutti i topi sono stati profondamente anestetizzati e perfusi per via transcardiaca con NaCl freddo allo 0,9% fino a quando il deflusso non è risultato chiaro. Per valutare la perdita di Blu di Evans, i loro tessuti cerebrali sono stati omogenati in dimetilformammide al 99% e incubati per 48 ore a 50°C. Dopo aver centrifugato a 12.000 g per 30 minuti a 4°C, il surnatante è stato raccolto per misurare l'assorbanza dei campioni a 620 nm utilizzando un lettore di micropiastre.

2.6. Colorazione con immunofluorescenza e quantificazione cellulare

Un'altra coorte di topi è stata sottoposta al test morfologico. I topi sono stati anestetizzati profondamente e perfusi per via transcardiaca con NaCl allo 0,9%, seguito da paraformaldeide al 4% (PFA). I cervelli sono stati rimossi e immediatamente postfissati in PFA al 4% durante la notte a 4°C. Quindi, i cervelli sono stati disidratati con gradiente di saccarosio al 10%, il 20% e il 30% per 24 ore ciascuno a 4°C. Le sezioni coronali seriali flottanti (40 µm) sono state ottenute utilizzando un microtomo congelante Leica SM2000R (Leica Microsystems, Richmond Hill, Ontario, Canada) e conservate a 4°C prima dell'immunocolorazione.

Le sezioni flottanti sono state lavate in PBS per tre volte e poi bloccate in PBS contenente albumina di siero bovino 1% (BSA) e Triton X-100 allo 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per 1 ora a 37°C. Le fette sono state quindi incubate negli anticorpi primari, inclusi anti-Iba-1 (1:1000; Wako Chemicals) di coniglio, anti-CD68 (1:200; Bio-Rad) di ratto e anti-MHC-2 (1:100; Prodotti IQ) a 37°C per 2 ore, seguita da un'incubazione di una notte a 4°C. Gli anticorpi primari sono stati diluiti in PBS contenente BSA all'1% e Triton X-100 allo 0,25%. Il giorno successivo, i campioni sono stati lavati tre volte e quindi incubati con anticorpi secondari, tra cui coniugati di capra e anti-coniglio -Alexa Fluor 555- e coniugato di asino e anti-ratto -Alexa Fluor 488- per 2 ore a 37°C. Entrambi gli anticorpi secondari (Invitrogen) sono stati diluiti a 1:400. Un microscopio confocale a scansione laser Zeiss LSM780 è stato utilizzato per catturare le micrografie confocali rappresentative delle cellule marcate.

Le analisi quantitative delle cellule Iba-1+ nell'ippocampo di ciascun topo sono state eseguite su un sistema stereologico Stereo Investigator (MicroBrightField, Williston, USA). Le misurazioni sono state effettuate in una serie equidistante di sei sezioni coronali. Per evitare il sovracampionamento, è stato misurato lo spessore effettivo della sezione e sono state definite le zone di sicurezza appropriate nella parte superiore e inferiore della sezione. È stato utilizzato l'obiettivo 40x di un microscopio Nikon per tutte le analisi stereologiche.

2.7. Reazione a catena della polimerasi quantitativa in tempo reale (qRT-PCR)

Un'altra coorte di topi è stata sottoposta alle analisi qRT-PCR. Le analisi qRT-PCR sono state eseguite come descritto in precedenza [14]. In breve, il reagente TRIzol (Sangon Biotech, Shanghai, Cina) è stato utilizzato per estrarre inizialmente l'RNA totale. Quindi, è stato applicato un kit di trascrizione inversa cDNA GoScript™ (Promega, Madison, USA) per convertire gli mRNA (2µg) in cDNA. La PCR quantitativa in tempo reale basata sulla fluorescenza è stata utilizzata per valutare l'espressione di diversi mRNA interessati. Per ciascun campione, le reazioni delle PCR quantitative sono state condotte in triplice copia utilizzando il TransStart Tip Green qPCR SuperMix (TransGen Biotech, Beijing, Cina). Per la sua stabilità, la β-actina è stata selezionata per essere il gene di riferimento nell'ippocampo. I cicli di amplificazione sono stati impostati su 94°C per 5 s e 60°C per 30 s. È stata costruita una curva di fusione per valutare la specificità della reazione. Per determinare e analizzare tutte le reazioni qRT-PCR è stato utilizzato un Sistema PCR Real-Time Bio-Rad IQ5 con il metodo Ct comparativo. I primer utilizzati in questo studio sono stati i seguenti:

IL-1β, Forward 5'-TGTCTTTCCCGTGGACCTTC e Reverse 5'-CTAATGGGAACGTCACACACC;
IL-6, Forward 5'-TCTGGGAAATCGGGAAATGAG e Reverse 5'-TCTCTGAAGGACTCTGGCTTTGTC;
Ym1, Forward 5'-GGCATACTTATCCTGAG e Reverse 5'-CCACTGAAGTCATCCATGTC;
ARG, Forward 5'-AGCCAATGAAGAGCTGGCTGGT e Reverse 5'-AACTGCCAGACTGTGGTCTCCA;
β-actina, Forward 5'-GGTACCACCATGTACCCAGG e Reverse 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC.

2.8. Analisi Western blot

Un'altra coorte di topi è stata sottoposta alle analisi Western blot. I livelli di proteina di phospho-p65, p65, phospho-Stat6, Stat6 e IL-4R nell'ippocampo dei topi sono stati esaminati mediante analisi Western blot. Dopo essere stati anestetizzati e perfusi con PBS, l'ippocampo dei topi è stato

separato dal cervello e poi omogenato nel tampone RIPA ghiacciato (Beyotime, Shanghai, Cina). L'omogenato è stato centrifugato a 9000g per 15 minuti a 4°C e il surnatante è stato isolato per il saggio Western blot. La concentrazione di proteine è stata quantificata utilizzando un kit di analisi proteica BCA (Beyotime, Shanghai, Cina). Gli omogenati tissutali (contenenti 50 µg di proteine totali) sono stati separati su gel SDS-PAGE al 10% o all'8% e sono stati quindi trasferiti su membrane di PVDF impregnate (Millipore). Le membrane sono state quindi bloccate in latte scremato al 5% in TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150mM e 0,05% Tween-20) per 2 ore a temperatura ambiente. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: coniglio anti-phospho-p65 (Ser536) (bioworld, 1:1000), coniglio anti-p65 (bioworld, 1:1000), coniglio anti-phospho-Stat6 (Thr645) (bioworld, 1:1000), coniglio anti-Stat6 (CST, 1:1000) e coniglio anti-IL-4R (bioworld, 1:1000) durante la notte a 4°C. Gli anticorpi anti-coniglio capra secondari coniugati con HRP (Fdbio science, Hangzhou, Cina) sono stati utilizzati a 1:10.000. Tutte le membrane sono state visualizzate utilizzando elettrochemiluminescenza (ECL) (Amersham Biosciences). La quantificazione è stata eseguita usando il software ImageJ e normalizzata usando β-actina.

2.9. Neutralizzazione dell'IL-4

È stato condotto un altro nuovo esperimento, allo scopo di indagare se la neutralizzazione dell'IL-4 bloccherebbe gli effetti sul cervello e sul comportamento indotto dalla vaccinazione neonatale dell'epatite B. In questo esperimento, sono stati preparati quattro gruppi di topi, vale a dire gruppo CON (controllo), gruppo HBV, gruppo HBV+IgG1 e gruppo HBV+anti-IL-4. La procedura di neutralizzazione dell'IL-4 è stata eseguita come descritto in precedenza con piccole modifiche [21].

Un anticorpo che neutralizza l'IL-4 (11B11, BD Pharmingen) o anticorpo di controllo dell'isotipo, IgG1 (BD Pharmingen) a 10 µg/g di peso corporeo è stato co-somministrato per via intraperitoneale con HBV il P0, P7 e P21. Inoltre, la somministrazione di anticorpi che neutralizzano l'IL-4 o anticorpi di controllo dell'isotipo è stata ripetuta per via intraperitoneale a 10 µg/g di peso corporeo il P1, P2, P8, P9, P10, P11, P22, P23, P24, P25. I topi nel gruppo CON e il gruppo HBV hanno ricevuto un'iniezione di PBS di un programma corrispondente. Queste iniezioni (HBV, anticorpo che neutralizza l'IL-4, anticorpo di controllo dell'isotipo o PBS) sopra descritte sono state effettivamente eseguite in topi sacrificati per i test ad età superiore a P25 e tali iniezioni sono cessate quando i topi sono stati sacrificati a età inferiori a P25 come mostrato nelle Figure 9 e S6.

2.10. Analisi statistiche

I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando il software statistico SPSS 23.0 per Windows (Chicago, IL, USA). I dati sono espressi come media ± errore standard della media (SEM). I dati di Fig. 5A-F, Fig. 6E, Fig. 10A-C e Fig. S3 sono stati analizzati utilizzando RM-ANOVA a due variabili seguito dal test post hoc Bonferroni. I dati in Fig. 3 sono stati analizzati utilizzando il coefficiente di correlazione di Pearson. I dati in fig. 7J-K, 9, 10D-E e S6 sono stati analizzati utilizzando ANOVA a una variabile. Tranne i dati in Fig. 3M e Fig. 6C e D, tutti gli altri dati sono stati analizzati utilizzando il test-t di Student o il test-t di Welch. Per indicare una differenza statisticamente significativa è stato considerato $p < 0.05$.

3. Risultati

3.1. La vaccinazione neonatale contro l'epatite B ha indotto una risposta istantanea delle citochine antinfiammatorie e una successiva risposta delle citochine proinfiammatorie nell'ippocampo

In primo luogo abbiamo osservato le influenze della vaccinazione neonatale contro l'epatite B

sui livelli di diverse principali citochine anti- e proinfiammatorie nell'ippocampo dal periodo neonatale all'età adulta. Per essere precisi, abbiamo esaminato i livelli di IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e TNF- α nei giorni P7, P14, P21, P28, P35, P42, P49, P56, P63 e P70 nell'ippocampo dei topi dei gruppi HBV e CON.

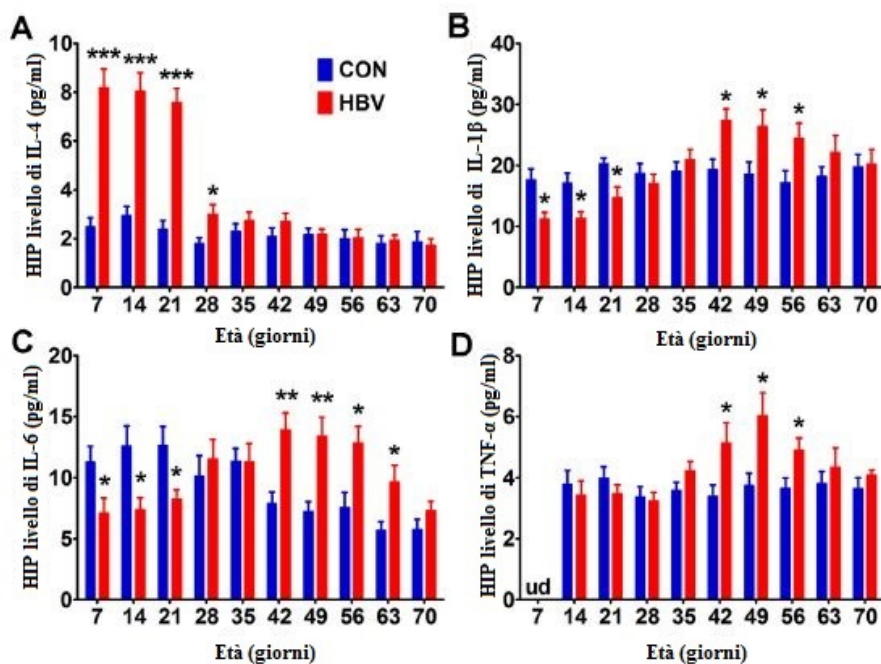


Fig. 1. La vaccinazione neonatale contro l'epatite B ha indotto una risposta istantanea delle citochine antinfiammatorie e una successiva risposta delle citochine proinfiammatorie nell'ippocampo. (A-D) Le barre rappresentano i livelli medi di IL-4 (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) nell'ippocampo. I dati rappresentano le medie \pm SEM (Errore Standard della Media). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 6$ /gruppo; test-t di Student. HIP: ippocampo; ud: non rilevabile.

Da P7 a P21 ci sono stati incrementi di circa 2,7-3,3 volte nelle concentrazioni di IL-4 nel gruppo HBV rispetto al gruppo CON (test-t di Student, P7, $p < 0,001$; P14, $p < 0,001$; P21, $p < 0,001$; $n = 6$; Fig. 1A). Il P28, c'è stato solo un aumento di 1,6 volte rispetto al gruppo CON (test-t di Student, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 1A). Tuttavia, nessuna differenza significativa nelle concentrazioni di IL-4 è stata trovata tra i due gruppi da P35 a P70 (Figura 1A).

Da P7 a P21, sia IL-1 β che IL-6 hanno mostrato andamenti opposti nei livelli rispetto a IL-4 nel gruppo HBV, con diminuzioni significative rispetto ai controlli (test-t di Student; IL-1 β : P7, $p < 0,05$; P14, $p < 0,05$; P21, $p < 0,05$; IL-6: P7, $p < 0,05$; P14, $p < 0,05$; P21, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 1B e C). È interessante notare che i livelli di IL-1 β e IL-6 nel gruppo HBV non hanno avuto alterazioni significative il P28 e P35 ma hanno mostrato un periodo di aumenti a rimbalzo da P42 a P56 o P63 (test-t di Student; IL-1 β : P42, $p < 0,05$; P49, $p < 0,05$; P56, $p < 0,05$; IL-6: P42, $p < 0,01$; P49, $p < 0,01$; P56, $p < 0,05$; P63, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 1B e C). TNF- α ha mostrato alterazioni simili a IL-1 β e IL-6 da P28 ma nessuna alterazione significativa prima di questa età (test-t di Student, P42, $p < 0,05$; P49, $p < 0,05$; P56, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 1D).

C'è stata una leggera diminuzione (HBV: $35,46 \pm 1,51$ vs CON: $42,15 \pm 2,32$; test-t di Student; $p < 0,05$) nel livello di IFN- γ solo il P42; senza alterazioni significative in tutte le altre età (Fig. S1A) nel gruppo HBV rispetto al gruppo CON. A tutte le età, non sono state riscontrate alterazioni significative nei livelli di IL-10 tra i gruppi (Fig. S1C).

Questi risultati suggeriscono che la vaccinazione neonatale dell'epatite B ha indotto una risposta delle citochine antinfiammatorie prima di P21 e una successiva risposta delle citochine proinfiammatorie nell'ippocampo che è durata da P42 a P63.

3.2. La vaccinazione neonatale dell'epatite B ha innalzato i livelli di IL-4 e ridotto i livelli di citochina proinfiammatoria nel siero

Avendo osservato gli effetti della vaccinazione neonatale contro l'epatite B sui livelli di IL-4, IL-1 β , IL-6 e TNF- α nell'ippocampo, abbiamo in seguito esaminato i livelli di queste citochine nel siero agli stessi punti di età. Le concentrazioni di IL-4 nel gruppo HBV erano significativamente più elevate nel siero rispetto al gruppo di controllo da P7 a P35 (test-t di Welch, P7, $p < 0,001$, test-t di Student, P14, $p < 0,001$; P21, $p < 0,001$; P28, $p < 0,05$; P35, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig.2A) ma non ha mostrato alterazioni significative da P42 a P70 (Fig. 2A).

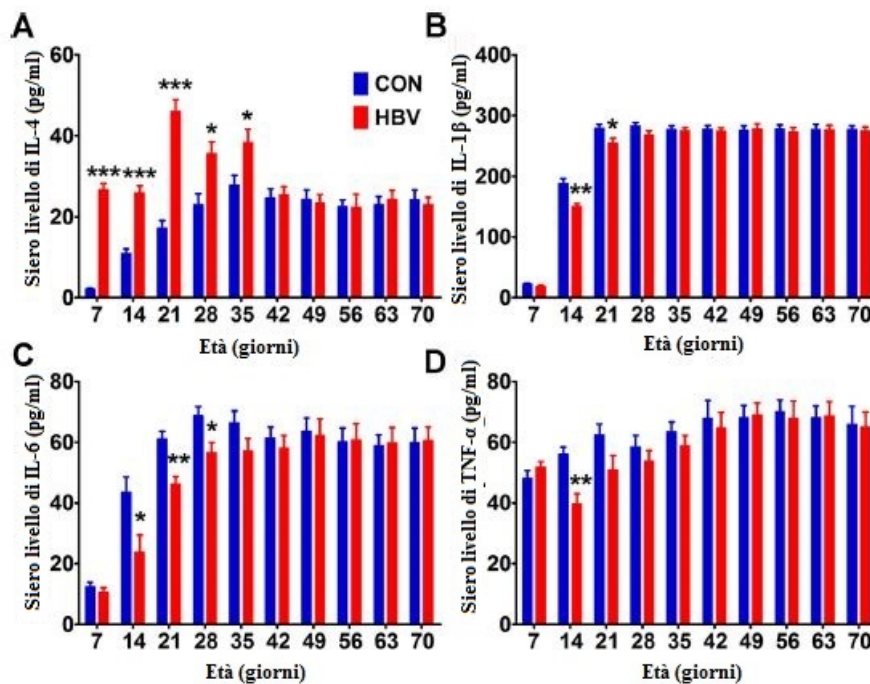


Fig.2 La vaccinazione neonatale contro l'Epatite B ha innalzato il livello di IL-4 e ridotto i livelli di citochine proinfiammatorie nel siero. (A-D) Le barre rappresentano i livelli medi di IL-4 (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e TNF- α (D) nel siero. I dati rappresentano le medie \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n=6$ /gruppo; test-t di Student o test-t di Welch.

Il livello di IL-1 β nel gruppo HBV ha mostrato lievi diminuzioni nel siero rispetto al gruppo CON il P14 e P21 senza alterazioni significative nelle altre età (test-t di Student, P14, $p < 0,01$; P21, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig.2B). Il livello di IL-6 nel gruppo HBV ha mostrato lievi diminuzioni nel siero rispetto al gruppo CON il P14, P21 e P28 senza alterazioni significative in altre età (test-t di Student, P14, $p < 0,05$; P21, $p < 0,01$; P28, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 2C). Il livello di TNF- α nel gruppo HBV ha mostrato lievi diminuzioni nel siero rispetto al gruppo CON il P14 senza alterazioni significative in altre età (test-t di Student, $p < 0,01$; $n = 6$; Fig. 2D). Non ci sono state alterazioni significative nei livelli di IFN- γ (Fig. S1B) e IL-10 (Fig. S1D) nel gruppo HBV a tutte le età in contrasto con il gruppo CON. In sintesi, si suggerisce che i livelli ridotti di citochine proinfiammatorie potrebbero riflettere la conseguenza dell'aumento della concentrazione sistemica di IL-4.

3.3. I livelli di IL-4 del siero erano correlati positivamente ai livelli dell'IL-4 dell'ippocampo a livello individuale

I risultati di cui sopra hanno mostrato che IL-4, IL-1 β , IL-6 e TNF- α sono stati alterati in modo significativo sia nel siero che nell'ippocampo del gruppo HBV in tutti o alcuni dei punti di età prima di P28. Per esplorare la relazione delle alterazioni delle citochine nell'ippocampo con quelle nella periferia, sono state poi eseguite analisi di correlazione a livello individuale tra il livello nell'ippocampo e il livello nel siero di ciascuna delle quattro citochine testate il P7, P14, P21 e P28. I nostri risultati hanno mostrato che i livelli di IL-4 sierici erano correlati positivamente ai livelli dell'IL-4 dell'ippocampo in tutti e quattro i punti temporali (coefficiente di correlazione di Pearson: P7, $r = 0,925$, $p < 0,01$; P14, $r = 0,877$, $p < 0,05$; P21, $r = 0,907$, $p < 0,05$; P28, $r = 0,866$, $p < 0,05$; $n =$

6; Fig. 3A-D). Non c'era alcuna correlazione significativa per IL- β , IL-6 e TNF- α tra livelli sierici e ippocampali (Fig. 3E-P).

3.4. La sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha imitato la risposta istantanea delle citochine antinfiammatorie indotta da HBV e la conseguente risposta delle citochine proinfiammatorie nell'ippocampo

IL-4 è l'unica citochina che ha una correlazione tra i suoi livelli nel siero e nell'ippocampo (Figura 3A-D). Inoltre, IL-4 è stata la citochina che ha avuto la massima ampiezza di cambiamento sia nell'ippocampo sia nel siero nel gruppo HBV (Figure 1 e 2). Pertanto, abbiamo ipotizzato che IL-4 potesse essere il mediatore attraverso cui la vaccinazione neonatale contro l'epatite B ha indotto la neuroinfiammazione sopra riportata (Figure 1 e 2) e le alterazioni del comportamento riportate precedentemente [14]. Per verificare questa ipotesi, ai topi è stato somministrato mIL-4 e sono stati testati per i loro livelli di citochine ippocampali. Ai topi sottoposti a test prima di P28 è stato iniettato mIL-4 per via intraperitoneale una volta ogni 2 giorni da P0 fino a quando non sono stati sacrificati, e ai topi sottoposti a verifiche dopo P35 è stato iniettato mIL-4 per via intraperitoneale una volta ogni due giorni da P0 a P34. Il dosaggio di 25 ng/kg di peso corporeo è stato utilizzato per iniezioni da P0 a P20 e sono stati utilizzati 50 ng/kg da P22 a P34. L'intero intervallo di tempo (da P0 a P34) e i dosaggi selezionati per l'iniezione di mIL-4 sono stati determinati imitando il periodo e l'estensione dell'aumento di IL-4 nel siero indotto dalla vaccinazione contro l'epatite B.

In generale, la sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha imitato la risposta istantanea della citochina antinfiammatoria indotta da HBV e la conseguente risposta della citochina proinfiammatoria nell'ippocampo. Da P7 a P28, le concentrazioni di IL-4 erano significativamente più elevate nell'ippocampo (test-t di Student, P7, $p < 0,001$; P14, $p < 0,001$; P21, $p < 0,001$; P28, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 4A) del gruppo mIL-4 rispetto a quello CON. Da P35 a P70, IL-4 è tornato ai livelli normali nell'ippocampo (Figura 4A).

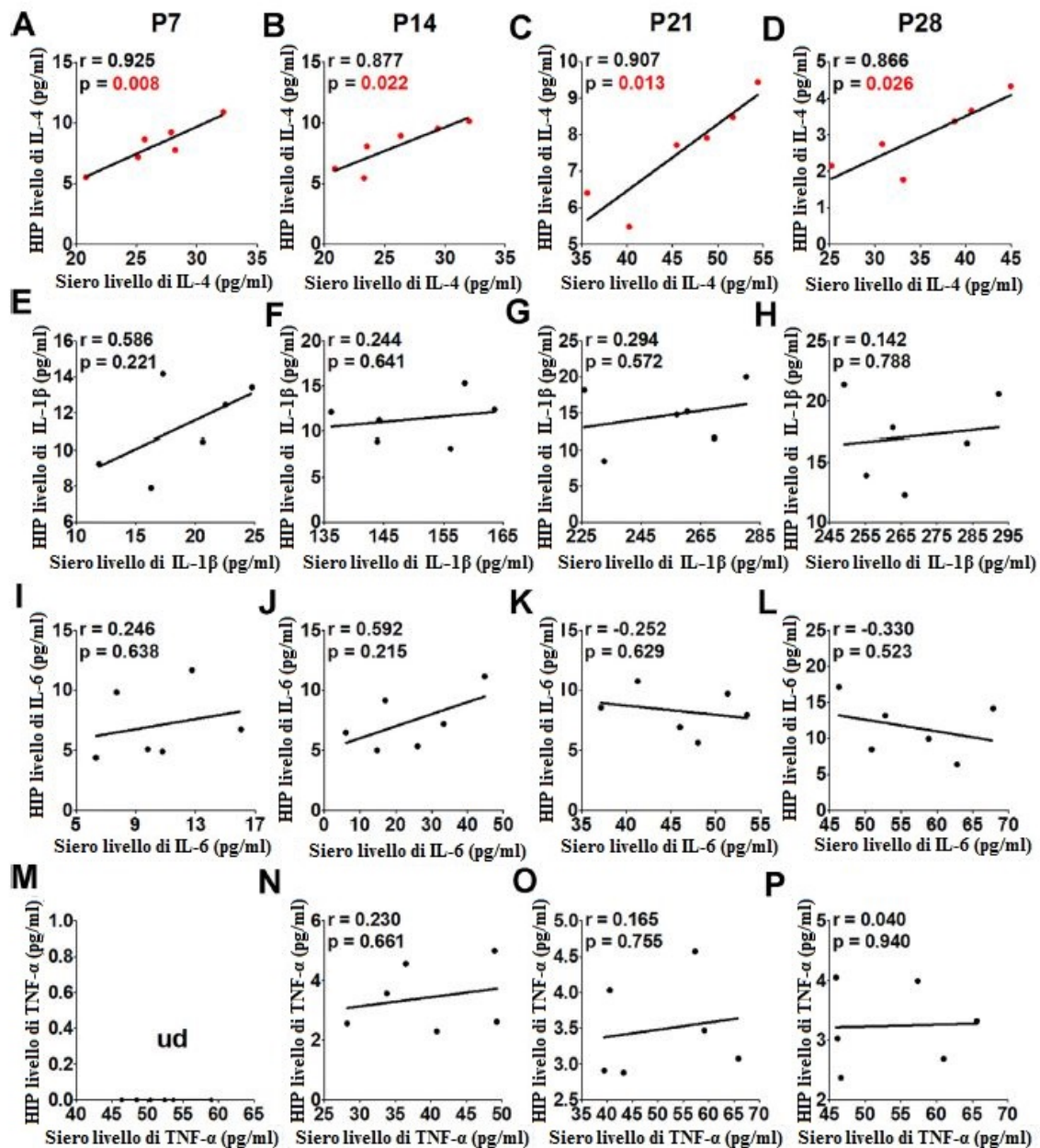


Fig. 3. La correlazione positiva del livello di IL-4 nel siero con il livello di IL-4 dell'ippocampo nel gruppo HBV. (A-D) Analisi di correlazione tra il livello di IL-4 nel siero e i livelli di IL-4 nell'ippocampo. (E-H) Analisi di correlazione tra il livello di IL-1β nel siero e i livelli di IL-1β nell'ippocampo. (I-L) Analisi di correlazione tra il livello di IL-6 nel siero e il livello di IL-6 nell'ippocampo. (M-P) Analisi di correlazione tra il livello di TNF-α nel siero e il livello di TNF-α nell'ippocampo. $n = 6$ /gruppo; Analisi di correlazione di Pearson. HIP: ippocampo; ud: non rilevabile.

Da P7 a P28, sia IL-1β che IL-6 nel gruppo mIL-4 hanno mostrato una tendenza opposta nei livelli rispetto a IL-4, con diminuzioni significative rispetto a quelle dei controlli (test-t di Student; IL-1β: P7, $p < 0,01$; P14, $p < 0,05$; P21, $p < 0,05$; P28, $p < 0,05$; IL-6: P7, $p < 0,01$; P14, $p < 0,05$; P21, $p < 0,05$; P28, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 4B e C). I livelli di IL-1β e IL-6 non hanno mostrato alterazioni significative il P35 ma hanno avuto un periodo di aumenti di rimbalzo da P42 a P63 (test-t di Student, IL-1β: P42, $p < 0,01$; P49, $p < 0,05$; P56, $p < 0,05$; P63, $p < 0,05$; IL-6: P42, $p < 0,01$; P49, $p < 0,05$; P56, $p < 0,05$; P63, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 4B e C). Il livello di TNF-α ha mostrato una tendenza simile ai livelli IL-1β e IL-6 da P14 a P70, ma solo due differenze significative sono state trovate il P21 e P42 (test-t di Student, P21, $p < 0,05$; P42, $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 4D). A tutte le età, non sono state trovate alterazioni significative per i livelli di IFN-γ (Fig. S2A) e IL-10 (Fig. S2B) tra i gruppi. Questi risultati hanno mostrato che la sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha indotto una risposta istantanea delle citochine antinfiammatorie e una successiva risposta delle citochine

proinfiammatorie nell'ippocampo dei topi, simile alla vaccinazione neonatale contro l'epatite B.

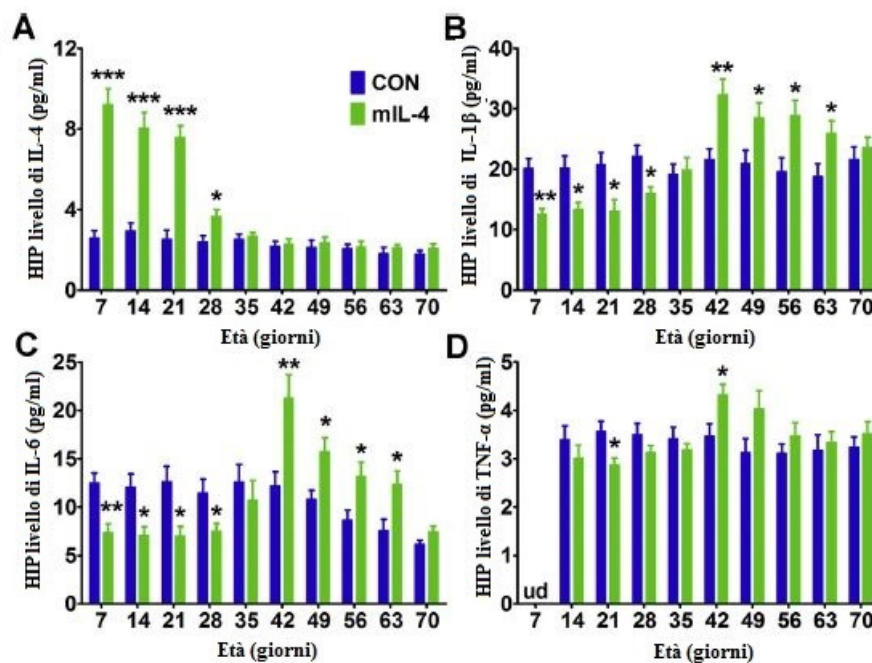


Fig. 4. La sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha imitato l'anti-infiammazione istantanea indotta da HBV e la successiva proinfiammazione nell'ippocampo. (A-D) Le barre rappresentano i livelli medi di IL-4 (A), IL-1β (B), IL-6 (C) e TNF-α (D) nell'ippocampo. I dati rappresentano le medie ± SEM. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n = 6/gruppo; test-t di Student. HIP: ippocampo; ud: non rilevabile.

3.5. La sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha imitato i deficit indotti dall'HBV nell'apprendimento spaziale e nella memoria dei topi a 8 settimane di età

Per osservare se la sovraesposizione neonatale a mIL-4 potesse imitare il deficit cognitivo spaziale transitorio indotto da HBV, a tre nuovi gruppi di topi sono state somministrate mIL-4 o PBS da P0 e sono stati sottoposti al test MWM a 4, 8 o 12 settimane di età. I punti temporali per i test sono stati determinati in base a un rapporto precedente [14]. Nel presente studio, abbiamo anche osservato gli effetti della vaccinazione neonatale dell'epatite B sulle prestazioni all'MWM dei topi a 8 settimane di età per mostrare la similitudine dei risultati del gruppo mIL-4 e del gruppo HBV nella stessa figura senza duplicare la pubblicazione dei dati del gruppo HBV nel nostro precedente lavoro [14].

I risultati hanno mostrato che nella fase di acquisizione il gruppo HBV e il gruppo mIL-4 hanno mostrato una latenza media di fuga più lunga (RM-ANOVA; HBV: gruppi x tempo: F4, 112 = 1,665, p > 0,05; gruppi: F1, 28 = 10,225, p < 0,01; tempo: F4, 112 = 16,899, p < 0,001; n = 15; mIL-4: gruppi x tempo: F4, 112 = 2,663, p < 0,05; gruppi: F1, 28 = 18,461, p < 0,001; tempo: F4, 112 = 41,144, p < 0,001; n = 15; Fig. 5A e D) rispetto ai gruppi di controllo a 8 settimane di età. Anche un percorso di nuoto medio più lungo sia per il gruppo HBV che mIL-4 (RM-ANOVA; HBV: gruppi x tempo: F4, 112 = 1,548, p > 0,05; gruppi: F1, 28 = 9,418, p < 0,01; tempo: F4, 112 = 15,921, p < 0,001; n = 15; mIL-4: gruppi x tempo: F4, 112 = 2,649, p < 0,05; gruppi: F1, 28 = 17,642, p < 0,001; tempo: F4, 112 = 37,885, p < 0,001; n = 15; Fig. 5B ed E) rispetto ai gruppi di controllo è stato osservato a 8 settimane di età. Né il gruppo HBV né quello mIL-4 hanno avuto differenze significative nella velocità rispetto ai controlli (Fig. 5C e F). Nella fase della prova esplorativa, sia il gruppo HBV che il gruppo mIL-4 hanno fatto meno attraversamenti dell'area della piattaforma (test-t di Student, HBV: p < 0,05; n = 15; mIL-4: p < 0,05; n = 15; Fig. 5G e I) e hanno trascorso meno tempo nel quadrante obiettivo (test-t di Student, HBV: p < 0,05; n = 15; mIL-4: p < 0,05; n = 15; Fig. 5H e J) rispetto ai controlli a 8 settimane di età. A 4 o 12 settimane, non ci sono state prestazioni significativamente diverse nei test MWM tra il gruppo mIL-4 e il controllo (Fig. S3).

Tutti questi risultati sono stati simili agli effetti indotti dalla vaccinazione neonatale contro l'epatite B, come riportato in precedenza [14].

Questi risultati hanno indicato che la sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha imitato i deficit indotti dall'HBV nell'apprendimento spaziale e nella memoria dei topi.

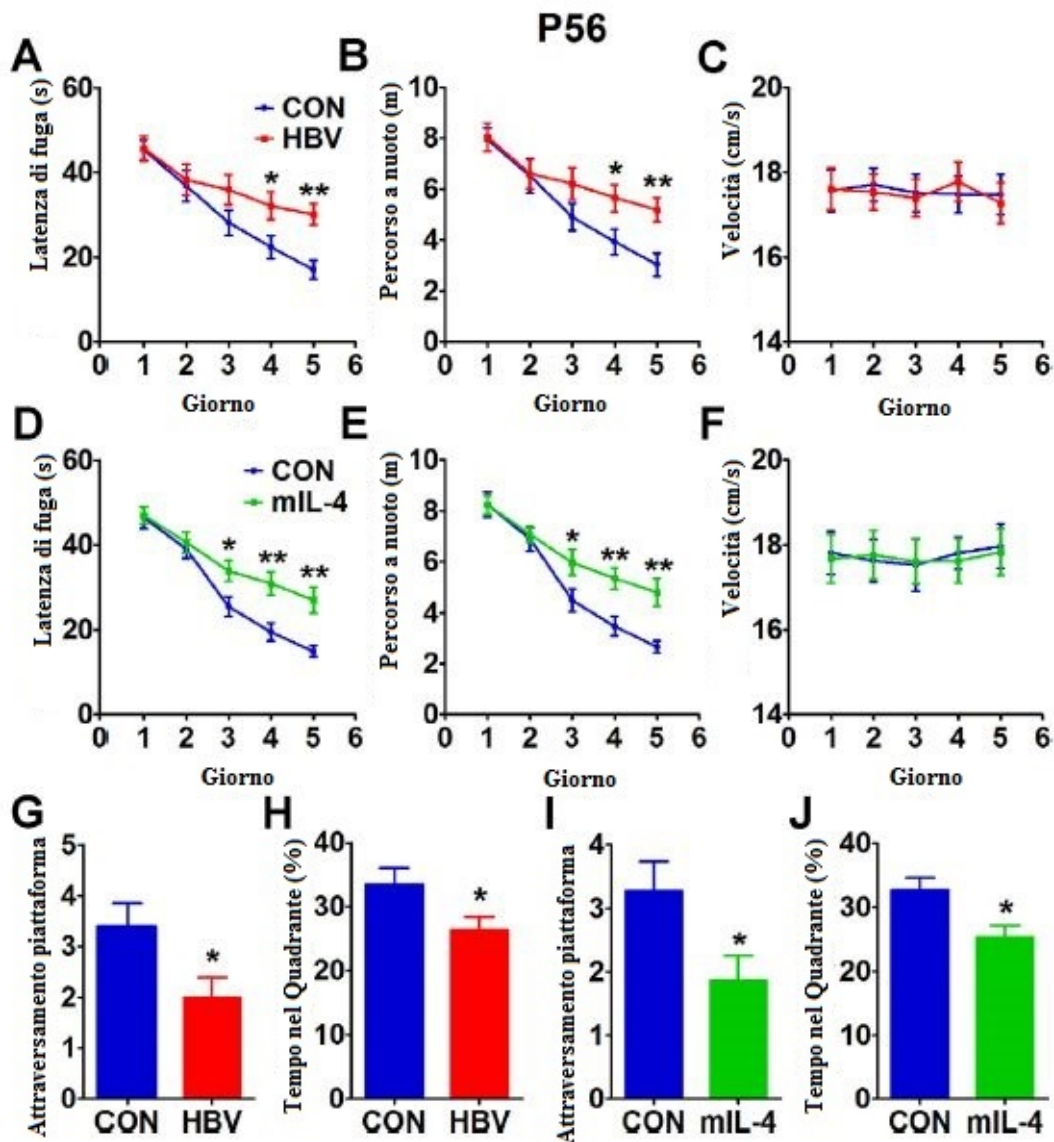


Fig. 5. La sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha imitato il deficit di cognizione spaziale indotto da HBV nel test MWM a 8 settimane di età. (A-B, D-E) La latenza media di fuga (A, D) e il percorso di nuoto medio per raggiungere la piattaforma (B, E) del gruppo HBV (A, B) e del gruppo mIL-4 (D, E) sono stati più lunghi rispetto ai controlli (RM-ANOVA a due variabili seguito dal test post hoc Bonferroni; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$: differenze significative post hoc). (C, F) I dati hanno mostrato la velocità media di nuoto dei gruppi HBV (C) e mIL-4 (F) a 8 settimane di età. (G, I) I dati hanno mostrato il numero medio di incroci con l'area della piattaforma dei gruppi HBV (G) e mIL-4 (I) (test-t di Student, * $p < 0,05$: differenze significative). (H, J) I dati indicano la proporzione del tempo medio passato nel quadrante bersaglio dal gruppo HBV (H) e il gruppo mIL-4 (J). I dati rappresentano la media \pm SEM di 15 animali per gruppo.

3.6. La vaccinazione neonatale contro l'epatite B ha indotto la neuroinfiammazione, sia attraverso la penetrazione di IL-4 attraverso la BBB (barriera ematoencefalica) nel cervello prima di P14, sia attraverso il prolungato periodo di penetrazione mediante sovraesposizione neonatale di IL-4

Quindi, abbiamo cercato di esplorare il percorso attraverso il quale IL-4 nella periferia ha colpito il cervello. I livelli di IL-4 dell'ippocampo erano correlati positivamente ai livelli di IL-4 nel siero del gruppo HBV (figura 3A-D). Inoltre, la BBB è immatura nel periodo neonatale [22,23]. Quindi, abbiamo ipotizzato che IL-4 permeando nel cervello attraverso la BBB neonatale ha mediato gli

effetti della vaccinazione contro l'epatite B sui livelli di citochine proinfiammatorie nell'ippocampo.

Ai topi è stato iniettato per via intraperitoneale il Blu di Evans il P0 e P14 per valutare l'integrità della BBB neonatale. Abbiamo osservato l'ovvia presenza del Blu di Evans nel parenchima cerebrale, specialmente nell'ippocampo il P0 (test-t di Student, corteccia prefrontale (PFC): $p < 0,05$; ippocampo (HIP): $p < 0,001$; $n = 6$; Fig. 6A e B e S4). Non c'erano infiltrazioni di colorante Blu di Evans nel cervello il P14 (Fig. 6B). Questa scoperta ha confermato che la BBB è permeabile nel periodo neonatale.

Successivamente abbiamo esaminato se la IL-4 possa infiltrarsi nel cervello durante il periodo neonatale. Ai topi sono stati iniettati per via intraperitoneale 100 ng/kg di IL-4 di ratto ricombinante (rIL-4) il P0, P3, P7 e P14. Un kit ELISA di IL-4 di ratto è stato utilizzato per testare il livello di rIL-4 nell'ippocampo dei topi 4 ore dopo. C'era presenza di rIL-4 nell'ippocampo il P0, P3 e P7, ma questa tendenza è diminuita con l'età (Fig. 6C). Il P14, l'ultimo punto temporale, non era più rintracciabile rIL-4 nell'ippocampo (Figura 6C). Questi risultati indicano che l'IL-4 può attraversare la BBB penetrando nel cervello dei topi prima di P14 perché i topi producono solo IL-4 di topo ma non rIL-4.

I risultati in Fig. 6B e C hanno mostrato che la BBB era matura e non più permeabile il P14. Tuttavia, la scoperta che i livelli di IL-4 nell'ippocampo del gruppo HBV (Fig. 1A) e il gruppo mIL-4 (Figura 4A) erano ancora più alti rispetto ai gruppi di controllo fino a P28 suggeriva che l'esposizione neonatale ad un livello elevato di IL-4 potrebbe prolungare il periodo di penetrazione dell'IL-4. Per verificare questa deduzione, abbiamo condotto un altro esperimento. Trentasei topi sono stati divisi in due gruppi. Ad un gruppo è stato somministrato per via intraperitoneale rIL-4 una volta a giorni alterni da P0 (gruppo P0) e all'altro gruppo è stato somministrato da P14 (gruppo P14). A ciascuno dei tre punti di età selezionati, P14, P21 e P28, dodici topi, 6 topi del gruppo P0 e 6 topi del gruppo P14, sono stati analizzati per il livello di rIL-4 nell'ippocampo utilizzando un kit ELISA. Il kit ha indicato la presenza di rIL-4 nell'ippocampo del gruppo P0 fino a P28, mentre non vi era alcun rIL-4 rilevabile nell'ippocampo del gruppo P14 (figura 6D) in qualsiasi punto di età. Questi risultati hanno indicato che una sovraesposizione a IL-4 durante il periodo neonatale potrebbe prolungare la penetrazione di IL-4 nell'ippocampo, suggerendo che l'iniezione di HBV a partire da P14 potrebbe non influenzare ulteriormente il cervello.

Per verificare questa possibilità, un altro gruppo di topi è stato diviso in due gruppi (18 per gruppo). Ad un gruppo è stato somministrato per via intraperitoneale l'HBV da P0 (gruppo P0) e all'altro gruppo è stato somministrato da P14 (gruppo P14). In ciascuno dei tre punti di età selezionati, P14, P21 e P28, dodici topi, 6 topi del gruppo P0 e 6 topi del gruppo P14, sono stati analizzati per il livello di IL-4 nell'ippocampo utilizzando un kit ELISA. Era presente il semplice livello basale di IL-4 nell'ippocampo del gruppo P14 il P14, P21 e P28 (Fig. 6E). Come previsto, c'era un livello significativamente più alto di IL-4 nell'ippocampo del gruppo P0 rispetto al gruppo P14 in ognuno dei tre punti di età (RM-ANOVA; gruppi x tempo: $F_{2, 20} = 9,736$, $p < 0,01$; gruppi: $F_{1, 10} = 139,92$, $p < 0,001$; tempo: $F_{2, 20} = 20,047$, $p < 0,001$; $n = 6$; Fig. 6E). Questi risultati hanno indicato che la IL-4 periferica indotta dalla vaccinazione dell'epatite B a partire da P14 non è penetrata nell'ippocampo.

Successivamente, i livelli di citochine nell'ippocampo e nel siero sono stati esaminati in topi che hanno ricevuto la vaccinazione contro l'epatite B o PBS il P14, P21 e P35. I test sono stati effettuati 4 ore dopo l'ultima iniezione. Non ci sono state alterazioni significative nei livelli ippocampali di nessuna di queste citochine tra i due gruppi (Fig. 6F), sebbene vi fossero lievi differenze nei livelli sierici di IL-4, IL-1 β e IL-6 tra i due gruppi (test-t di Student; IL-4: $p < 0,01$; IL-1 β : $p < 0,05$; IL-6: $p < 0,05$; $n = 6$; Fig. 6G). Questi risultati hanno indicato che la vaccinazione contro l'epatite B a partire da P14 non ha indotto neuroinfiammazione nell'ippocampo.

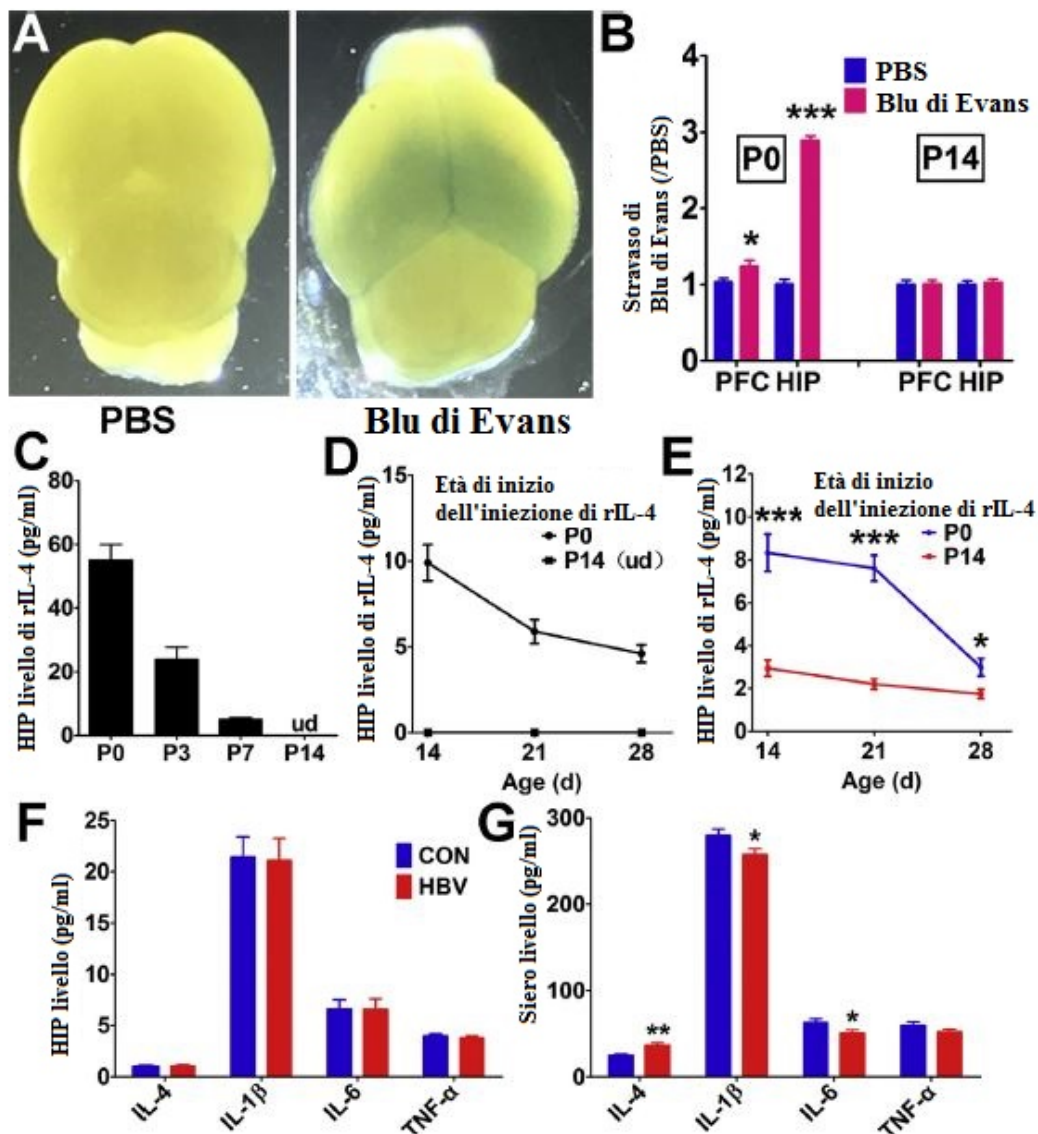


Fig. 6. La vaccinazione neonatale contro l'epatite B ha indotto neuroinfiammazione, sia attraverso la penetrazione di IL-4 attraverso la BBB nel cervello prima di P14, sia attraverso la prolungata penetrazione per la sovraesposizione neonatale a IL-4. (A) Ispezione visiva del cervello dei topi trattati con PBS e Blu di Evans, che mostrano che i topi neonati avevano una BBB immatura e permeabile. (B) Stravasato di Blu di Evans nel cervello in entrambi i gruppi. PFC: corteccia prefrontale; HIP: ippocampo. (C) La permeabilità della BBB a rIL-4 prima di P14. ud: non rilevabile. (D) L'esposizione a livelli elevati di rIL-4 prima di P14 ha aumentato la permeabilità della BBB all'infiltrazione di rIL-4 nel cervello nel periodo di vita successiva dei topi. (E) La vaccinazione neonatale contro l'epatite B iniziata prima di P14 ha aumentato la permeabilità del BBB a IL-4 che è filtrata nel cervello in età avanzata. I dati rappresentano i livelli del gruppo di topi mL-4 rispetto ai controlli. (F) La vaccinazione contro l'epatite B iniziata il P14 non ha avuto influenze significative sui livelli di citochine nell'ippocampo. (G) La vaccinazione contro l'epatite B iniziata il P14 ha alterato i livelli di IL-4, IL-1β e IL-6 nel siero. I dati rappresentano le medie ± SEM. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n = 6/gruppo; test-t di Student

3.7. La sovraesposizione neonatale a mL4 ha imitato la polarizzazione di microglia M1 indotta dall'HBV

Il nostro precedente studio ha dimostrato che la vaccinazione neonatale dell'epatite B induce la polarizzazione della microglia M1 nell'ippocampo [14]. Pertanto, abbiamo esaminato se la semplice sovraesposizione neonatale a IL-4 potesse imitare una tale risposta microgliale il P42. I topi sono stati trattati con HBV e mL-4 come descritto sopra, e il gruppo CON associato ad essi ha ricevuto PBS negli approcci corrispondenti. È stata utilizzata l'immunofluorescenza per rilevare i livelli di espressione di CD68 microgliale, un marcatore classico di attivazione microgliale proinfiammatoria [24]. I risultati hanno mostrato un significativo aumento dell'espressione di CD68 sia nel gruppo

HBV che nel gruppo mIL-4 (ANOVA a una variabile, gruppo HBV- vs CON: $p < 0,001$; gruppo mIL-4- vs. CON: $p < 0,001$; $n = 6$; Fig. 7A-J) rispetto al gruppo CON. Questo risultato ha indicato più microglia attivata e neuroinfiammazione. Inoltre, anche l'MHC-2, un altro marcatore classico di attivazione microgliale proinfiammatoria (attivazione M1) [25], è stato valutato nel nostro presente studio. I risultati hanno mostrato che sia il gruppo HBV che il gruppo mIL-4 avevano una piccola quantità di microglia (Iba-1+) che esprimeva MHC-2 (figura S5). Inoltre, non c'erano differenze significative tra i gruppi in termini di numero di microglia (Figura 7K), in linea con il nostro precedente rapporto [14].

Altri due gruppi di topi hanno ricevuto mIL-4 e PBS e sono stati sottoposti a qRT-PCR per verifiche dei livelli di mRNA di IL-1 β e IL-6, rappresentativi di geni di tipo M1, nonché dei livelli di mRNA di Ym1 e Arg, rappresentativi di geni di tipo M2 [26, 27]. I risultati hanno mostrato che i topi del gruppo mIL-4 avevano livelli significativamente aumentati di mRNA di IL-1 β (test-t di Student, $p < 0,001$; $n = 6$) e IL-6 (test-t di Student; $p < 0,001$; $n = 6$) nell'ippocampo rispetto ai controlli (Fig. 7L). Tuttavia, i livelli di mRNA di Ym1 e Arg non presentavano differenze significative tra i due gruppi (Fig. 7L). I risultati hanno mostrato che la sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha indotto la polarizzazione di microglia M1. Tutti questi risultati hanno indicato che la sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha imitato la polarizzazione di microglia M1 indotta da HBV senza alterare il loro numero nell'ippocampo. Data la sufficiente evidenza morfologica che la sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha imitato gli effetti della vaccinazione neonatale dell'epatite B sul tipo di attivazione microgliale, i test qRT-PCR sul gruppo mIL4 non sono stati ripetuti sui topi del gruppo HBV.

3.8. La sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha promosso l'attivazione di NF- κ B dopo aver causato una breve inibizione nell'ippocampo

La via di segnalazione NF- κ B svolge un ruolo chiave nell'iniziare l'espressione di citochine proinfiammatorie, tra cui IL-1 β , IL-6 e TNF- α [28, 29]. Questa transattivazione dipende principalmente dall'attivazione di p65 (relA), uno dei membri della famiglia NF- κ B [30]. Pertanto, abbiamo testato i livelli di attivazione di NF- κ B p65. Le analisi Western blot hanno rivelato che l'attivazione di p65 nell'ippocampo, rappresentata dal rapporto tra il livello di phospho-p65 e il livello totale di p65, è diminuita in modo significativo (test-t di Student, $p < 0,01$; $n = 4$; Fig. 8A e C) nel gruppo mIL-4- rispetto al gruppo CON il P21, quando i topi del gruppo mIL-4 avevano uno stato anti-infiammatorio nell'ippocampo (ad es. livelli di IL-4 più alti e livelli di IL-6 più bassi come mostrato in Fig. 4). Al contrario, l'attivazione di NF- κ B p65 è risultata significativamente aumentata (test-t di Student, $p < 0,001$; $n = 4$; Fig. 8B e D) nel gruppo mIL-4 rispetto ai controlli il P42, quando il gruppo mIL-4- ha mostrato uno stato proinfiammatorio nell'ippocampo (Fig. 4). Questi dati indicano che la sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha indotto una risposta istantanea della citochina antinfiammatoria e la successiva risposta della citochina proinfiammatoria nell'ippocampo.

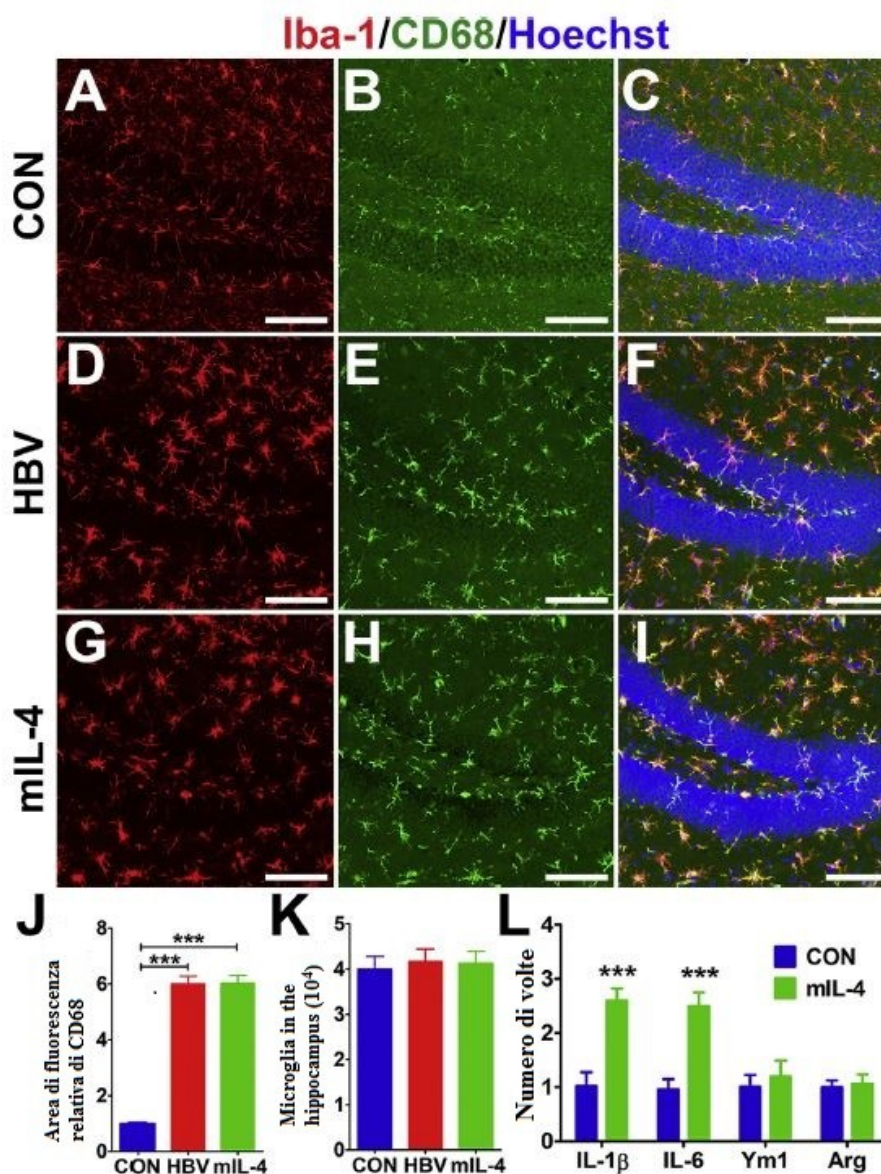


Fig. 7. La sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha imitato la polarizzazione di microglia M1 indotta da HBV (CD68+) senza alterarne il numero nell'ippocampo. (A-I) Micrografie confocali rappresentative della microglia M1 attivata (Iba-1+/CD68+) nei gruppi CON- (A-C), HBV- (D-F) e mIL-4 (G-I) il P42. Scala, 100 μ m. (J) I dati rappresentano l'area di fluorescenza relativa di CD68 nell'ippocampo in tutti i gruppi di topi. (K) I dati rappresentano il numero medio di microglia nell'ippocampo in tutti i gruppi di topi. (L) I dati rappresentano l'espressione relativa dell'mRNA dei geni di tipo M1 e M2 nell'ippocampo dei topi del gruppo mIL-4 rispetto ai controlli. I dati in (J) sono stati analizzati utilizzando ANOVA ad una variabile seguito dal test post hoc di Dunnett T3; i dati in (K) sono stati analizzati utilizzando ANOVA ad una variabile seguito dal test post hoc di Bonferroni e i dati in (L) sono stati analizzati utilizzando il test-t di Student. I dati rappresentano le medie \pm SEM. *** $p < 0,001$; $n = 6$ /gruppo.

3.9. La sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha indotto un aumento e una successiva diminuzione dell'attivazione di Stat6 nell'ippocampo

Stat6, un membro della famiglia di trasduttori del segnale e un attivatore della trascrizione [31], è un componente essenziale nella mediazione di molte funzioni biologiche di IL-4 [32-34] e IL-4 può antagonizzare l'attivazione di NF- κ B in un modo dipendente da Stat6 [35]. Il fattore di trascrizione Stat6 blocca la transattivazione di NF- κ B inibendo l'interazione di NF- κ B con il DNA. Pertanto, la via di segnalazione di Stat6 può avere un ruolo importante nell'alterazione indotta da IL-4 delle citochine nel cervello. I livelli di attivazione di Stat6 sono stati rilevati utilizzando Western blotting il P21 e P42, quando i topi del gruppo mIL-4 presentavano rispettivamente uno stato antinfiammatorio e proinfiammatorio nell'ippocampo (Fig. 4). Rispetto ai controlli, l'attivazione di Stat6 nell'ippocampo, rappresentata dal rapporto tra livello di fosfo-Stat6 e livello totale di Stat6, è

aumentata significativamente nel gruppo mIL-4 il P21 (test-t di Student, $p < 0,001$; $n = 4$; Fig. 8E e G), ma diminuito significativamente il P42 (test-t di Student; $p < 0,05$; $n = 4$; Fig. 8F e H).

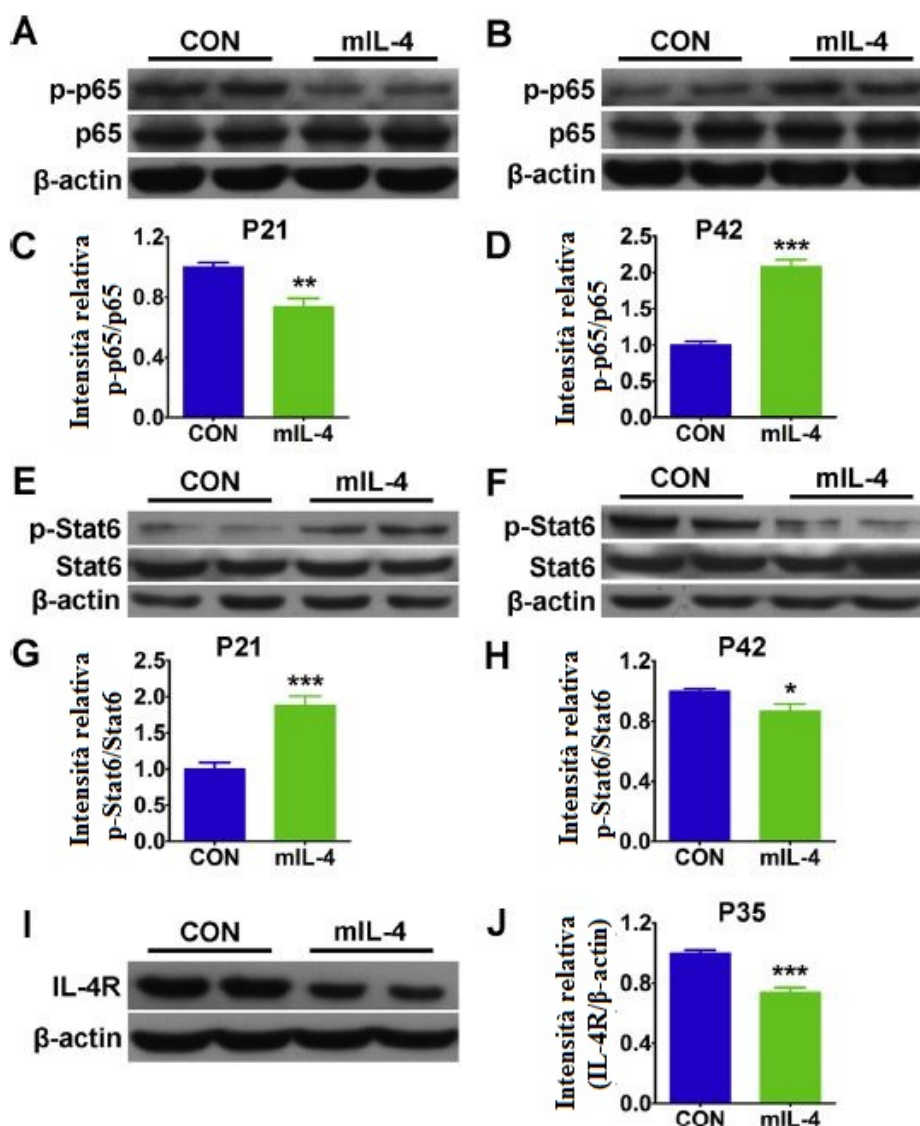


Fig. 8. Effetti della somministrazione di mIL-4 sulle vie di segnalazione NF- κ B e Stat6 e sull'espressione di IL-4R. L'analisi Western blot è stata utilizzata per l'espressione di p65, p-p65, Stat6, p-Stat6 e IL-4R. (A-D) Risultati rappresentativi per l'analisi Western blot di p-p65 e p65 il P21 (A, C) e P42 (B, D). La quantificazione relativa di p-p65 e p65 in ciascun gruppo di topi è stata normalizzata usando il livello di β -actina e presentata come il rapporto tra p-p65 e p65. (E-H) Risultati rappresentativi dell'analisi Western blot di p-Stat6 e Stat6 il P21 (E, G) e P42 (F, H). La quantificazione relativa di p-Stat6 e Stat6 in ciascun gruppo di topi è stata normalizzata usando il livello di β -actina e presentata come il rapporto tra p-Stat6 e Stat6. (I-J) Risultati rappresentativi dell'analisi Western blot di IL-4R il P35. I dati in (C), (D), (G), (H) e (J) rappresentano le media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 4$ /gruppo; test-t di Student

3.10. La sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha indotto la down-regulation transitoria del recettore IL-4

Stat6 agisce come un trasduttore immediato di segnale a valle dell'attivazione del recettore IL-4 [32-34]. Pertanto, le alterazioni nell'attivazione di Stat6 potrebbero derivare dall'alterazione della funzione di IL-4R. Inoltre, la down-regulation del recettore si verifica spesso quando è esposta a livelli elevati di ligando [36]. Quindi, abbiamo ipotizzato che la down-regulation di IL-4R potesse essere indotta dalla somministrazione di mIL-4 esogeno. I livelli di IL-4R sono stati rilevati utilizzando il Western blot il P35 nel gruppo mIL-4. Il giorno postnatale 35 è stato scelto per questa analisi perché era l'età in cui i livelli elevati di IL-4 nell'ippocampo indotti dall'iniezione neonatale dell'HBV o dell'IL-4 ritornavano a livelli normali (Figura 1A; Fig. 4A). Come previsto, i livelli di

IL-4R nell'ippocampo sono diminuiti significativamente nel gruppo mIL-4 rispetto ai controlli (test-t di Student, $p < 0,001$; $n = 4$; Fig. 8I e J).

Inoltre, questa down-regulation di IL-4R non è stata osservata nel gruppo mIL-4 il P70 quando la neuroinfiammazione indotta dall'iniezione di HBV o IL-4 è stata completamente ripristinata (Fig. 1; Fig. 4) (dati non mostrati). Questi risultati hanno dimostrato che la sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha indotto la down-regulation transitoria del recettore IL-4. Questo fenomeno spiega il ripristino dei livelli ippocampali delle citochine proinfiammatorie e dei disturbi della cognizione spaziale.

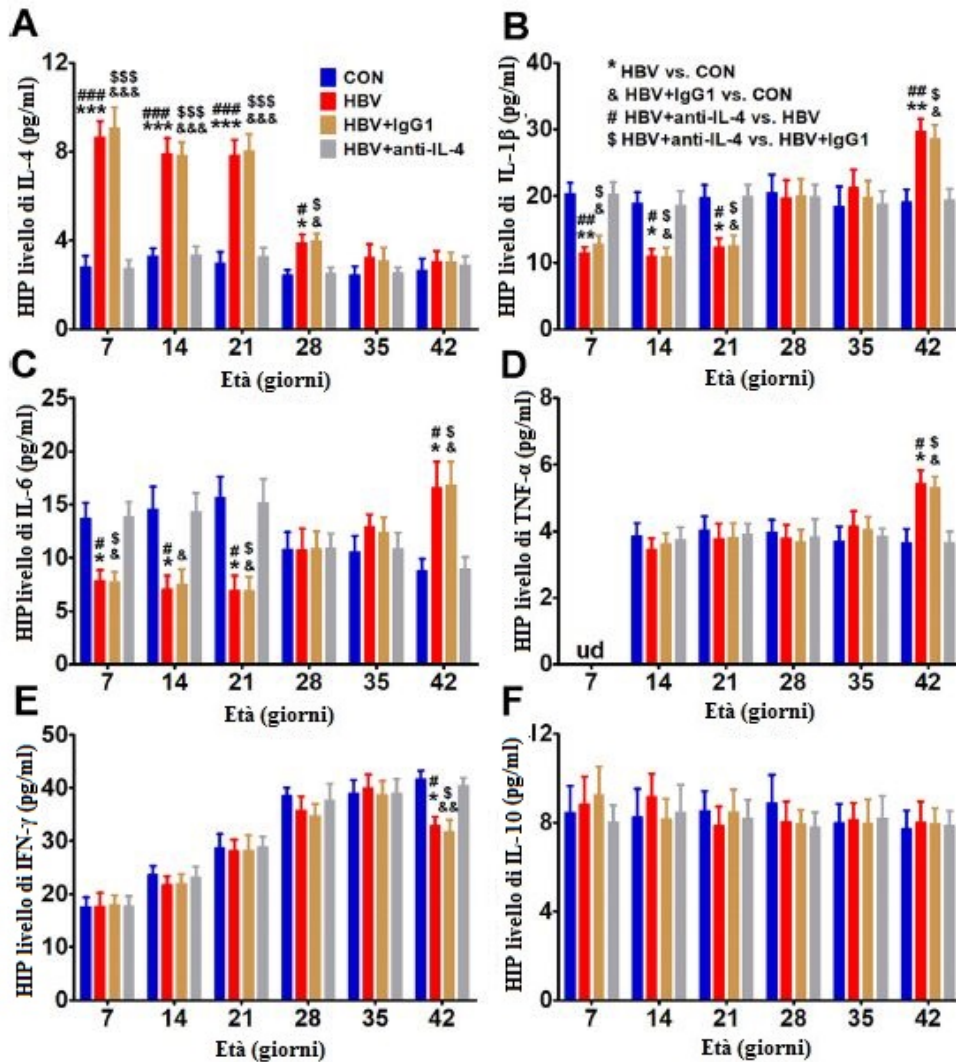


Fig. 9. La neutralizzazione di IL-4 blocca il cambiamento dell'espressione di citochine nell'ippocampo indotto dalla vaccinazione neonatale dell'epatite B. (A-F) Le barre rappresentano i livelli medi di IL-4 (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), TNF- α (D), IFN- γ (E) e IL-10 (F) nell'ippocampo. I dati rappresentano le medie \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; & $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; \$ $p < 0,05$; \$\$\$ $p < 0,001$. I dati sono stati analizzati utilizzando ANOVA a una variabile seguita dal test post hoc di Bonferroni. $n = 6$ /gruppo. HIP: ippocampo; ud: non rilevabile.

3.11. La neutralizzazione di IL-4 blocca il cambiamento dell'espressione di citochine nell'ippocampo e i disturbi dell'apprendimento spaziale e della memoria a 8 settimane di età indotte dalla vaccinazione neonatale contro l'epatite B

Per confermare il ruolo dell'IL-4 nella mediazione delle influenze della vaccinazione neonatale contro l'epatite B sull'espressione di citochine dell'ippocampo e la cognizione spaziale, abbiamo eseguito un altro esperimento utilizzando l'anticorpo monoclonale (mAb) che neutralizza l'IL-4 e un isotipo IgG1. Abbiamo scoperto che la somministrazione di mAb anti IL-4 ha bloccato la sovra-produzione di IL-4 nel sangue sistemico in tutti i punti di età di rilevamento (ANOVA a una variabile, gruppo HBV+anti-IL-4 in confronto a gruppo CON: $p > 0,05$; $n = 6$; Fig. S6) ma la

somministrazione dell'isotipo IgG1 non è riuscita a bloccare la sovraespressione periferica di IL-4 indotta da HBV (ANOVA a una variabile; gruppo HBV + IgG1 vs gruppo CON: $p < 0,05$; gruppo HBV + IgG1 vs gruppo HBV: $p > 0,05$; $n = 6$; Fig. S6).

Quindi, abbiamo scoperto che la neutralizzazione di IL-4 bloccava le alterazioni indotte da HBV sia nell'espressione di citochine ipocampali (ANOVA a una variabile, gruppo HBV + anti-IL-4 vs gruppo CON: $p > 0,05$; $n = 6$; Fig. 9) che nelle prestazioni nei test MWM dei topi di 8 settimane (RM-ANOVA; gruppo HBV + anti-IL-4 vs gruppo CON: $p > 0,05$; $n = 12$; Fig.10), mentre la somministrazione dell'isotipo IgG1 non ha mostrato effetti significativi sul blocco di quelle alterazioni indotte dall'HBV (figure 9 e 10).

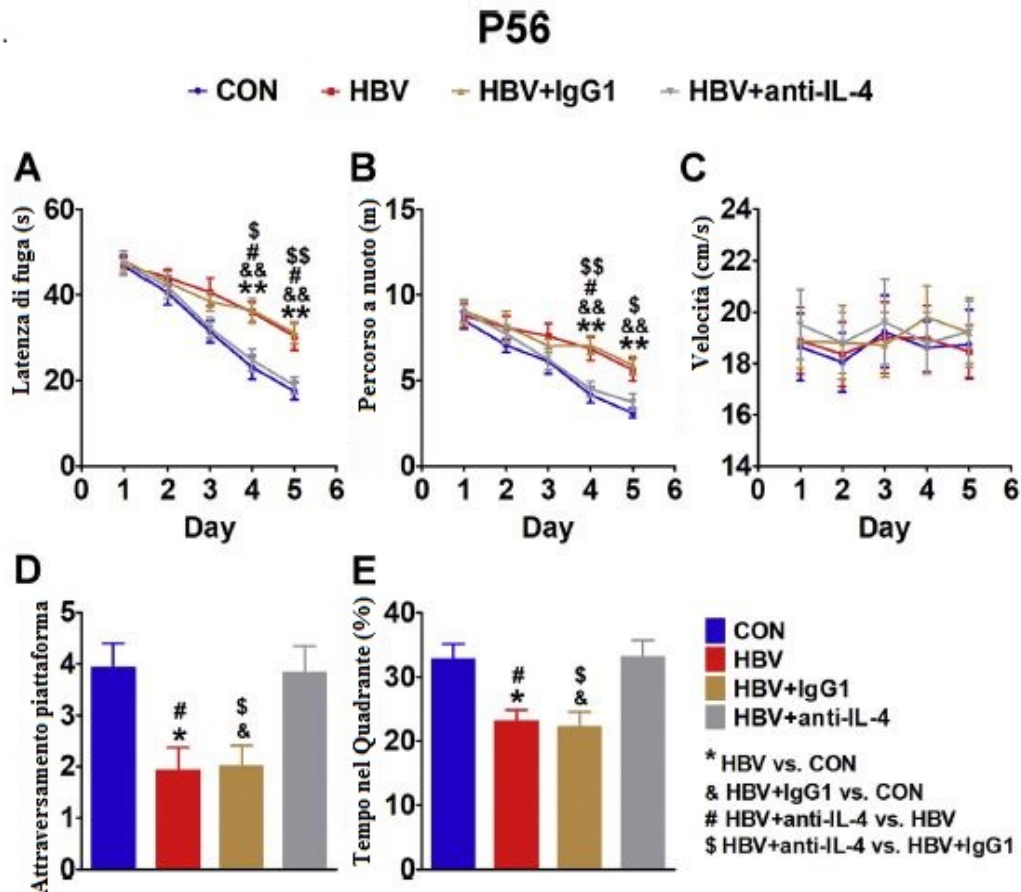


Fig. 10. La neutralizzazione di IL-4 blocca le alterazioni dell'apprendimento spaziale e della memoria dei topi di 8 settimane di età indotte dalla vaccinazione neonatale contro l'epatite B. (A) Latenza media di fuga dei topi per raggiungere la piattaforma. (B) Percorso di nuoto medio dei topi per raggiungere la piattaforma. (C) I dati hanno mostrato la velocità media di nuoto dei topi a 8 settimane di età. (D) I dati hanno mostrato il numero medio di attraversamenti dell'area della piattaforma da parte dei topi. (E) I dati indicano la proporzione del tempo medio passato dai topi nel quadrante bersaglio. I dati rappresentano le medie \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; & $p < 0,05$; && $p < 0,01$; # $p < 0,05$; \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$. I dati in A-C sono stati analizzati utilizzando RM-ANOVA a due variabili seguito dal test post hoc di Bonferroni ed i dati in D ed E sono stati analizzati utilizzando ANOVA a una variabile seguito dal test post hoc di Bonferroni; $n = 12$ /gruppo.

4. Discussione

Il nostro precedente lavoro ha mostrato che la vaccinazione neonatale contro l'epatite B ha portato a disturbi transitori della cognizione spaziale nei topi di 8 settimane di età, oltre a un profilo proinfiammatorio dell'espressione di citochine nell'ippocampo [14]. L'IL-4 è stata la principale citochina nella periferia indotta dall'HBV che abbiamo usato [15, 16]. L'IL-4 stesso è una potente citochina antinfiammatoria che induce la risposta antinfiammatoria e inibisce la produzione di citochine proinfiammatorie [18]. Ciò sembra contrario alla risposta della citochina proinfiammatoria dell'ippocampo trovata nei topi immunizzati con HBV nel periodo neonatale. Pertanto, il presente studio è stato condotto per indagare sulla possibile ragione. Abbiamo scoperto innanzitutto che l'HBV ha indotto un'anti infiammazione nella periferia, indicata da livelli elevati

di IL-4 e livelli diminuiti di citochine proinfiammatorie. Inoltre, IL-4 ha avuto la maggiore ampiezza e la più duratura alterazione indotta dall'HBV tra queste citochine testate. Dopo aver osservato la correlazione positiva tra il livello di IL-4 nella periferia e quello nell'ippocampo, sono stati eseguiti una serie di esperimenti per esaminare gli effetti della sovraespressione neonatale di IL-4 sul cervello. Alla fine, il presente studio fornisce prove dirette mediante la neutralizzazione di IL-4, sostenendo che IL-4 media un disturbo neurocomportamentale ritardato indotto dalla vaccinazione neonatale dell'epatite B che coinvolge la down-regulation del recettore IL-4 nell'ippocampo.

In particolare, il disturbo comportamentale è apparso in topi di 8 settimane di età (Fig. 5), proprio durante l'età (P42-P63) in cui i topi mostravano la neuroinfiammazione ritardata dell'ippocampo sia nel gruppo HBV che nel gruppo mIL-4- (Figure 1 e 4). Questo fenomeno suggerisce che la latenza per i disturbi comportamentali emergenti nel gruppo HBV e nel gruppo mIL-4 può essere spiegata dall'anti infiammazione istantanea causata da IL-4 (Figure 1 e 4). Lo stesso fenomeno suggerisce anche che il ripristino dei disturbi comportamentali a 12 settimane di età nel gruppo HBV e nel gruppo mIL-4- può essere spiegato dal ripristino della risposta proinfiammatoria nell'ippocampo da P70 (Figure 1 e 4).

Come affermato nella sezione Introduzione, il periodo postnatale precoce è un periodo critico dello sviluppo cerebrale, quando l'attivazione immunitaria durante questo periodo potrebbe esercitare un impatto duraturo sullo sviluppo del cervello e sul comportamento [2-5]. Tuttavia, l'esatto meccanismo nel periodo critico per l'attivazione immunitaria che colpisce il cervello non è ancora completamente compreso. Qui, abbiamo scoperto non solo la permeabilità della BBB neonatale a IL-4 prima di P14 ma anche la permeabilità prolungata della BBB a IL-4 per sovraesposizione neonatale a mIL-4. I risultati attuali suggeriscono che sia la permeabilità della BBB neonatale alle citochine sia la sua regolazione possono fornire una spiegazione ragionevole della natura di questo periodo critico, anche se necessita di ulteriori indagini per aumentare la chiarezza su come avviene il prolungamento della permeabilità della BBB.

I risultati in 3.8, 3.9 e 3.10 hanno suggerito che la sovraesposizione neonatale a mIL-4 ha indotto la down-regulation del recettore IL-4 nell'ippocampo, che quindi portava ad una diminuzione dell'attivazione di Stat6 e alla fine portava ad un livello più alto di attivazione di NF- κ B. Questi eventi seriali relativi alle vie di segnalazione di IL-4R/Stat6 e NF- κ B possono spiegare le influenze della vaccinazione neonatale contro l'epatite B sul cervello.

Nel nostro precedente studio [14], è stato verificato che l'adiuvante idrossido di alluminio contenuto nel vaccino HBV non induce alterazioni significative nell'espressione di citochine sia nella periferia che nel cervello e nelle prestazioni comportamentali. Questi risultati hanno suggerito che le risposte immunitarie dell'HBV sono innescate dall'intero vaccino (adiuvante di idrossido di alluminio + HbsAg), ma non da un adiuvante di idrossido di alluminio da solo. Pertanto, nel nostro attuale studio non sono stati osservati gli effetti dell'adiuvante idrossido di alluminio da solo.

Dati i rapporti secondo cui vari stimoli immunitari neonatali influenzano lo sviluppo del cervello e il comportamento [2, 6, 37], è possibile che una sovraesposizione ad altre citochine abbia anche un impatto significativo sulla funzione a lungo termine. Affrontare questo problema sarebbe significativo. Condurremo ulteriori studi con citochine diverse con cui spesso avviene la sovraesposizione neonatale, come IFN- γ e IL-6. Tuttavia, il presente studio è stato progettato per esplorare il meccanismo mediante il quale l'iniezione neonatale di HBV ha interessato il cervello e il comportamento. Sebbene il vaccino possa aumentare i livelli di diverse citochine oltre a IL-4, IL-4 è stata l'unica citochina ad avere una correlazione significativa tra i livelli nel siero e i livelli nell'ippocampo (Figura 3A-D) ed è stata la citochina ad avere la massima ampiezza di aumento sia nell'ippocampo che nel siero del gruppo HBV (Figure 1A e 2A). Inoltre, l'mAb anti-IL-4 ha bloccato sia le alterazioni dell'espressione delle citochine ippocampali che i disturbi del comportamento indotti dall'HBV. Di conseguenza, è molto probabile che l'IL-4 abbia un ruolo chiave nella mediazione dei disturbi neurocomportamentali ritardati indotti dalla vaccinazione neonatale dell'epatite B.

Una domanda interessante è quale popolazione di cellule nell'ippocampo sia coinvolta nel

processo di segnalazione alterato di cui sopra, e affrontare questa domanda contribuirà a una migliore comprensione dei disturbi neurocomportamentali indotti da IL-4 a livello cellulare. Attualmente stiamo lavorando su questo problema. Tuttavia, lo affronteremo in futuro perché l'ipotesi scientifica del presente lavoro secondo cui IL-4 può mediare i disturbi neurocomportamentali causati dalla vaccinazione neonatale contro l'epatite B è già stata supportata dai dati sia indiretti che diretti forniti dallo studio corrente.

5. Conclusioni

La nostra attuale ricerca dimostra che IL-4 media i disturbi neurocomportamentali ritardati indotti dalla vaccinazione neonatale dell'epatite B, che coinvolge la permeabilità della BBB neonatale e la down-regulation del recettore IL-4. Questa conclusione è stata fatta sulla base di questi risultati principali: 1) la vaccinazione neonatale contro l'epatite B ha indotto una neuroinfiammazione ritardata dell'ippocampo e una disfunzione della cognizione spaziale dopo una risposta istantanea delle citochine antinfiammatorie nell'ippocampo; 2) la sovraesposizione neonatale a IL-4 ha imitato tutti gli effetti neurocomportamentali indotti da HBV; 3) l'IL-4 periferica è in grado di penetrare nell'ippocampo durante il periodo neonatale; e 4) la permeabilità della BBB nei topi neonati potrebbe spiegare la penetrazione dell'IL-4 periferica nel cervello e 5) i livelli diminuiti di IL-4R nell'ippocampo per sovraesposizione neonatale a IL-4.

Questi risultati suggeriscono che eventi clinici che coinvolgono la sovraesposizione neonatale a IL-4, inclusa la vaccinazione neonatale contro l'epatite B e l'asma nei neonati umani, possono avere effetti avversi sullo sviluppo neurocomportamentale.

6. Dichiarazione di conflitto di interessi

Gli autori dichiarano che non c'è nessun conflitto di interessi

7. Finanziamento

Il lavoro è stato sostenuto dalla Fondazione Nazionale di Scienze Naturali della Cina (n.31.371.130 e 31600836), dalla Fondazione Speciale del Dipartimento dell'Istruzione della Provincia del Guangdong, dalla Fondazione di Ricerca Scientifica Medica della Provincia del Guangdong, Cina (2013-159) e dalla Fondazione di Ricerca Scientifica e Tecnologica di Medicina della provincia di Guangdong (A2016273)

Riconoscimenti

Ringraziamo il Dr. Juntao Zou (SYSU), il Dr. Kaihua Guo (SYSU), la signorina Qunfang Yuan (SYSU), il Dr. Yingying Wu (SYSU), il Dr. Yunjie Yang (SYSU) e il Dr. Zitian He (SYSU) per le loro preziose discussioni e l'aiuto per questa indagine.

Appendice A. Materiale supplementare

Dati supplementari associati a questo articolo possono essere trovati, nella versione online, all'indirizzo <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.04.037>.

Riferimenti

[1] C.f.D. Control, Prevention, Global routine vaccination coverage—2012, MMWR. Morbidity and mortality weekly report 62(43) (2013) 858.

- [2] S.D. Bilbo, J.M. Schwarz, Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system, *Front. Behavioral Neurosci.* 3 (2009) 14.
- [3] S.D. Bilbo, J.M. Schwarz, The immune system and developmental programming of brain and behavior, *Front. Neuroendocrinol.* 33 (3) (2012) 267–286.
- [4] Y. Xia, F. Qi, J. Zou, J. Yang, Z. Yao, Influenza vaccination during early pregnancy contributes to neurogenesis and behavioral function in offspring, *Brain Behav. Immun.* 42 (2014) 212–221.
- [5] S.S. French, E.M. Chester, G.E. Demas, Maternal immune activation affects litter success, size and neuroendocrine responses related to behavior in adult offspring, *Physiol. Behav.* 119 (2013) 175–184.
- [6] S.D. Bilbo, L.H. Levkoff, J.H. Mahoney, L.R. Watkins, J.W. Rudy, S.F. Maier, Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood, *Behav. Neurosci.* 119 (1) (2005) 293.
- [7] S.J. Spencer, J.G. Heida, Q.J. Pittman, Early life immune challenge—effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety, *Behav. Brain Res.* 164 (2) (2005) 231–238.
- [8] F.R. Walker, J. March, D.M. Hodgson, Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat, *Behav. Brain Res.* 154 (1) (2004) 63–69.
- [9] C.M. Gallagher, M.S. Goodman, Hepatitis B vaccination of male neonates and autism diagnosis, NHIS 1997–2002, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 73 (24) (2010) 1665–1677.
- [10] M.A. Hernán, S.S. Jick, M.J. Olek, H. Jick, Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis A prospective study, *Neurology* 63 (5) (2004) 838–842.
- [11] J.P. Stubgen, Immune-mediated myelitis following hepatitis B vaccination, *Autoimmun. Reviews* 12 (2) (2012) 144–149.
- [12] C. Institute of Medicine Immunization Safety Review, The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health, Immunization Safety Review: Vaccines and Autism, National Academies Press (US) National Academy of Sciences, Washington (DC), 2004.
- [13] G.L. Freed S.J. Clark A.T. Butchart D.C. Singer M.M. Davis Parental vaccine safety concerns in 2009 *Pediatrics* 125 4 2010 654 9.
- [14] J. Yang, F. Qi, Y. Yang, Q. Yuan, J. Zou, K. Guo, Z. Yao, Neonatal hepatitis B vaccination impaired the behavior and neurogenesis of mice transiently in early adulthood, *Psychoneuroendocrinology* 73 (2016) 166–176.
- [15] S.H. Moon, E.C. Shin, Y.W. Noh, Y.T. Lim, Evaluation of hyaluronic acid-based combination adjuvant containing monophosphoryl lipid A and aluminum salt for hepatitis B vaccine, *Vaccine* 33 (38) (2015) 4762–4769.
- [16] R.D. Weeratna, C.L. Brazolot Millan, M.J. McCluskie, H.L. Davis, CpG ODN can redirect the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32 (1) (2001) 65–71.
- [17] R. Yirmiya, I. Goshen, Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis, *Brain Behav. Immun.* 25 (2) (2011) 181–213.
- [18] A.J. Schuerwegh, E.J. Dombrecht, W.J. Stevens, J.F. Van Offel, C.H. Bridts, L.S. De Clerck, Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function, *Osteoarthritis Cartilage* 11 (9) (2003) 681–687.
- [19] E.E. Mast, M.J. Alter, H.S. Margolis, Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective, *Vaccine* 17 (13–14) (1999) 1730–1733.
- [20] F. Yang, L. Zhou, D. Wang, Z. Wang, Q.Y. Huang, Minocycline ameliorates hypoxia-induced blood-brain barrier damage by inhibition of HIF-1alpha through SIRT-3/ PHD-2 degradation pathway, *Neuroscience* 304 (2015) 250–259.
- [21] Y.-W. Tang, B.S. Graham, Anti-IL-4 treatment at immunization modulates cytokine expression, reduces illness, and increases cytotoxic T lymphocyte activity in mice challenged with respiratory syncytial virus, *J. Clin. Invest.* 94 (5) (1994) 1953–1958.
- [22] K.D. Foust, E. Nurre, C.L. Montgomery, A. Hernandez, C.M. Chan, B.K. Kaspar, Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes, *Nat. Biotechnol.* 27 (1) (2009) 59–65.
- [23] N.R. Saunders, Ontogeny of the blood-brain barrier, *Exper. Eye Res.* 25 (1977) 523–550.
- [24] N.N. Burke, D.M. Kerr, O. Moriarty, D.P. Finn, M. Roche, Minocycline modulates neuropathic pain behaviour and cortical M1–M2 microglial gene expression in a rat model of depression, *Brain Behav. Immun.* 42 (2014) 147–156.
- [25] Y. Shi, V. Chanana, J.J. Watters, P. Ferrazzano, D. Sun, Role of sodium/hydrogen exchanger isoform 1 in microglial activation and proinflammatory responses in ischemic brains, *J. Neurochem.* 119 (1) (2011) 124–135.
- [26] M. Olah, K. Biber, J. Vinet, H.W. Boddeke, Microglia phenotype diversity, *CNS & Neurol. Disorders Drug Targets* 10 (1) (2011) 108–118.
- [27] C.Y. Xia, S. Zhang, Y. Gao, Z.Z. Wang, N.H. Chen, Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment, *Int. Immunopharmacology* 25 (2) (2015) 377–382.
- [28] M. Karin, M. Delhase, The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling, Elsevier, *Seminars in immunology*, 2000, pp. 85–98.
- [29] M. Karin, Y. Ben-Neriah, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity, *Annual Rev. Immunol.* 18 (2000) 621–663.
- [30] D.Q. Xie, G.Y. Sun, X.G. Zhang, H. Gan, Osthole preconditioning protects rats against renal ischemia-reperfusion injury, *Transplant. Proc.* 47 (6) (2015) 1620–1626.
- [31] L.A. Doyle, M. Vivero, C.D. Fletcher, F. Mertens, J.L. Hornick, Nuclear expression of STAT6 distinguishes solitary fibrous tumor from histologic mimics, *Modern Pathol.*
- [32] C.K. Oh, G.P. Geba, N. Molfino, Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma, *Eur. Respirat. Rev. : an official journal of the European Respiratory Society* 19 (115) (2010) 46–54.
- [33] S. Chapoval, P. Dasgupta, N.J. Dorsey, A.D. Keegan, Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6, *J. Leukocyte Biol.* 87 (6) (2010) 1011–1018.
- [34] E. Forbes, N. van Panhuys, B. Min, G. Le Gros, Differential requirements for IL-4/ STAT6 signalling in CD4 T-cell fate determination and Th2-immune effector responses, *Immunol. Cell Biol.* 88 (3) (2010) 240–243.
- [35] Y. Abu-Amer, IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF- κ B, *J. Clin. Invest.* 107 (11) (2001) 1375–1385.
- [36] M.M. Chi, A.L. Schlein, K.H. Moley, High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor, *Endocrinology* 141 (12) (2000) 4784–4792.
- [37] C.S. Custodio, B.S.F. Mello, A. Filho, C.N. de Carvalho Lima, R.C. Cordeiro, F. Miyajima, G.Z. Reus, S.M.M. Vasconcelos, T. Barichello, J. Quevedo, A.C. De Oliveira, D.F. de Lucena, D.S. Macedo, Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age-related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders, *Molecul. Neurobiol.* (2017).