



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad de Ciencias

Evaluación de astrocitos y microglia en el
hipocampo de ratones con fenotipo autista
(cepa C58/J)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
JUAN FRANCISCO DUARTE CAMPOS



ASESORA:
DRA. MARISOL DE LA FUENTE GRANADA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.
2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Duarte
Campos
Juan Francisco
5512636067
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
313198744

2. Datos del tutor

Dra.
Marisol
De La Fuente
Granada

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Aliesha Araceli
González
Arenas

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Anahí
Chavarría
Krauser

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Yazmín
Cortés

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Marisol
Orozco
Ibarra

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de astrocitos y microglia en el hipocampo de ratones con fenotipo autista (cepa C58/J)
94 pp
2020



Este trabajo fue realizado en el
Laboratorio C-138 del
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Nueva Sede.
Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos académicos

A la M. en C. Marisol De La Fuente Granada, mi tutora, por sus invaluable enseñanzas como profesora y como directora de tesis.

A la Dra. Aliesha González, quien dirige el laboratorio donde se realizó el presente proyecto, por sus valiosas observaciones durante el desarrollo de mi trabajo y por sus comentarios sobre mi trabajo escrito. Gracias por abrirme las puertas de su espacio de trabajo.

A la Dra. Anahí Chavarría Krauser, la Dra. Marisol Orozco Ibarra y a la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, por sus oportunos comentarios y sugerencias que contribuyeron a mejorar la versión final de este trabajo escrito.

Al proyecto DGAPA-PAPIIT IN219719 y al Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez, por el otorgamiento de la beca de finalización de estudios durante la realización de este trabajo.

Al Técnico Académico Miguel Tapia Rodríguez de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por su disposición y apoyo en la adquisición de imágenes de microscopía confocal.

A la Técnico Académico Mónica Martínez Marcial de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo en la reproducción y el mantenimiento de los animales utilizados en el presente proyecto.

A la cDra. Isabel Cristina Barón Mendoza, por su guía técnica y teórica que fueron fundamentales para el desarrollo de mi trabajo experimental de tesis.

A la Dra. Anahi Valdés Rives, por su apoyo en la adquisición de las imágenes de microscopía confocal.

Finalmente, un enorme agradecimiento a la Facultad de Ciencias y a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segundo hogar. Estoy convencido de que las instituciones están formadas por las personas y las identidades que le dan vida todos los días. Por brindarme un espacio diverso e incluyente, que propicia el encuentro y la discusión de ideas.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (Proyecto IN219719). Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Contenido

| | | |
|-------|--|-----|
| II. | Lista de figuras | III |
| III. | Lista de tablas..... | IV |
| 1. | RESUMEN..... | 1 |
| 2. | INTRODUCCIÓN | 2 |
| 3. | ANTECEDENTES..... | 4 |
| 3.1 | Trastorno del Espectro Autista (TEA) | 4 |
| 3.1.1 | Definición | 4 |
| 3.1.2 | Epidemiología..... | 5 |
| 3.1.3 | Diagnóstico | 7 |
| 3.1.4 | Etiología..... | 10 |
| 3.2 | Hipocampo | 11 |
| 3.2.1 | Neuroanatomía..... | 12 |
| 3.2.2 | Conexiones..... | 14 |
| 3.2.3 | Implicación del hipocampo en el TEA..... | 17 |
| 3.3 | Células de la glía | 18 |
| 3.3.1 | Oligodendroglía..... | 19 |
| 3.3.2 | Microglía..... | 21 |
| 3.3.3 | Astroglía | 24 |
| 3.3.4 | Células ependimarias..... | 26 |
| 3.3.5 | Alteraciones de la glía asociadas al TEA | 27 |
| 3.4 | Modelos animales no humanos para el estudio del TEA | 30 |
| 3.4.1 | La cepa murina C58/J como modelo de estudio del TEA..... | 33 |
| 4. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 34 |
| 5. | HIPÓTESIS | 35 |
| 6. | OBJETIVOS | 35 |
| 7. | PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL..... | 36 |
| 7.1 | Animales | 36 |
| 7.2 | Cuantificación de proteínas gliales en el hipocampo de ratones con fenotipo autista..... | 36 |
| 7.2.1 | Obtención de muestras de tejido hipocampal fresco y extracción de proteínas..... | 36 |

| | | |
|---------------|---|----|
| 7.2.2 | Electroforesis en gel y <i>western blot</i> | 37 |
| 7.3 | Perfusión y obtención de cerebros para cortes y tinciones histológicas | 38 |
| 7.3.1 | Tinción de Nissl..... | 39 |
| 7.3.2 | Inmunofluorescencia..... | 39 |
| 7.4 | Microscopía y análisis de imágenes..... | 39 |
| 7.5 | Análisis estadístico | 40 |
| 8. | RESULTADOS | 41 |
| 8.1 | Contenido de las proteínas GFAP e Iba-1 en el hipocampo de ratones tipo autista..... | 41 |
| 8.2 | Evaluación del número de astrocitos y microglía en la región CA1 del hipocampo de ratones tipo autista..... | 41 |
| 8.3 | Evaluación de la morfología de la microglía en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista..... | 46 |
| 9. | DISCUSIÓN | 52 |
| 10. | CONCLUSIONES | 61 |
| 11. | PERSPECTIVAS | 61 |
| 12. | REFERENCIAS | 62 |
| Apéndice I. | Lista de reactivos..... | 91 |
| Apéndice II. | Lista de soluciones..... | 92 |
| Apéndice III. | Lista de anticuerpos..... | 94 |

I. Lista de abreviaturas

| | |
|----------------------|---|
| A | Alveus |
| AC | Área de la célula |
| ACE | Área convexa envolvente |
| AF | Alexa Fluor® |
| AIM | Activación inmune materna |
| APA | Asociación Americana de Psiquiatría |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado de cerebro |
| BZD | Benzodiacepina |
| CA | <i>Cornu Ammonis</i> |
| CC | Cuerpo calloso |
| CD | Clúster de diferenciación |
| CICUAL | Comité Institucional del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio |
| CPF | Corteza prefrontal |
| CPFdl | Corteza prefrontal dorsolateral |
| CR3 | Receptor a complemento 3 |
| CX3CR1 | Receptor 1 a quimiocina CX3C |
| DC | Densidad de la célula |
| D_F | Dimensión fractal |
| DSM | Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales |
| EGC | Células de la glía endimaria |
| FXS | Síndrome de X frágil |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GD | Giro dentado |
| GFAP | Proteína glial fibrilar ácida |
| GM-CSF | Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos |
| HLA | Antígeno leucocitario humano |
| HRP | Peroxidasa de rábano |
| ICD | Clasificación Internacional de Enfermedades |
| IFN | Interferón |
| IL | Interleucina |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| IMF | Intensidad media de fluorescencia |
| MBP | Proteína básica de mielina |
| MeCP2 | Proteína de unión metil-CpG 2 |
| MHC | Complejo principal de histocompatibilidad |
| NCHS | Centro Nacional para Estadísticas en Salud |
| OPC | Célula progenitora de oligodendrocitos |
| PBS | <i>Buffer</i> salino de fosfatos |
| PC | Perímetro de la célula |
| PDGFR | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PFA | Paraformaldehído |
| S | Silvestre |
| SL | <i>Stratum lucidum</i> |
| SM | <i>Stratum moleculare</i> |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SO | <i>Stratum oriens</i> |
| SPi | Estrato piramidal |

| | |
|--------------|---|
| SR | <i>Stratum radiatum</i> |
| TDAH | Trastorno de déficit de atención e hiperactividad |
| TEA | Trastorno del espectro autista |
| TND | Trastornos del neurodesarrollo |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TSP-1 | Trombospondina 1 |
| UA | Unidad de área |
| VPA | Ácido valproico |
| WHO | Organización Mundial de la Salud |
| ZSG | Zona subgranular |
| ZSV | Zona subventricular |

II. Lista de figuras

- Figura 1.** Ubicación anatómica e histología del hipocampo en ratones y en humanos.
- Figura 2.** Representación esquemática de la conectividad en el hipocampo.
- Figura 3.** El papel de las células de la glía en la homeostasis del sistema nervioso central.
- Figura 4.** La relación entre neuronas y células de la glía en condiciones fisiológicas y disruptivas durante el TEA.
- Figura 5.** Localización de la región CA1 del hipocampo.
- Figura 6.** El contenido de las proteínas GFAP e Iba-1 presenta modificaciones en el hipocampo de los ratones tipo autista.
- Figura 7.** Evaluación de astrocitos y microglía en la región CA1 del hipocampo de ratones silvestres y tipo autista.
- Figura 8.** Los números de astrocitos y de microglía por unidad de área en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista C58/J están alterados.
- Figura 9.** Los ratones de la cepa tipo autista presentan zonas inmunorreactivas a GFAP en el parénquima del hipocampo.
- Figura 10.** Los parámetros morfológicos de la microglía derivados de análisis fractal en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista (C58/J) muestran cambios.
- Figura 11.** Los tipos morfológicos de la microglía presentes en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista (C58/J) difieren de los que se encuentran en los ratones silvestres.
- Figura 12.** La cepa C58/J como modelo de estudio del TEA.

III. Lista de tablas

- Tabla 1.** Criterios diagnósticos para el trastorno del espectro autista (TEA) especificados por la Asociación Americana de Psiquiatría.
- Tabla 2.** Criterios diagnósticos para el trastorno del espectro autista (TEA) según el Instituto Nacional para la Salud y la Excelencia Clínica del Reino Unido.
- Tabla 3.** Conexiones intrínsecas y extrínsecas del hipocampo y sus regiones asociadas.
- Tabla 4.** Modelos murinos genéticos y no genéticos relevantes para el estudio del TEA.
- Tabla 5.** Resumen de los valores obtenidos a partir del análisis fractal de la microglía en la región CA1 del hipocampo de ratones tipo autista (C58/J) y silvestres (WT).

1. Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA) se refiere a una serie de trastornos del neurodesarrollo en humanos que aparecen durante la etapa temprana de la vida, y persisten a lo largo de ella. Los individuos con TEA presentan de forma característica alteraciones en la comunicación social y verbal, así como conductas repetitivas o intereses restringidos con distintos grados de severidad. Este trastorno impone retos para el desenvolvimiento social, escolar y profesional de los individuos que lo presentan.

El origen del TEA es multifactorial, pero se sabe que tiene una base genética, además de factores ambientales asociados. Tradicionalmente, los estudios sobre la neurobiología del TEA se habían enfocado en investigar el papel de las neuronas, pero recientemente, debido a la gran variedad de roles que desempeña la glía para mantener la homeostasis cerebral, se ha propuesto que estas células pueden tener un papel importante en el origen y/o desarrollo del TEA.

Se han desarrollado diversos modelos animales para el estudio del TEA. En particular, la cepa endogámica murina C58/J se ha caracterizado conductualmente y se ha observado que presenta conductas repetitivas y una reducida preferencia social, de forma análoga a los humanos con TEA. Adicionalmente, se han identificado en esta cepa polimorfismos en genes ortólogos de humanos que se asocian a ciertas formas de TEA.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las poblaciones de astrocitos y microglía en el hipocampo de la cepa murina C58/J. En comparación con la cepa silvestre de ratones C57BL/6J. Se observó que la cepa murina C58/J presenta una disminución en el contenido hipocampal de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP, por sus siglas en inglés *glial fibrillary acidic protein*), acompañada de una reducción en la densidad de astrocitos en la región CA1 del hipocampo. Con respecto a la microglía, se observó un aumento en la densidad de estas células en la región CA1 del hipocampo, y la evaluación morfológica de las mismas reveló que existen poblaciones de microglía con estados morfológicos distintos a los que se presentan en los cerebros de los ratones silvestres. Estos resultados indican que los ratones de la cepa con fenotipo autista C58/J presentan alteraciones en las poblaciones de la glía, de forma análoga a lo que se ha reportado en algunos individuos con TEA en los que se han evaluado estas poblaciones de células, pero en zonas del sistema nervioso central diferentes al hipocampo.

2. Introducción

Los trastornos del neurodesarrollo (TND) son un grupo de condiciones cuyo inicio se sitúa en el desarrollo temprano de los individuos humanos. Estos trastornos se manifiestan típicamente en la etapa preescolar, y se caracterizan por producir afectaciones funcionales en la personalidad, en lo social, en lo académico o en lo ocupacional (American Psychiatric Association [APA], 2013). Además, estos trastornos se manifiestan comúnmente durante los primeros 18 meses de vida, sin embargo, la mayoría no son diagnosticados sino hasta los cinco años (Casanova, 2007).

Típicamente, el término TND se ha usado para describir a un grupo muy extenso de trastornos que involucran alguna forma de disrupción en el desarrollo cerebral (Thapar, Cooper, & Rutter, 2017). Dichos trastornos incluyen a síndromes cromosómicos con causas bien identificadas como el síndrome de Rett o la esclerosis tuberosa, pero también incluyen a trastornos cuyo origen es multifactorial y desconocido en su mayoría, como el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH) o el trastorno del espectro autista (TEA) (D'Souza & Karmiloff-Smith, 2017).

Es poco común que los TND aparezcan de forma aislada o única en un individuo, pues las disfunciones en un área generalmente llevan a disfunciones en otras áreas, generando un diagnóstico múltiple (Ismail & Shapiro, 2019). Ejemplo de ello es que la presencia de signos concordantes con TDAH aumenta en un 62.7% en individuos con TEA, en comparación con sujetos neurotípicos (Avni, Ben-Itzhak, & Zachor, 2018); mientras que se ha estimado que hasta el 40% de los individuos con TEA presentan discapacidad intelectual (Cervantes & Matson, 2015; Matson & Shoemaker, 2009).

Una característica clave del TEA es su origen multifactorial que, a la vez de presentar obvias dificultades, ha permitido hallar evidencia sobre las causas biológicas para el TEA idiopático a través de estudios en trastornos sindrómicos con causas genéticas bien identificadas que presentan un fenotipo conductual parecido al del TEA, como el síndrome de X frágil, el síndrome de Rett o la esclerosis tuberosa (Sahin & Sur, 2015).

Estas evidencias sobre las diversas causas biológicas del TEA han derivado en la generación de diversos modelos animales que recapitulan las características conductuales del TEA con distinto grado de validez (Chadman, 2017; Klauck & Poustka, 2006). En nuestro caso, la cepa murina C58/J ha sido caracterizada conductualmente, y se ha descrito que presenta un aumento en las conductas repetitivas, exhibidas a través de saltos verticales

en las patas traseras, y una disminuida preferencia social (Blick et al., 2015; Moy et al., 2008; Ryan, Young, Crawley, Bodfish, & Moy, 2010). Interesantemente, se ha reportado que esta cepa de ratones presenta modificaciones en el contenido de proteínas de citoesqueleto neuronal en la corteza prefrontal (CPF) y en el hipocampo, mismas áreas donde se han descrito alteraciones en los patrones de ramificación del árbol dendrítico y una disminución en la complejidad de éste (Barón-Mendoza et al., 2019, 2018).

De forma adicional a las alteraciones neuronales comúnmente descritas para el TEA, se ha reportado que los sujetos con TEA presentan una variedad de alteraciones inmunológicas, que incluyen concentraciones anormales de citocinas en el SNC y en el suero, y autoinmunidad por anticuerpos dirigidos contra epítomos del SNC (Meltzer & Van De Water, 2017), además de que posibles alteraciones en la células de la glía podrían jugar un papel importante en la aparición y desarrollo del TEA (Zeidán-Chuliá et al., 2014); sin embargo, ninguno de estos aspectos han sido explorados en la cepa murina con fenotipo autista C58/J.

3. Antecedentes

3.1 Trastorno del Espectro Autista (TEA)

El TEA o autismo, como fue conocido por muchos años, tiene una larga historia de dificultades diagnósticas desde su reconocimiento inicial por Leo Kanner en 1943. Kanner describió los casos de once niños, de entre cero y treinta meses de edad, con un comportamiento socialmente aislado y retraído (Onaolapo & Onaolapo, 2017). Por su parte, el psiquiatra alemán Hans Asperger, en 1944, refirió cuatro casos de niños con capacidades comunicativas similares a las de un adulto (Wing, 1996). Sin embargo, no fue sino hasta la década de 1980 que este trastorno ganó validez diagnóstica gracias a su inclusión en la tercera edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales (DSM-III) (Lorna Wing & Potter, 2002).

Las consideraciones más recientes sugieren que un espectro de síntomas puede definir más apropiadamente la naturaleza de este grupo de trastornos del neurodesarrollo ahora reconocidos como TEA (American Psychiatric Association [APA], 2013; Lai et al., 2014; Livanis, Almodovar, & Skolnik, 2017; Tobe, Kim, Owley, & Leventhal, 2012).

3.1.1 Definición

Trastorno del espectro autista (TEA) se refiere a un conjunto de síndromes clínicos, genéticos y generalizados del neurodesarrollo (Loucas et al., 2008; Tobe et al., 2012), caracterizados por distintos grados de déficits persistentes en la comunicación e interacción social, así como la presencia de comportamientos restringidos, repetitivos y estereotipados de acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, en su quinta edición (DSM-V; APA, 2013) y a la Clasificación Internacional de Enfermedades, en su décima edición (IDC-10) (World Health Organization [WHO], 2004).

El TEA comprende un amplio rango de trastornos del desarrollo, los cuales incluyen el trastorno autista, síndrome de Asperger, síndrome de Rett, trastorno desintegrativo infantil, y el trastorno generalizado del desarrollo, no especificado de otra manera (Dawson & Toth, 2015; National Collaborating Centre for Women's and Children's Health, 2011; Phetrasuwan, Miles, Mesibov, & Robinson, 2009). Estas afecciones son heterogéneas en sus manifestaciones clínicas, pero se encuentran relacionadas entre sí por la ocurrencia de

déficits de cualitativos en la conducta social y la comunicación; difiriendo, sin embargo, en el grado de penetrancia, severidad y edad de inicio (Lord, Cook, Leventhal, & Amaral, 2000).

De manera general, se ha aceptado que los individuos con TEA experimentan discapacidades en tres dominios, o áreas, de la conducta: i) interacción social, ii) comunicación verbal y no verbal, y iii) conductas o intereses repetitivos (Strock, 2007), los cuales actualmente se resumen como: dominio social y de la comunicación, y dominio conductual, que se refiere a los comportamientos fijos y repetitivos antes mencionados (APA, 2013; Lauritsen, 2013; Volkmar, Reichow, Westphal, & Mandell, 2014).

3.1.2 Epidemiología

El primer sondeo epidemiológico sobre el autismo se condujo hace más de cincuenta años en el Reino Unido por Victor Lotter (Lotter, 1967). En éste se concluyó que 4 de cada 10,000 niños del condado de Middlesex de entre 8 y 10 años presentaban autismo. Aún en la década de los 1970 las estimaciones consideraban al autismo como una condición poco prevalente (2 casos por cada 10,000 niños) (Kawamura, Takahashi, & Ishii, 2008).

Numerosos estudios se han realizado en distintos países, mostrando una marcada heterogeneidad en el número de casos prevalentes de TEA, probablemente debido a la discrepancia en los métodos diagnósticos empleados por región, y a la continua modificación de estos (Sharma, Gonda, & Tarazi, 2018).

De acuerdo con el estudio de Lai y colaboradores, la prevalencia mundial de personas con TEA se ha ubicado entre 62 y 70 personas por cada 10,000 habitantes (Lai et al., 2014). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la prevalencia del TEA a nivel global es de 1 caso por cada 160 personas (WHO, 2013). En Estados Unidos, el reporte más reciente del Centro Nacional para Estadísticas en Salud (NCHS) estimó una prevalencia de 1 caso de TEA por cada 36 niños (Zablotsky, Black, & Blumberg, 2014)..

En México no existen datos nacionales sobre la prevalencia del TEA, sin embargo, un estudio realizado en la ciudad de León del estado de Guanajuato, con la participación de 12,116 niños de ocho años, indicó una prevalencia de 88 casos por cada 10,000 personas, 86% de los cuales corresponden a varones (Fombonne et al., 2016).

A pesar de las diferencias en la prevalencia reportada en diferentes estudios, parece ser claro que los hombres son cuatro o cinco veces más afectados por el TEA que las mujeres (Baio et al., 2018; Christensen et al., 2016).

Una hipótesis sugiere que esta diferencia en la proporción de hombres y mujeres con TEA podría derivarse de sesgos en el diagnóstico, ya que los hombres tienden a externalizar mayor número de alteraciones conductuales como agresividad, hiperactividad y reducidas conductas sociales; mientras que las mujeres con TEA tienden a presentar mayor internalización de síntomas como ansiedad, depresión y otros síntomas emocionales. Lo anterior propiciaría un diagnóstico más inmediato para varones con TEA, mientras que la mayor parte de los casos en mujeres permanecerían sin diagnosticar, sobre todo aquellas con alto grado de funcionalidad (Werling & Geschwind, 2013).

Aunque se reconoce que la prevalencia del TEA ha aumentado progresivamente desde hace dos décadas (Sharma et al., 2018), es incierto si la incidencia del TEA ha aumentado de igual forma (Wing & Potter, 2002) ya que el incremento en la prevalencia del TEA podría atribuirse a un progreso en el grado de conciencia y reconocimiento de este grupo de trastornos, así como a la mejora de los instrumentos diagnósticos y a una detección más temprana en la vida de los sujetos con TEA (Elsabbagh et al., 2012; Fombonne, 2009; Isaksen, Diseth, Schjølberg, & Skjeldal, 2013). De ser así, el ascenso en el número de casos detectados por año se debería a que una menor proporción de niños con TEA permanecen sin ser diagnosticados en estos días, en comparación con las dos décadas anteriores, y no realmente a que un mayor número de niños adquieran la condición durante el desarrollo.

Adicionalmente, numerosas condiciones adicionales se han reportado en comorbilidad con los casos de TEA tales como discapacidad intelectual (entre 45 y 63% de los niños con TEA) (Bertrand et al., 2001) y dificultades motoras y lingüísticas, que se detectan de forma temprana (Lord, Elsabbagh, Baird, & Veenstra-Vanderweele, 2018). El TDAH es el trastorno neuropsiquiátrico más frecuentemente diagnosticado en comorbilidad con el TEA (Leitner, 2014; Simonoff et al., 2008).

3.1.3 Diagnóstico

La definición de los puntos cardinales necesarios para establecer un diagnóstico de TEA ha sido controversial (Livanis et al., 2017). A pesar de que el origen de este trastorno se ha intentado abordar principalmente desde el punto de vista genético (Abrahams & Geschwind, 2008; Ronald & Hoekstra, 2011; Toro et al., 2010), las pautas de conducta exhibidas por los sujetos con TEA permanecen como el indicador clave para su diagnóstico, pues los síntomas del TEA tienden a aparecer en la infancia temprana (Dunlap, 2019; Ey, Leblond, & Bourgeron, 2011; Lord et al., 2018).

El DSM-5 de la Asociación Americana de Psiquiatría (APA, 2013) ha precisado cinco criterios diagnósticos para el TEA que se enlistan alfabéticamente de la A a la E. Estos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios diagnósticos para el trastorno del espectro autista (TEA) especificados por la Asociación Americana de Psiquiatría. ^a

| Criterio | Características |
|--|---|
| A Déficit persistentes en la comunicación e interacción sociales a través de múltiples contextos. | Déficits en la reciprocidad social. Déficits en los comportamientos comunicativos no verbales usados para la interacción social. Déficits para desarrollar, mantener y entender relaciones interpersonales. |
| B Pautas de comportamiento, intereses y actividades restringidas y repetitivas. | Uso de objetos, habla y motilidad estereotipados o repetitivos. Insistencia en la monotonía, apego inflexible a las rutinas o conductas verbales y no verbales ritualizadas. Intereses altamente restringidos y fijos, anormales en intensidad o en foco. Hiper- o hiporreactividad a estímulos sensoriales o interés inusual por los aspectos sensoriales del ambiente. |

C Los síntomas deben estar presentes en un periodo del desarrollo temprano.

D Los síntomas causan significativas discapacidades sociales, ocupacionales o en otras áreas funcionales importantes.

E Estas alteraciones no pueden ser explicadas por discapacidad intelectual o por retraso en el desarrollo global.

^a Reproducido del *Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales* (APA, 2013).

A su vez, los criterios diagnósticos establecidos por el Instituto Nacional para la Salud y la Excelencia Clínica del Reino Unido, contemplan (i) signos y síntomas relativos a la interacción social y a las conductas de comunicación recíproca e (ii) intereses inusuales o restringidos y/o conductas repetitivas, mismos que son categorizados de acuerdo al grupo de edad del individuo (niños de edad preescolar, niños de educación primaria y niños de educación secundaria) (National Collaborating Centre for Women's and Children's Health, 2011). Algunos de estos criterios se enlistan de forma no exhaustiva en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios diagnósticos para el trastorno del espectro autista (TEA) según el Instituto Nacional para la Salud y la Excelencia Clínica del Reino Unido. ^a

| Rubro | Rango de edad | | |
|---|---|---|---|
| | Preescolar | Educación primaria (5 a 11 años) | Educación secundaria (mayores de 11 años) |
| Lenguaje hablado | Retraso del lenguaje. Regresión o pérdida del habla. Reducido uso del lenguaje para comunicarse. | Lenguaje limitado y con tono monótono; discurso repetitivo; uso frecuente y estereotipado de frases aprendidas. | Lenguaje limitado y con tono monótono; léxico dominado por información excesiva sobre temas de interés propio. |
| Respuesta a otras personas | Retraso o ausencia de respuesta al llamado por el nombre. Reducción o ausencia de respuesta a las expresiones faciales o sentimientos de otros. | Dificultades ligeras para comprender las intenciones ajenas, pueden malinterpretar las metáforas o el sarcasmo | Frecuentes respuestas negativas a peticiones de otras personas. |
| Interacción social y comunicación recíproca | Interacción con otras personas | Reducción o ausencia de la percepción del espacio propio. Reducción o ausencia de interés social por otros. | Aproximación con otras personas inapropiada o agresiva. Consciencia reducida del comportamiento socialmente esperado. |
| | Contacto visual, señalamiento y otros gestos | Uso de gestos y expresiones faciales reducido o ausente. Reducido o ausente uso del contacto visual en contextos sociales. | Atención conjunta reducida que se manifiesta por reducción o ausencia del contacto visual. |
| | Ideas e imaginación | Imaginación y variedad de juegos por imitación reducidos o ausentes. | Imaginación para el juego limitada, puede imitar escenas o imágenes de cine o televisión previamente visualizadas. |
| Intereses inusuales o restringidos y/o comportamiento rígido y repetitivo | Movimientos estereotípicos repetitivos. Interés excesivo en seguir motivos propios. Reactividad emocional extrema al cambio o a nuevas situaciones. | Expectativas restrictivas de que el resto de los niños se apeguen a las reglas de juego. Fuertes preferencias por rutinas con las que se está familiarizado. | Preferencia por <i>hobbies</i> altamente específicos. Fuerte apego por las reglas que desemboca en discusiones. Disgusto por el cambio. |

^a Información recopilada de la Guía para el reconocimiento, canalización y diagnóstico de personas jóvenes con el espectro autista (National Collaborating Centre for Women's and Children's Health, 2011).

3.1.4 Etiología

Se ha reconocido que el TEA es una condición del neurodesarrollo con una base biológica marcada (Yates & Couteur, 2016). Existe un creciente consenso de que el TEA no tiene una sola causa etiológica, sino que se trata más bien de diferentes trastornos neurológicos que resultan de una compleja interacción entre factores genéticos (Vorstman et al., 2017) y ambientales (Modabbernia, Velthorst, & Reichenberg, 2017; Posar & Visconti, 2017). Sin embargo, la mayor parte de las investigaciones se han enfocado en explicar los primeros, revelando que varios genes relacionados con el neurodesarrollo (Guilmatre et al., 2009), con la homeostasis sináptica (Etherton et al., 2011a; Etherton et al., 2011b; Toro et al., 2010) con vías de señalización celular (Kumar et al., 2019), con vías de degradación proteasomal (Khalil et al., 2018), entre otros, son afectados durante el TEA.

Una gran desventaja para el uso de condiciones genéticas como predictoras de este trastorno es que, no solamente muchas han sido asociadas a él, sino que también muchas de estas variaciones se asocian al mismo tiempo con otras condiciones neuropsiquiátricas (Guilmatre et al., 2009), dificultando la claridad y la certeza de un diagnóstico basado en estos marcadores (Petrelli, Pucci, & Bezzi, 2016).

Múltiples aspectos de la neurobiología han sido sugeridos para dar una explicación etiológica al TEA (Lord et al., 2018), las células de la glía entre ellos, dados sus importantes roles en la modulación de la homeostasis cerebral (Hillen, Burbach, & Hol, 2018), plasticidad y sinapsis neuronales (Krencik, van Asperen, & Ullian, 2017; Wang et al., 2016), los cuales son procesos involucrados en el desarrollo del TEA (Hansel, 2019; Zeidán-Chuliá et al., 2014).

Los astrocitos parecen jugar un papel fundamental durante el neurodesarrollo que contribuye a la etiología del TEA (Clarke & Barres, 2013). En el caso de un modelo de ratón para síndrome de X frágil (FXS, por sus siglas en inglés *fragile X-syndrome*), una forma sindrómica de TEA se observó *in vitro* que neuronas hipocampales con un genotipo silvestre cultivadas con astrocitos del genotipo FXS experimentan un retraso en la elongación de neuritas y en el crecimiento del soma al día 7 en cultivo, pero el fenotipo se restablece para el día 21. Igualmente se observó un retraso en el establecimiento de sinapsis excitatorias por parte de estas neuronas cuando se cultivan con astrocitos del genotipo FXS (Maezawa, Swanberg, Harvey, LaSalle, & Jin, 2009).

En el caso del síndrome de Rett, otra forma sindrómica de TEA que se produce por una pérdida de función de MeCP2 (un regulador transcripcional de unión a CpG metilado), se ha observado en un modelo murino la reducción en el tamaño neuronal, la disminución en la complejidad del árbol dendrítico y la disminución en la densidad de espinas dendríticas a lo largo de distintas regiones del cerebro, estos ratones presentan alteraciones en actividades que dependen de los astrocitos como la regulación del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés *brain derived neurotrophic factor*), la producción de citocinas proinflamatorias interleucina (IL)-1 β e IL-6, y de anomalías en la inducción del crecimiento axonal (Jacobs, Nathwani, & Doering, 2010); no obstante, queda mucha información por elucidar en cuanto a la respuesta celular de los astrocitos en el desarrollo de las formas no sindrómicas del TEA (Petrelli et al., 2016).

Finalmente, numerosos elementos relacionados con el sistema inmunológico y su respuesta, tales como infecciones maternas durante la gestación (Patterson, 2011); autoanticuerpos dirigidos contra elementos neuronales del cerebro fetal (Braunschweig et al., 2013); la activación de múltiples complejos de inflammasomas (Saresella et al., 2016); concentraciones inusuales de citocinas en suero y sistema nervioso central (SNC) (Masi et al., 2015); anomalías en la distribución espacial (Morgan et al., 2012) y expresión génica de la microglía (Werling, Parikshak, & Geschwind, 2016); polimorfismos en la región codificante del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés *human leukocyte antigen*) G (Guerini et al., 2015, 2018); entre otros, han sido sugeridos como factores etiológicos para el desarrollo del TEA.

3.2 Hipocampo

Las primeras descripciones de esta región cerebral fueron hechas por el médico y anatomista italiano Julius Caesar Aranzi (1530-1589) en 1587, quien lo nombró por primera vez por su semejanza con el caballo de mar (Schultz & Engelhardt, 2014).

La nomenclatura actual para designar las distintas regiones del hipocampo deriva de las representaciones hechas por el neurocientífico Rafael Lorente de Nó, alumno de Ramón y Cajal, durante el siglo XX, quien retomó el término *cornu Ammonis* (CA) propuesto en principio por miembros de la Escuela Alejandrina de Medicina siglos atrás (Andersen, Morris, Amaral, Bliss, & O'Keefe, 2007).

El hipocampo es una de las estructuras cerebrales más intensamente estudiadas en la historia. En tiempos modernos cobró relevancia tras el reporte del paciente H.M. quien perdió la capacidad de formar nueva memoria declarativa tras la remoción quirúrgica del hipocampo y sus regiones aledañas, con el propósito de aliviar su epilepsia (Knierim, 2015), lo que ha llevado a muchos a investigar esta estructura como punto focal de numerosas neuropatologías (Bartsch & Wulff, 2015).

3.2.1 Neuroanatomía

El hipocampo es una de varias regiones cerebrales que conforman un sistema funcional conocido como formación hipocampal que, generalmente, incluye a la corteza entorrinal, el parasubiculo, el presubiculo, el subiculo, el hipocampo y el giro dentado (Amaral & Lavenex, 2007).

En humanos, la formación hipocampal es una región cortical pareada en cada uno de los lóbulos temporales (Jacobson, Marcus, & Pugsley, 2018). Es una estructura convoluta, elongada y prominente que forma el margen medial del hemisferio cortical y ocupa la cavidad de la extensión temporal del ventrículo lateral. Tiene una longitud rostrocaudal de aproximadamente 5 cm en adultos y se ensancha en su porción anterior, donde se inclina hacia la superficie medial del cerebro (Fig. 1) (Insausti & Amaral, 2012; Knowles, 1992; Schultz & Engelhardt, 2014).

La formación hipocampal es parte de la corteza límbica, situada en el espacio inferomedial de los hemisferios, separada de la corteza contigua por la fisura límbica (Duvernoy, Cattin, & Risold, 2013). A su vez, la formación hipocampal se encuentra delimitada por el giro parahipocampal, mismo que se encuentra formado por los surcos rinal y colateral; la porción anterior de este giro es, en su mayoría, parte de la corteza entorrinal (Insausti & Amaral, 2012).

Caudalmente, el límite de la formación hipocampal está marcado por el encuentro del giro parahipocampal con la corteza retrosplenial. El hipocampo y el giro dentado se encuentran separados del subyacente subiculo por la fisura hipocampal. La corteza entorrinal es la porción de la formación hipocampal localizada más rostralmente y puede hallarse ligeramente detrás del limen de la ínsula (Fig. 1) (Insausti & Amaral, 2012).

La superficie medial del hipocampo está recubierta con una franja de fibras llamadas fimbrias. Las fibras que se originan de las células piramidales a lo largo del hipocampo y

del subículo viajan en la materia blanca que envuelve al hipocampo – el alveus – y confluyen en las fimbrias situadas medialmente (Insausti & Amaral, 2012).

Existen, además, características histológicas que permiten diferenciar a las regiones de la formación hipocampal. El hipocampo, como se mencionó antes, fue dividido por Lorente de Nó en tres sectores basándose en las diferencias citoarquitectónicas: CA1, CA2 y CA3 (Fig. 1) (Amaral & Lavenex, 2007; Jacobson et al., 2018). Es de resaltar que la región CA1 del hipocampo muestra una vulnerabilidad selectiva a diversos de insultos como la hipoxia, la isquemia, el estrés oxidante y la hipoglicemia, que se observa a través de un daño neuronal tardío (Bartsch et al., 2015; Duvernoy et al., 2013) y cambios en las poblaciones de astrocitos (Ordy et al., 1993; Ouyang, Voloboueva, Xu, & Giffard, 2007).

La organización del hipocampo es casi la misma en cualquier sección de su extensión rostrocaudal. Las células piramidales representan la capa principal del hipocampo; sus dendritas se extienden hacia la capa molecular y sus axones se prolongan a través de los colaterales de Schaffer y forman contactos sinápticos con las dendritas de otras células piramidales en la capa molecular. Esta capa está densamente empaquetada en la región CA1 del hipocampo y aparece más laxa en las regiones CA2 y CA3 (Amaral & Lavenex, 2007; Jacobson et al., 2018).

La franja angosta relativamente libre de células debajo la capa de células piramidales es el *stratum oriens*, y contiene las dendritas basales de las neuronas piramidales y diferentes tipos de interneuronas (Amaral & Lavenex, 2007).

La capa más superficial del hipocampo es el *stratum lacunosum-moleculare*, misma donde terminan las fibras provenientes de la corteza entorrinal, y es donde los ápices dendríticos de las células piramidales se ramifican; se continúa con la capa molecular del giro dentado (Amaral & Lavenex, 2007).

Por otro lado, el giro dentado (GD) es una región cortical trilaminar dorsalmente cóncava (en forma de V) que envuelve a la última porción de CA3 del hipocampo, reconocido como CA4 en algunos casos (Fig. 1) (Duvernoy et al., 2013). Tiene una organización relativamente similar a la del hipocampo (Amaral & Lavenex, 2007). En él se reconocen una capa molecular, que contiene dendritas de las células piramidales; una capa de células granulosas, compuesta por los somas de pequeñas neuronas que reemplazan a las células piramidales del hipocampo, son unipolares y proyectan sus dendritas hacia la capa molecular; y una capa polimórfica (Jacobson et al., 2018).

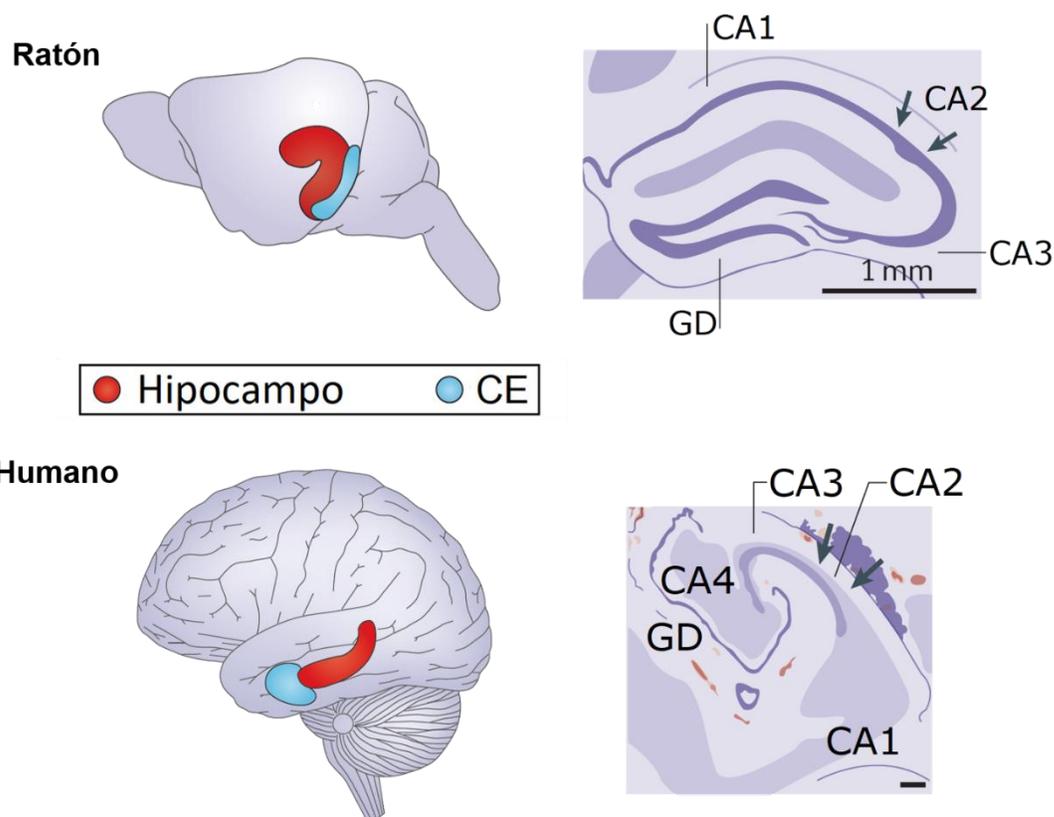


Figura 1. Ubicación anatómica e histología del hipocampo en ratones y en humanos. Diagramas representativos de la ubicación del hipocampo en el cerebro y su histología característica en ratones (arriba) y en humanos (abajo). Los diagramas a la derecha muestran la ubicación de las subregiones que conforman el hipocampo, y su posición con respecto al giro dentado en ambas especies. *Cornu Ammonis* = **CA**; corteza entorrinal = **CE**; giro dentado = **GD**. Modificado de Strange, Witter, Lein, & Moser, 2014.

3.2.2 Conexiones

Una característica generalmente reconocida del hipocampo es que posee una conectividad unidireccional y no recíproca, a diferencia de la mayoría de las estructuras neocorticales. Un circuito trisináptico intrínseco y fundamentalmente unidireccional fue descrito inicialmente para la formación hipocámpal, gracias a estudios anatómicos y fisiológicos. Éste contemplaba la presencia de fibras que van desde la corteza entorrinal hacia el giro dentado (sinapsis 1), desde el giro dentado hasta la subregión CA3 (sinapsis 2) y desde CA3 hasta la subregión de CA1 (sinapsis 3) (Amaral & Lavenex, 2007). Un ejemplo esquemático de este circuito se presenta en la figura 2.

Más recientemente, se ha propuesto que la conectividad del hipocampo puede ser algo más compleja e intrincada que el circuito trisináptico descrito anteriormente (Fig. 2). El esquema actual plantea la presencia de aferencias y eferencias, tanto intrínsecas como extrínsecas, del hipocampo y sus estructuras asociadas (Knowles, 1992). Un listado no exhaustivo de estas conexiones se incluye en la Tabla 3. Cabe mencionar que no todas estas vías de comunicación han sido identificadas en humanos, en cuyo caso se especifica el modelo animal que ha servido para describirlas.

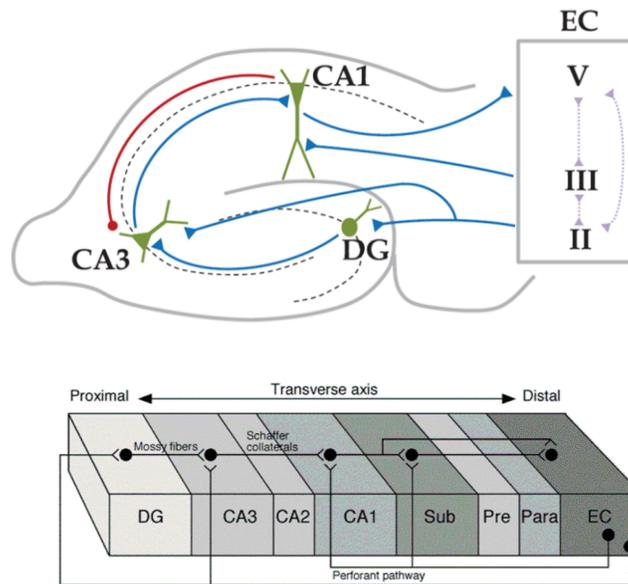


Figura 2. Representación esquemática de la conectividad en el hipocampo. El circuito trisináptico (arriba) fue una primera aproximación a la red de conexiones que se establecen en el hipocampo. Reproducido de López-Madrona, Matias, Pereda, Canals, & Mirasso, 2017. Una conectividad no estrictamente unidireccional y más compleja (abajo) se ha descrito al conjugar estudios de la fisiología y de anatomía del hipocampo. Reproducido de Amaral & Lavenex, 2007. *Cornu Ammonis 1* = **CA**; corteza entorrinal = **EC**; giro dentado = **DG**; subículo = **Sub**; Parasubículo = **Para**; Presubículo = **Pre**.

Tabla 3. Conexiones intrínsecas y extrínsecas del hipocampo y sus regiones asociadas. ^a

| Subregión | Intrínseca | | Extrínseca | |
|--------------------|---|--|---|--|
| | Aferentes | Eferentes | Aferentes | Eferentes |
| Corteza entorrinal | <ul style="list-style-type: none"> • Presubículo • Parasubículo • Subículo | <ul style="list-style-type: none"> • CA3 • Giro dentado (vía perforante) • CA1 • Subículo | <ul style="list-style-type: none"> • Giro parahipocampal • Corteza perirrinal, en mono rhesus (Van Hoesen, <i>et al.</i>, 1975) • Amígdala, en gato y rata (Krettek & Price, 1977) | <ul style="list-style-type: none"> • Región parahipocampal • Cortezas orbital y medial frontal, en monos (Muñoz & Insausti, 2005) |
| CA1 | <ul style="list-style-type: none"> • Capa III de la corteza entorrinal • CA3 (colaterales de Schaffer) | <ul style="list-style-type: none"> • Subículo | <ul style="list-style-type: none"> • Núcleo reuniens del hipotálamo (Herkenham, 1978) | <ul style="list-style-type: none"> • Cortezas de asociación polimodal en mono cinomolgo (Insausti & Muñoz, 2001) |
| CA3 | <ul style="list-style-type: none"> • Capa II de la corteza entorrinal • Giro dentado (fibras musgosas) | <ul style="list-style-type: none"> • CA1 (colaterales de Schaffer) | <ul style="list-style-type: none"> • Núcleos septales, en rata (Milner & Amaral, 1984) • Hipotálamo (proyección supramamilar) (Insausti & Amaral, 2012) | <ul style="list-style-type: none"> • Complejos septales (Insausti & Amaral, 2012) |
| Giro dentado | <ul style="list-style-type: none"> • Capa II de la corteza entorrinal (vía perforante) | <ul style="list-style-type: none"> • Neuronas piramidales de CA3 (fibras musgosas) | <ul style="list-style-type: none"> • Núcleos septales (Milner & Amaral, 1984) • Hipotálamo (proyección supramamilar) (Insausti & Amaral, 2012) | - |
| Subículo | <ul style="list-style-type: none"> • CA1 • Capa III de la corteza entorrinal | <ul style="list-style-type: none"> • Presubículo • Parasubículo • Corteza entorrinal | <ul style="list-style-type: none"> • Núcleos talámicos, en rata (Domesick, 1972) | <ul style="list-style-type: none"> • Núcleo accumbens, en rata (Kelley & Domesick, 1982) • Núcleo caudado • Putamen, en gato (Groenewegen, <i>et al.</i>, 1982) |

^a Información recopilada de Insausti & Amaral (2012).

3.2.3 Implicación del hipocampo en el TEA

Generalmente se acepta que el hipocampo está involucrado en el aprendizaje y en la formación de algunos tipos de memoria (Duvernoy et al., 2013; Squire & Wixted, 2011), concretamente, de la memoria declarativa o semántica, que se refiere a la memoria de hechos y conceptos; así como de la memoria episódica, que permite la recolección de eventos y establecer relaciones entre ellos; y de la memoria espacial, que involucra el reconocimiento de una ubicación o un objeto en el espacio físico (Duvernoy et al., 2013; Jeye, MacEvoy, Karanian, & Slotnick, 2018).

También se ha propuesto la funcionalidad independiente de los polos ventral y dorsal del hipocampo en las respuestas emocionales y en procesos relacionados con la cognición, respectivamente, debida en gran medida a la expresión diferencial de genes y a las diferencias en la conectividad neuronal en ambas regiones del hipocampo (Fanselow & Dong, 2010). Sobre esta misma línea, se ha sugerido que la porción anterior del hipocampo puede estar vinculada a procesos de percepción e imaginación (Zeidman & Maguire, 2016).

El desarrollo de conductas socioemocionales adecuadas depende de la integridad funcional y estructural de las regiones cerebrales que median la percepción y la regulación de las emociones (Amaral, 2002). Se ha postulado que el hipocampo puede jugar un papel fundamental en el desarrollo normal de un niño en cuanto a su sintaxis lingüística, semántica, pragmática y para la integración de estados motivacionales con la experiencia y el aprendizaje (DeLong, 1992). En ese sentido, la memoria episódica estaría fundamental y selectivamente afectada durante el autismo, misma que depende del hipocampo y de la CPF (Shalom, 2003).

En niños y adolescentes altamente funcionales con TEA, se ha observado que el hipocampo y otras áreas de la corteza límbica poseen un volumen reducido en comparación con controles de la misma edad (Saitoh, Karns, & Courchesne, 2001), mientras que existe información contradictoria que sugiere que hay un incremento en el volumen hipocampal de personas adolescentes con TEA (Groen, Teluij, Buitelaar, & Tendolkar, 2010) o en cualquier punto del desarrollo (Geuze, Vermetten, & Bremner, 2005; Schumann et al., 2004).

Igualmente, Kemper y Bauman (1993) describieron la presencia de neuronas de menor tamaño, más empaquetadas y con arborizaciones dendríticas de complejidad reducida (Raymond, Bauman, & Kemper, 1995) en varias estructuras del sistema límbico,

incluido el hipocampo. Weigel y colaboradores (2010) analizaron los cerebros *post mortem* de trece sujetos con TEA, hallando una distorsión citoarquitectónica local de la corteza entorrinal en dos de ellos, del hipocampo en cuatro y del giro dentado en dos más, en comparación con cerebros de sujetos neurotípicos de edades similares; concluyendo, a su vez, que existen irregularidades por displasia laminar en el hipocampo de algunos individuos con TEA, sugiriendo anomalías en la migración neuronal durante el desarrollo (Wegiel et al., 2010). No obstante, el papel de las células de la glía permanece sin ser analizado en el hipocampo de individuos con TEA.

3.3 Células de la glía

Las células de la glía, o células gliales, fueron descritas inicialmente por Rudolf Virchow en el siglo XIX como el tejido conectivo del cerebro (Parpura & Verkhratsky, 2012). Sin embargo, según Ramón y Cajal, Deiters fue el primero en identificar células del SNC que no eran neuronas a mediados del mismo siglo (Somjen, 1988).

La característica definitoria de las neuronas es su capacidad para transmitir señales eléctricas con gran rapidez en forma de potenciales de acción; mientras que las células de la glía presentan excitabilidad mediada por incrementos de calcio intracelular, no generan potenciales de acción y regulan la homeostasis del SNC (Allen & Barres, 2009; Parpura et al., 2012); algunas de estas funciones se enlistan en la figura 3. El término glía abarca un número altamente heterogéneo de poblaciones celulares que se divide, a grandes rasgos, en oligodendroglía, microglía, astrología y células ependimarias (Verkhratsky, Rodríguez, & Parpura, 2013).

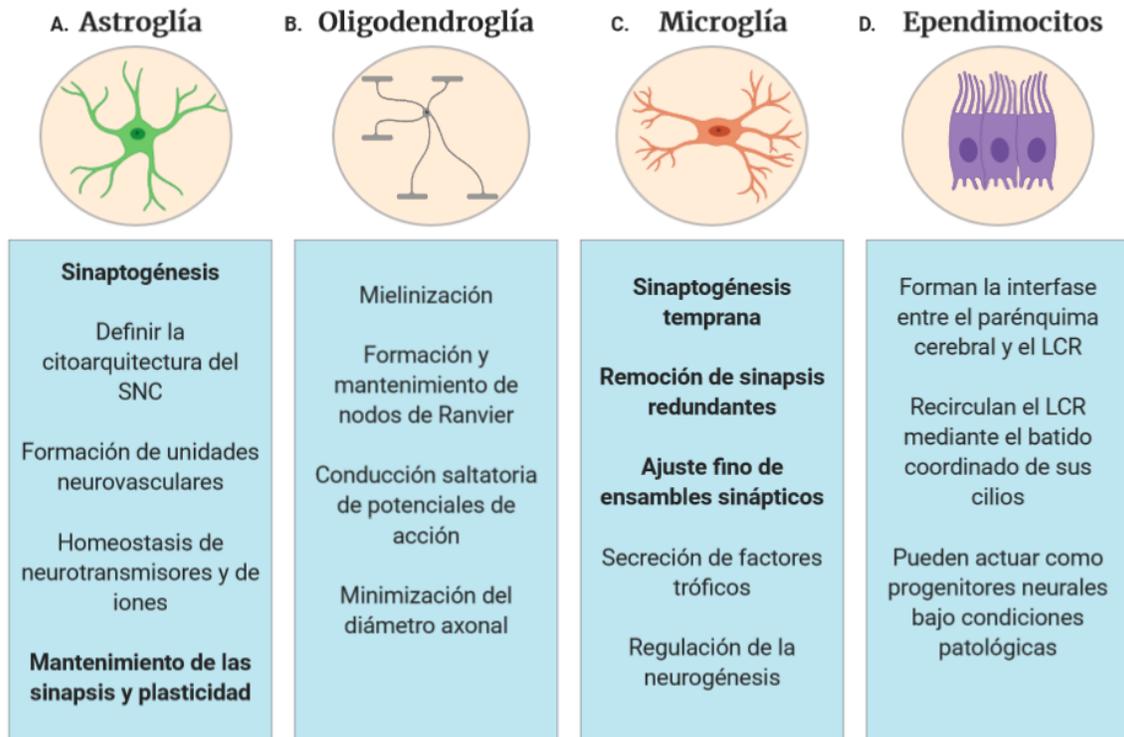


Figura 3. El papel de las células de la glía en la homeostasis del sistema nervioso central. La glía desempeña una serie de funciones dedicadas al equilibrio homeostático del cerebro. Modificado de Zeidán-Chuiliá et al. (2014).

3.3.1 Oligodendroglía

Los oligodendrocitos son las células de la glía responsables de producir una segmentación funcional del axolema (Mathis, Denisenko-nehrbass, Girault, & Borrelli, 2001), de promover la maduración axonal (Colello, Pott, & Schwab, 1994) y proveer un aislamiento eléctrico de los axones en el SNC (Gonzalez-Perez & Alvarez-Buylla, 2011). Fueron inicialmente agrupados por del Río-Hortega en oligodendrocitos mielinizantes y no mielinizantes, subdividiendo a su vez los primeros en cuatro grupos (I-IV) basándose en la morfología celular, la localización y el número de internodos formados (Szuchet, Domowicz, & Hudson, 2010). Se ha estimado que hasta el 75.6% del total de células gliales en la neocorteza cerebral de humanos adultos corresponde a oligodendrocitos (Pelvig, Pakkenberg, Stark, & Pakkenberg, 2008).

La gran mayoría de los oligodendrocitos mielinizantes se forman en el periodo posnatal temprano por diferenciación de las células progenitoras de oligodendrocitos

(OPCs) proliferativas, las cuales expresan marcadores de superficie como el proteoglicano NG2 y el receptor alfa al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α). Estas células se originan a partir de un nicho en la zona ventral de la espina dorsal y del cerebro embrionarios para después migrar y diseminarse de manera más o menos homogénea en el SNC (Richardson, Young, Tripathi, & McKenzie, 2011; Szuchet et al., 2010; Yu, Collarini, Pringle, & Richardson, 1994). Tras el nacimiento, las OPCs forman oligodendrocitos mielinizantes y se asocian con axones con diámetros superiores a 0.2 μm (Richardson et al., 2011; Simons & Trajkovic, 2006; Szuchet et al., 2010).

El papel fisiológico de estas células, como ya se ha mencionado, está íntimamente ligado a la mielinización de los axones en el SNC (Nave, 2010; H. Zhang & Miller, 1996). Esto influye directamente en la formación y el mantenimiento de los nodos de Ranvier (Rasband & Macklin, 2012; Susuki & Rasband, 2008), que son estructuras libres de mielina, donde se agrupa gran densidad de canales de Na⁺ y que son fundamentales para llevar a cabo la conducción saltatoria de potenciales de acción (Dugandžija-Novaković, Koszowski, Levinson, & Shrager, 1995; Poliak & Peles, 2003; Shrager, 1988). Esta organización ultraestructural ha permitido evolutivamente la miniaturización del SNC gracias a la reducción del diámetro axonal en los vertebrados (Bullock, Moore, & Fields, 1984; Hartline & Colman, 2007; Zalc, Goujet, & Colman, 2008).

Se sabe que el número de oligodendrocitos en el hipocampo dorsal de ratones, una región asociada con el aprendizaje y la memoria es constante durante el desarrollo, mientras que en el hipocampo ventral, la porción asociada con la conducta emocional, el número de oligodendrocitos decae con la edad, posiblemente debido a un declive en el número de OPCs que les dan origen (Yamada & Jinno, 2014).

Por otra parte, se reportó que, en hembras de ratón embarazadas, la inoculación con RNA de doble cadena (poli-I:C) – un modelo de activación inmune materna (AIM) – genera una disminución en el contenido de la proteína básica de mielina (MBP, por sus siglas en inglés *myelin basic protein*) en la progenie durante la etapa posnatal temprana, en comparación con ratones inoculados con sólo el vehículo. Además, se reportó una disminución en la mielinización de axones y en el diámetro de vainas de mielina del hipocampo, sin una evidente reducción en el número de oligodendrocitos. Estos cambios sin embargo se revirtieron en la etapa adulta, sugiriendo que las anomalías en la mielinización durante el periodo posnatal temprano podrían relacionarse con la aparición de trastornos del neurodesarrollo asociados a AIM (Makinodan et al., 2008).

3.3.2 Microglía

El sistema nervioso ha sido moldeado evolutivamente como un sitio inmunológicamente quiescente (Phillips & Lampson, 2000), gracias a la baja expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés *major histocompatibility complex*) y a la estricta regulación por parte de la barrera hematoencefálica que evita el libre tránsito de células inmunológicas y factores solubles del plasma hacia el parénquima cerebral (Pachter, De Vries, & Fabry, 2003). Todos los tejidos del cuerpo cuentan con una población de células de origen mieloide con funciones inmunológicas (Kofler & Wiley, 2011) que regulan tanto las respuestas inflamatorias no específicas (inmunidad innata), como las respuestas antígeno específicas (inmunidad adaptativa) (Aloisi, 2001). En el caso del SNC, las células de la microglía cumplen esa función.

La microglía es el conjunto de células fagocíticas mononucleares más abundantes del SNC, representando hasta el 10% del total de las células en éste (Colonna & Butovsky, 2017). Éstas se distribuyen de manera ubicua pero no uniforme a lo largo del SNC, siendo el hipocampo una de las estructuras más densamente pobladas por estas células (Lawson, Perry, Dri, & Gordon, 1990).

La microglía se origina a partir de progenitores mieloides tempranos provenientes del saco vitelino, antes del día embrionario 8 (E8) en ratones, y migran para colonizar el tubo neural, donde persisten durante toda la vida del organismo y se mantienen por división lenta (Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012).

Tras ingresar al SNC durante el desarrollo temprano, la microglía experimenta cambios que la convierten en células en reposo, que constantemente escanean el entorno en busca de señales de daño (Nimmerjahn, Kirchhoff, & Helmchen, 2005). Estas células desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento y limpieza de desechos celulares (Beyer, Gimsa, Eyüpoglu, Hailer, & Nitsch, 2000), así como en la regulación de la respuesta inmunológica innata del SNC (Kofler & Wiley, 2011; Streit, Conde, Fendrick, Flanary, & Mariani, 2005).

Se ha descrito su participación en la inducción de la inflamación (D'Mello, Le, & Swain, 2009), en la citotoxicidad (Merrill, Ignarro, Sherman, Melinek, & Lane, 1993) y en la regulación de la respuesta de células T como célula presentadora de antígenos (Aloisi, De Simone, Columba-Cabezas, Penna, & Adorini, 2000; Gehrman, Banati, & Kreutzberg,

1993) en un contexto estrictamente regulado por la actividad neural (Aloisi, 2001; Phillips & Lampson, 2000).

La microglía expresa constitutivamente el marcador de superficie de macrófagos CD11b y posee un fenotipo de reposo caracterizado por una baja expresión de proteínas del MHC de clase II (Kreutzberg, 1996; Sedgwick et al., 1991) y una baja expresión de moléculas co-estimuladoras (Kaur, Han, Yang, & Crane, 2010; Menendez Iglesias, Cerase, Ceracchini, Levi, & Aloisi, 1997; Satoh, Lee, & Kim, 1995); y a diferencia de los macrófagos en tejidos periféricos, la microglía se especializa en montar respuestas restringidas espacial y temporalmente para mantener un ambiente inmunológicamente silencioso en el SNC (Aloisi, 2001).

Además, la microglía juega un papel importante en la eliminación estructural de sinapsis durante el desarrollo del SNC. Este proceso involucra la fagocitosis de elementos pre- y postsinápticos durante la primera semana postnatal. Estos eventos tempranos de poda sináptica son dependientes de diferentes moléculas tales como el receptor 1 a la quimiocina CX3CL1 (CX3CR1) expresado exclusivamente por la microglía en el SNC (Paolicelli et al., 2011), y el receptor a complemento 3 (CR3) (Schafer et al., 2012). Las proteínas de la vía clásica del complemento median la eliminación de sinapsis inmaduras a través de su opsonización, marcándolas para ser fagocitadas por la microglía (Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007). Se piensa que la poda sináptica podría continuar siendo relevante en estados posteriores de la vida pues recientemente se reportó que la microglía en la CPF de ratas de ocho semanas de edad tiene un papel relevante en la eliminación de sinapsis durante el periodo de sueño; presumiblemente aquellas sinapsis más débiles (Choudhury et al., 2020).

Se ha observado que la morfología de la microglía se relaciona con el estado de activación celular (Giulian, 1987; Suzumura, Marunouchi, & Yamamoto, 1991). En el estado de reposo, estas células poseen una morfología altamente ramificada, con largos procesos cuyas terminaciones son bulbosas, posibilitando la vigilancia del microambiente circundante (Nimmerjahn et al., 2005). Más aún, se ha reportado que estas proyecciones forman zonas de contacto con las terminales sinápticas *in vivo* a razón de una vez por hora en condiciones fisiológicas (Wake, Moorhouse, Jinno, Kohsaka, & Nabekura, 2009).

Un estado de activación intermedio se ha descrito, por ejemplo, a partir de modelos en roedores de daño isquémico cerebral, en el cual la microglía conserva sus procesos

celulares ligeramente hipertróficos, pero aumenta su expresión de moléculas de adhesión ICAM-1, VLA-4 y MHCI (Ladeby et al., 2005). Evidencia adicional proveniente de tejido post mortem de pacientes con Alzheimer y esclerosis múltiple señala que la microglía con morfología ramificada tiene la capacidad de expresar moléculas de HLA-DR así como CD68, ambos marcadores clásicos del estado reactivo de la microglía (Hendrickx, van Eden, Schuurman, Hamann, & Huitinga, 2017).

Por otro lado, el estado reactivo, tipo macrófago o ameboide, se caracteriza por una morfología más compacta, con forma oval y reducida en procesos o prolongaciones (Giulian, 1987). Esta forma se ha vinculado con la activación debido a la formación temprana de estructuras esféricas en su citoplasma, producto de la fagocitosis de residuos de tejido dañado y desechos celulares tras una lesión (Nimmerjahn et al., 2005), aunado a una mayor actividad enzimática y a una mayor producción de anión superóxido (O_2^-) (Suzumura et al., 1991)

Sobre el papel de la microglía en el hipocampo, existe un estudio que sugiere la presencia de microglía activada con un patrón sexualmente dimórfico en la región CA1 del hipocampo de ratones al día posnatal 15 observándose un pico en la expresión de la molécula CD68 en la superficie de la microglía de hembras y machos, lo cual se correlacionó con un aumento en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la misma región en hembras, pero no en machos; sugiriendo que estas diferencias en la poda sináptica durante el desarrollo temprano podrían relacionarse con la marcada disimilitud en la prevalencia en hombres y mujeres de trastornos del neurodesarrollo como el TEA (Weinhard et al., 2018); sin embargo, resta hacer más estudios que confirmen estas diferencias sexuales y su papel en el desarrollo funcional de los circuitos hipocampales.

Finalmente, se ha reportado que la microglía desempeña un papel activo en la limpieza y remoción de restos celulares derivados de la apoptosis de neuroprogenitores en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado durante los primeros cuatro días tras la división del progenitor neural en ratones. Esta fagocitosis se desempeña por microglía no activada (ramificada), en ausencia de marcadores de activación (CD11b y CD68) (Sierra et al., 2010), sugiriendo que la microglía posee un papel importante en el moldeado de los circuitos neurales aún en el estado adulto.

3.3.3 Astrogliá

El término astrogliá se usa para referirse a todas aquellas células no mielinizantes macrogliales del SNC. Son las células de la glía más abundantes en el cerebro y se distribuyen de manera heterogénea en diferentes áreas del SNC; superando en número a las neuronas en la corteza cerebral mientras que se hallan de manera escasa en el cerebelo o en las capas de neuronas piramidales del hipocampo (Allen & Eroglu, 2017; Khakh & Sofroniew, 2015).

Estas células poseen una complejidad morfológica única que se caracteriza por un denso arreglo de procesos que se intercalan con los elementos neuronales, y algunos de estos procesos forman zonas de contacto con la vasculatura cerebral (Nedergaard, Ransom, & Goldman, 2003). Tienen un diámetro de entre 40-60 μm y el 90-95% de su superficie está conformada por ramificaciones (Bushong, Martone, Jones, & Ellisman, 2002; Ogata & Kosaka, 2002).

Los estudios de neuroanatomía clásicos categorizaron a los astrocitos en dos grupos con base en su morfología y localización (Kettenmann & Verkhratsky, 2008). El primer grupo corresponde a los astrocitos protoplásmicos de la materia gris (Allen & Eroglu, 2017). Los astrocitos protoplásmicos definen la microarquitectura dividiendo la materia gris en dominios relativamente independientes que conforman la base estructural de las unidades neurovasculares (Verkhratsky et al., 2013). Estos astrocitos extienden dos tipos de procesos: los primeros son extensiones finas perisinápticas que cubren la mayoría de las sinapsis en su vecindad (Bushong, Martone, & Ellisman, 2004; Witcher, Kirov, & Harris, 2007); se estima que un solo astrocito puede contactar hasta 100,000 sinapsis en el hipocampo de ratón (Bushong et al., 2002). Los segundos son procesos de gran diámetro que forman contactos directos (pies terminales) con la pared de los vasos sanguíneos (Foo et al., 2011; Iadecola & Nedergaard, 2007). El segundo grupo incluye a los astrocitos fibrosos de la materia blanca, los cuales se asocian con los tractos axonales mielinizados, como el cuerpo calloso (Allen & Eroglu, 2017). Estos se diferencian de los primeros porque sus procesos celulares son largos, cilíndricos, lisos y se ramifican con poca frecuencia (Cheng, Sourial, & Doering, 2012).

Los astrocitos se encuentran involucrados en una variedad de actividades regulatorias de la homeostasis cerebral generalizada, tal como el establecimiento y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Abbott, 2002; Abbott, Rönnbäck, &

Hansson, 2006; Hayashi et al., 1997), principalmente mediante la modulación de las uniones estrechas que las células endoteliales forman en el SNC (Wolburg et al., 1994).

También han sido vinculados a la homeostasis de la neurotransmisión por su papel en el mantenimiento del equilibrio extracelular del potasio mediante su captación a través de canales específicos expresados en su membrana celular (Seifert, Henneberger, & Steinhäuser, 2018) y su redistribución a otros sitios del cerebro por uniones *gap* con otros astrocitos (Wallraff et al., 2006; Walz, 2000); así como en la limpieza de neurotransmisores de la hendidura sináptica. Estos eventos repercuten directamente en la excitabilidad celular y contribuyen a evadir el daño neurológico por excitotoxicidad (Hertz & Chen, 2016; Kofuji & Newman, 2004).

Adicionalmente, existe evidencia de que los astrocitos intervienen en una serie de procesos relacionados con la formación (Allen et al., 2012; Christopherson et al., 2005; Kucukdereli et al., 2011), maduración (Pfrieger & Barres, 1997; Ullian, Sapperstein, Christopherson, & Barres, 2001) y eliminación de sinapsis (Bialas & Stevens, 2013; Chung et al., 2013; Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007).

La formación y modulación de las sinapsis por parte de los astrocitos tiene lugar principalmente gracias a la secreción de sustancias neuroactivas conocidas como factores sinaptogénicos (Araque et al., 2014; Clarke & Barres, 2013). Hasta ahora se ha descrito el papel del colesterol (Mauch, Na, & Schumacher, 2001), de la trombospondina 1 (TSP1) (Cheng, Lau, & Doering, 2016; Garcia, Torres, Helguera, Coskun, & Busciglio, 2010), de los glipicanos (Allen et al., 2012) y de la hevína como promotores de la sinaptogénesis; así como de la proteína SPARC como su inhibidora (Kucukdereli et al., 2011). Asimismo, estas células pueden modular la actividad sináptica a través de la interacción física directa con ella (Haber, Zhou, & Murai, 2006; Nishida & Okabe, 2007).

De forma importante, se ha reportado que los astrocitos tienen la propiedad de remover sinapsis en un proceso dependiente de fagocitosis mediada por las vías de MEGF10 y MERTK, tanto *in vitro* como *in vivo* en el sistema retinal geniculado con un pico de actividad entre los días posnatales 4 y 6 en ratones (Chung et al., 2013). Adicionalmente, se demostró que, en presencia de astrocitos inmaduros, las células derivadas de ganglio retinal aumentan la expresión de la proteína del complemento C1q entre los días posnatales 5 y 10, con un declive hacia el día posnatal 30 (Stevens et al., 2007), posiblemente gracias a la influencia de factores solubles secretados por los astrocitos (Clarke & Barres, 2013).

Finalmente, existe evidencia de que, en el hipocampo de ratones, la interacción entre el receptor de membrana EphB, expresado por neuronas, y su ligando efrina B1, presente en la membrana plasmática de astrocitos, podría inducir la eliminación de sinapsis mediante trans-endocitosis mediada por los mismos astrocitos. Lo anterior es debido a que se observó un aumento en el número de puntas sinápticas y de espinas dendríticas inmaduras en la región CA1 tras la deleción de efrina B1 de forma específica en los astrocitos; en contraste con una eliminación excesiva de espinas dendríticas cuando se sobreexpresa efrina B1 en astrocitos de la misma región del hipocampo (Koeppen et al., 2018). Más aún, en el último caso se observó que los ratones experimentaban afectación en la adquisición de nuevos recuerdos utilizando un paradigma de condicionamiento de miedo, probablemente debida a la reducción en el número de sinapsis disponibles para la formación de la memoria (Koeppen et al., 2018), sugiriendo que los astrocitos podrían tener un papel activo en la constitución de la memoria contextual que involucra al hipocampo.

Lo anterior demuestra que esta población celular posee un papel activo en la plasticidad sináptica estructural (Barker & Ullian, 2010), lo que podría influir fuertemente en la plasticidad funcional contribuyendo a eventos como la formación de la memoria y el aprendizaje (Ota, Zanetti, & Hallock, 2013).

3.3.4 Células endimarias

En la mayoría de mamíferos adultos, las células gliales endimarias (EGC, por sus siglas en inglés *ependymal glial cells*) son células especializadas que recubren la superficie ventricular del SNC en forma de un epitelio cúbico o columnar simple, que se extiende desde los ventrículos laterales hasta el filum terminal de la médula espinal (Del Bigio, 1995, 2010).

Las EGCs se originan a partir de células de la glía radial entre los días embrionarios 14 y 16 en ratones a través de un proceso dependiente del factor de transcripción FoxJ1 y de proteínas de la familia Geminina, completando su maduración a lo largo de la primera semana posnatal (Jacquet et al., 2009; Ortiz-Álvarez et al., 2019; Spassky et al., 2005) y se ha descrito que un subconjunto de EGCs pueden actuar como células troncales pues mantienen la capacidad de dividirse de forma asimétrica para dar lugar a células que se transfieren a la zona subventricular (ZSV), por lo cual pueden tener un papel en la generación de neuroblastos y astrocitos en el cerebro adulto tras una lesión isquémica, pero

no bajo condiciones fisiológicas (Carlén et al., 2009; Gleason, Fallon, Guerra, Liu, & Bryant, 2008).

Las EGCs se encuentran polarizadas con respecto al plano del mismo epitelio que forman, proyectando su superficie apical multiciliada hacia el lumen ventricular, donde se encuentran en contacto permanente con el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Kishimoto & Sawamoto, 2012), el cual recirculan mediante el batido coordinado de sus cilios (Zappaterra & Lehtinen, 2012). Se mantienen unidas mediante proteínas de unión adherente (cadherina y β -catenina) y de uniones estrechas (occludina y ZO-1) expresadas en la interfase apical-lateral de cada célula (Del Bigio, 2010; Lippoldt et al., 2000). Se ha propuesto que además de sus funciones sensoriales al interior del ventrículo, las EGC también pueden actuar como mediadoras de la homeostasis metabólica entre el LCR y el parénquima cerebral y su disfunción podría estar implicada en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas (Stratton, Shah, Sinha, Crowther, & Biernaskie, 2019).

En individuos con TEA, datos preliminares reportan una reducción en el contenido de heparán sulfato en la ZSV de los ventrículos laterales, desde infantes hasta sujetos adultos (Pearson, Corley, Vasconcellos, Blanchard, & Blanchard, 2013), además de una reducción en la densidad de células en el espacio hipocelular y un aumento en el porcentaje de células endimarias PCNA+ en la ZSV septal (Kotagiri, Chance, Szele, & Esiri, 2014). Se sabe que las células endimarias tienen una importante relación con la ZSV, formando pozos neurogénicos en el cerebro adulto (Morrens, van den Broeck, & Kempermann, 2012); sin embargo, se requiere de mayor evidencia para establecer una relación entre alteraciones moleculares de esta región y el fenotipo del TEA.

3.3.5 Alteraciones de la glía asociadas al TEA

Como ya se ha mencionado, la etiología del TEA es poco clara y su origen está lejos de poder ser explicado de forma exclusiva por mecanismos genéticos o por factores ambientales. Muchos de los genes relacionados con esta condición parecen tener que ver con la actividad neuronal (Y. Li, Zhang, & Li, 2019), sin embargo, se ha propuesto que las células gliales del SNC se encuentran involucradas en la patogénesis del TEA por (i) alteraciones en el programa del neurodesarrollo, (ii) neuroinflamación y (iii) sinaptopatía (Zeidán-Chuliá et al., 2014).

La plasticidad cerebral está regulada en el nivel subcelular, el nivel celular y el nivel de redes celulares complejas. Estas redes dependen de la formación de contactos entre células, conocidas como sinapsis, y la remodelación de estas redes neurales tiene como consecuencia la ya mencionada plasticidad. Esta remodelación es un fenómeno estrechamente relacionado con la homeostasis general del cerebro que está estrictamente regulada por la glía (Zeidán-Chuliá et al., 2014)

Diversos estudios han demostrado que la microglía y los astrocitos presentan patrones anómalos de sobreactivación y de distribución espacial, además de aumentos en su densidad en diferentes regiones del cerebro de sujetos con TEA (Lee, Azmitia, & Whitaker-Azmitia, 2017; Morgan, Barger, Amaral, & Schumann, 2014; Morgan et al., 2012, 2010; Tetreault et al., 2012; Vargas, Nascimbene, Krishnan, Zimmerman, & Pardo, 2005), mientras que los genes relacionados con la respuesta inmunológica se encuentran igualmente encendidos (Edmonson, Ziats, & Rennert, 2014; Gupta et al., 2014; Voineagu et al., 2011). Más aún, al evaluar la alteración en la expresión de estos genes célula por célula se ha observado que, en la CPF y la corteza cingulada anterior, las neuronas y la microglía se ven preferentemente afectadas en los individuos con TEA (Velmeshev et al., 2019). Lo anterior indica que la respuesta inmunológica tiene un papel importante en el desarrollo del TEA, particularmente aquellas respuestas mediadas por la microglía en el SNC.

En el caso particular de los astrocitos, se ha documentado extensamente que diversos elementos celulares como factores de transcripción, proteínas de anclaje y proteínas de citoesqueleto de los astrocitos alteran su expresión durante un proceso conocido como astrogliosis, cuyas características varían según la severidad del estímulo, y son dependientes del contexto intra e intercelular de los mismos astrocitos; siendo GFAP una de éstas, la cual aumenta su expresión en diversas patologías del SNC (Sofroniew, 2009, 2014), y se ha reportado elevada en diversas áreas corticales de individuos con TEA (Crawford et al., 2015; Laurence & Fatemi, 2005).

Además, altos niveles de citocinas proinflamatorias como interleucina (IL)-6 (Wei et al., 2011), interferón gamma (IFN- γ), factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés *granulocyte and monocyte colony stimulating factor*), IL-8 (Li et al., 2009), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , por sus siglas en inglés *tumor necrosis factor*) e IL-1 β (Masi et al., 2015), así como de la citocina antiinflamatoria IL-

37 (Tsilioni et al., 2019) se han descrito en el cerebro y en el suero (Ashwood et al., 2011) de sujetos con TEA.

A pesar de que la contribución específica de las células de la glía a la sintomatología del trastorno resta aún por determinarse, los estudios en modelos animales apoyan una asociación directa entre la neuroinflamación y el TEA, sugiriendo que eventos como la gliosis reactiva puede incidir en distintas alteraciones funcionales y estructurales de la conectividad cerebral (Petrelli et al., 2016). Una propuesta de las interacciones entre las células de la glía y las neuronas durante el estado fisiológico y durante las condiciones disruptivas del TEA se presenta en la figura 4.

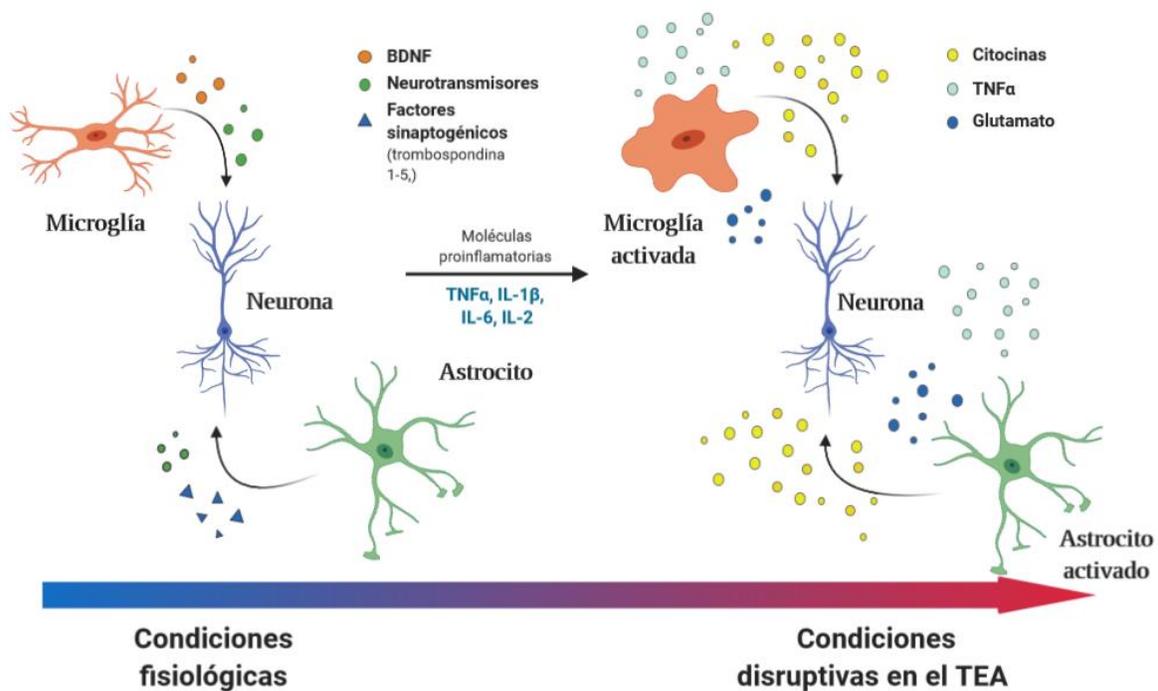


Figura 4. La relación entre neuronas y células de la glía en condiciones fisiológicas y disruptivas durante el TEA. En condiciones fisiológicas, los astrocitos y la microglía son responsables de liberar numerosos factores que mantienen la homeostasis cerebral como neurotransmisores (glutamato, D-serina) y factores sinaptogénicos (trombospondina 1, glipicanos) que pueden promover la formación y la maduración de las sinapsis. En condiciones patológicas, como durante el TEA, algunas citocinas proinflamatorias pueden influir en el desarrollo de un estado neuroinflamatorio crónico en el cual los astrocitos y la microglía se activan y secretan sustancias que exacerban el estado inicial de inflamación. Modificado de Petrelli, Pucci & Bezzi (2016).

3.4 Modelos animales no humanos para el estudio del TEA

Debido a la escasez de tejido cerebral *post mortem* de individuos con TEA, se han realizado relativamente pocos estudios a nivel celular y molecular en comparación con otras afecciones del SNC, como el Alzheimer y la esquizofrenia. En este sentido, los modelos animales representan una oportunidad única para integrar los aspectos conductuales del TEA, con imagenología cerebral *in vivo* y con la caracterización celular y molecular del tejido *post mortem* en un mismo individuo (Bauman & Schumann, 2018).

Idealmente, un modelo animal para el TEA debería poseer (1) validez de concepto, es decir, que comparte aquella anomalía molecular que se presenta en humanos; (2) validez de aspecto, o sea que el modelo captura aspectos del fenotipo observado en humanos de manera exitosa; y (3) validez predictiva, con la cual ciertos tratamientos farmacológicos con probada eficacia en humanos serán igualmente efectivos para revertir los signos análogos del TEA que el animal muestra (Harony-Nicolas & Buxbaum, 2015; Bey & Jiang, 2014).

Una de las dificultades para hallar modelos animales que sean significativos para el estudio del TEA es que su diagnóstico en humanos se hace a través de rasgos conductuales particulares, y por lo tanto existe una inherente heterogeneidad en la manifestación de los signos y síntomas que lo caracterizan. Por lo anterior, se han desarrollado distintas pruebas neuroconductuales en modelos animales para demostrar pautas de conducta que sean análogas a las de las personas con TEA (Ergaz, Weinstein-Fudim, & Ornoy, 2016; Moy et al., 2007). A pesar de que ciertos componentes del TEA presentes únicamente en humanos no pueden ser reproducidos en su totalidad por los modelos animales, algunos de ellos con endofenotipos relevantes pueden ofrecer herramientas útiles para el estudio de este grupo de trastornos, por lo que se han empleado, principalmente, roedores para modelar aspectos genéticos y fenotípicos del TEA (Bauman, Crawley, & Berman, 2019; Homberg et al., 2016).

Por otro lado, los ratones de laboratorio de la especie *Mus musculus* son particularmente adecuados para modelar aspectos conductuales del TEA pues se ha descrito en detalle su comportamiento natural, además de ser generalmente sociales, con un número de interacciones entre individuos fácilmente medibles, así como patrones de comunicación que se expresan a través de señales olfatorias y vocalizaciones (Bauman et al., 2019; Hrabovska & Salyha, 2016).

A la fecha se han desarrollado más de setenta modelos murinos para el TEA, creadas a través de: (1) manipulaciones farmacológicas y ambientales, como el modelo en roedores de exposición prenatal a ácido valproico, establecido originalmente en ratas por Rodier y colaboradores (Rodier, Ingram, Tisdale, Nelson, & Romano, 1996), posteriormente adaptado a ratones (Nicolini & Fahnstock, 2018); (2) modificaciones genéticas con base en los hallazgos sobre genes relacionados a síndromes comórbidos al TEA como la delección del gen *Fmr1*, que se asocia al FXS (Moy, Nadler, Magnuson, & Crawley, 2006). Algunos ejemplos adicionales de modelos murinos genéticos y no genéticos para el TEA se enlistan en la tabla 4.

Tabla 4. Modelos murinos genéticos y no genéticos relevantes para el estudio del TEA. Modificada de Bey & Jiang (2014).

| Modelo | Alteraciones conductuales que se asocian con el TEA ^a |
|---|--|
| Modelos monogénicos sindrómicos | |
| <i>Fmr1</i> (-/y) | ± sociabilidad ↑ ansiedad social ↑ estereotipias ↑ actividad ↓ aprendizaje / memoria |
| <i>Pten</i> (cKO) En neuronas post-mitóticas que expresan la enolasa específica de neuronas (<i>Eno2-Cre</i>). | ↓ sociabilidad ↓ novedad social ↑ acicalamiento propio ↑ ansiedad ↑ actividad ↓ aprendizaje / memoria |
| <i>Mecp2</i> ^{tm1Hzo} (exón 3) | ↓ habilidades motoras ↓ aprendizaje / memoria |
| <i>Tsc1</i> (cKO) En células de Purkinje del cerebelo (<i>Pcp2-Cre</i>). | ↓ sociabilidad ↓ novedad social ↑ acicalamiento propio ↑ inflexibilidad al cambio |
| Modelos monogénicos no sindrómicos | |
| <i>Nrxn1a</i> | ± sociabilidad ± novedad social ± ansiedad ± actividad |

| | |
|---|---|
| <i>Nlgn4</i> (-/-) | ± sociabilidad ↑ perseverancia ↑ estereotipias ↑ ansiedad ↓ habilidades motoras |
| <i>Shank3</i> (ex4-9 ^J) | ↓ sociabilidad ↓ novedad social ↓ interacción con pares ↑ inflexibilidad al cambio ↑ estereotipia ↓ aprendizaje / memoria |
| Modelos de variación en el número copias (CNV) | |
| 15q11-13dup (Dp(7)15) | ↓ sociabilidad ↑ inflexibilidad al cambio ↑ ansiedad ↓ actividad |
| 16p11.2del (Df(7)16) | - sociabilidad ↑ estereotipias ↑ actividad |
| 17p11.2dup (Dp(11)17) | ↓ sociabilidad ↓ novedad social ↑ ansiedad ↑ actividad ↓ aprendizaje / memoria |
| Modelos no genéticos | |
| BTBR | ↓ sociabilidad (♂) ↓ novedad social ↑ acicalamiento propio ↑ inflexibilidad al cambio ↑ estereotipia ↑ ansiedad - aprendizaje / memoria |
| C58/J | ↓ sociabilidad (♂) ↑ estereotipia motora ↑ acicalamiento propio |

^a ↑, aumentado; ↓, disminuido; -, sin cambios; ±, reportes contrastantes; ♀, hembras; ♂, machos. ^b -/-, homocigoto para el alelo nulo; +/-, heterocigoto para el alelo nulo; cKO, *knockout* condicional; KI, *knock-in*.

No obstante, dado que una característica observada del TEA es su heterogeneidad genética y fenotípica, y dado que los casos de TEA asociados a genes de riesgo representan tan sólo 10-20% de todos los casos (Geschwind, 2011), el uso de modelos murinos monogénicos para su estudio limitan la utilidad para modelar la complejidad intrínseca de este grupo de trastornos (Moy et al., 2006), por lo que la crianza endogámica de cepas definidas conductualmente como “tipo autistas”, tales como las cepas BTBR T+tf/J (BTBR) y C58/J, ha surgido como una excelente alternativa para definir aspectos experimentales del TEA en un modelo animal (Bauman et al., 2019; Bey & Jiang, 2014; Ellegood et al., 2015).

3.4.1 La cepa murina C58/J como modelo de estudio del TEA

La cepa murina C58/J fue desarrollada por McDowell en 1921 mediante el cruce endogámico de ratones provenientes de la reserva Lathrop (The Jackson Laboratory, 2009). Haciendo uso de pruebas conductuales especialmente desarrolladas para esta especie, se ha demostrado que los individuos de esta cepa exhiben pautas de comportamiento similares a las de los sujetos con TEA, incluyendo conductas repetitivas que se expresan a través de levantamientos, saltos verticales y piruetas que aparecen temprano en el desarrollo (día postnatal 6) y persisten hasta la adultez (Blick et al., 2015; Ryan, Young, Crawley, Bodfish, & Moy, 2010). Además, presentan preferencia por un mismo objeto; perfiles de hiperactividad (Blick et al., 2015); déficits sociales que se manifiestan a través de una disminuida preferencia social y una disminuida transmisión de la preferencia por comida; además de estereotipias motoras y un bajo desempeño en el laberinto de T (Moy et al., 2008; Ryan, Young, Crawley, Bodfish, & Moy, 2010).

Sobre el perfil genético de la cepa, un estudio en particular halló la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido en 97 genes de la cepa C58/J tales como *CACNA1C*, *CNTNAP2*, *GABRA5* y *GABRB1*, que se relacionan primordialmente con funciones neuronales; y cuyos homólogos en humanos se han asociado al TEA como factores de riesgo (Moy et al., 2014).

Pocas investigaciones han abordado las diferencias neuroanatómicas presentes en esta cepa. Un estudio de Wilkes y colaboradores (2019) demostró por imágenes de resonancia magnética que los ratones de la cepa C58/J muestran alteraciones morfológicas que se expresan a través de una disminución del volumen cerebral total. También demostraron que el volumen aumentado en los núcleos estriado y subtalámico, así como

en la región crus II del cerebelo, se correlaciona positivamente con el número de actividades motoras repetitivas (saltos verticales y piruetas). Interesantemente, este mismo estudio halló que el hipocampo de estos ratones posee un mayor volumen relativo en comparación con la cepa C57BL/6J, tal como se ha reportado en individuos humanos con TEA de distintas edades (Groen et al., 2010; Schumann et al., 2004; Sparks et al., 2002).

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que los ratones de la cepa C58/J muestran alteraciones en el contenido de proteínas de citoesqueleto neuronal en la CPF y en el hipocampo y, de manera importante, presentan una reducción en el contenido de la proteína astrocítica secretada TSP-1 en estas dos regiones (Barón-Mendoza et al., 2018). Nuestro grupo también ha demostrado que existen alteraciones en la complejidad del árbol dendrítico de neuronas piramidales en la CPF y en el hipocampo de esta cepa. Estas anormalidades se presentan como una reducción en el número de dendritas terciarias en el hipocampo, una reducción en la longitud de dendritas primarias de la CPF y una reducción en la longitud total del árbol dendrítico en ambas estructuras, indicando una posible modificación en la conectividad neuronal, misma que podría repercutir en las conductas tipo autista que estos ratones presentan (Barón-Mendoza et al., 2019).

4. Planteamiento del problema

El uso de modelos animales ha contribuido de manera importante al entendimiento del TEA. Particularmente, se ha observado que la cepa de ratón C58/J reproduce algunas de las características conductuales de los individuos con TEA, por lo que se emplea como modelo de estudio de este trastorno. Además, se ha reportado que existen modificaciones en la expresión y la fosforilación de proteínas de citoesqueleto, así como una disminución en el contenido de la proteína secretada por astrocitos TSP-1 en la CPF y en el hipocampo de estos ratones. Estas alteraciones podrían estar asociadas a cambios en la complejidad y en la longitud del árbol dendrítico observados en las mismas regiones del cerebro de esta cepa. Sin embargo, la contribución de las células gliales al trastorno en este modelo no ha sido evaluada.

Por lo tanto, la evaluación de las poblaciones de la glía en esta cepa permitirá establecer paralelismos con relación a los estudios en individuos con TEA, contribuyendo a la generación de explicaciones sobre la implicación de estas células en el origen y desarrollo del TEA.

5. Hipótesis

Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista exhibirán un aumento en la densidad de microglía y astrogía en la región CA1 del hipocampo, así como un aumento en la cantidad de microglía activada con respecto a ratones silvestres.

6. Objetivos

General

Evaluar las poblaciones de células gliales (astrocitos y microglía) en la región CA1 del hipocampo de ratones con fenotipo autista (C58/J).

Particulares

- Medir el contenido de las proteínas GFAP e Iba-1 en el hipocampo de los ratones con fenotipo autista.
- Cuantificar la densidad de astrocitos y microglía en la región CA1 del hipocampo de los ratones con fenotipo autista.
- Identificar diferencias en el estado morfológico de la microglía en la región CA1 del hipocampo de los ratones con fenotipo autista.

7. Procedimiento experimental

7.1 Animales

Las cepas de ratones C58/J (con fenotipo autista) y C57BL/6J (silvestre, S), adquiridas en The Jackson Laboratory (Maine, E.U.A), se mantuvieron en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) hasta su uso. Ahí permanecieron en sistemas de cajas ventiladas individualmente bajo condiciones estándar (temperatura media $22 \pm 2^\circ \text{C}$; $40 \pm 10\%$ de humedad relativa; ciclo de luz:oscuridad 12:12), sobre una cama de aserrín estéril (ENVIGO), con un periodo de aclimatación de dos semanas después de ser adquiridos. Los ratones fueron amamantados durante las tres primeras semanas de vida, y recibieron una dieta comercial peletizada (TG Rodent Diet T2018S.15, ENVIGO) y agua *ad libitum* durante las siete semanas posteriores.

En total, se utilizaron seis ratones de cada cepa ($n = 6$) en la disección de muestras de tejido cerebral fresco para la cuantificación de proteínas; y tres ratones de cada cepa ($n = 3$) en la extracción de tejido cerebral perfundido para la obtener cortes y realizar tinciones histológicas (inmunofluorescencia y violeta de cresilo).

El mantenimiento y uso de animales se realizó bajo las especificaciones dictadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio). La realización de este proyecto está avalada por el Comité Institucional del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL; ID 181).

7.2 Cuantificación de proteínas gliales en el hipocampo de ratones con fenotipo autista

7.2.1 Obtención de muestras de tejido hipocampal fresco y extracción de proteínas

Para analizar el contenido de proteínas, se disecaron los hipocampos de los ratones de ambas cepas ($n = 6$) tras haber sido anestesiados y sacrificados de acuerdo con los Lineamientos para la Eutanasia en Animales de la Asociación Médica Veterinaria de Estados Unidos (Leary et al., 2013). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

Los hipocampos de los ratones C57BL/6J y C58/J se homogenizaron en 500 μ l de amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas (RIPA). Las proteínas se obtuvieron por centrifugación a 14,000 rpm, a 4 °C durante 15 minutos. Las proteínas totales de cada homogenizado se cuantificaron en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., E.U.A.). Los homogenizados se almacenaron en congelación hasta su uso.

7.2.2 Electroforesis en gel y western blot

Los homogenizados de proteínas fueron adicionados con buffer de Laemmli y se incubaron a 100 °C durante 5 minutos. Las proteínas (200 μ g) fueron separadas por SDS-PAGE en geles de 15% y 10% para la cuantificación de Iba-1 y GFAP, respectivamente; a 80 mV durante 3 horas. Se incluyó el marcador de peso molecular preteñido Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, California, E.U.A.). El contenido de cada gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia semiseca, durante 2 horas a 0.06 A.

Posteriormente, las membranas se bloquearon con albúmina 2%, durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario IgG policlonal de conejo anti-Iba-1 (1:750; FUJIFILM Wako Chemicals, E.U.A.) o con el anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-GFAP, (1:500; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.), a 4 °C, durante toda la noche.

Finalmente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgGk de ratón (1:10,000; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) o anti-IgG de conejo (1:15,000; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), durante 40 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate; Thermo Scientific; Massachusetts, E.U.A) y las membranas se revelaron por autorradiografía.

Para evaluar el control de carga, los complejos antígeno-anticuerpo presentes en la membrana se disociaron a través de un cambio de pH, incubando las membranas con amortiguador ácido de glicina (pH 2.5) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloqueó la membrana como se indicó previamente y fueron incubadas con IgG monoclonal de ratón anti-Tubulina α (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) a 4 °C durante toda la noche. Luego se incubaron con anti-IgGk de ratón-HRP (1:10,000;

Santa Cruz Biotechnology, California, E.U.A.) durante 40 minutos a temperatura ambiente, y se revelaron como se mencionó previamente.

Entre cada paso del proceso posterior a la electrotransferencia, las membranas se lavaron 3 veces, 5 minutos por vez, con TBS-Tween 0.1% en agitación y a temperatura ambiente.

7.3 Perfusión y obtención de cerebros para cortes y tinciones histológicas

En la décima semana de edad, los ratones de ambas cepas ($n = 3$) fueron anestesiados y sacrificados de acuerdo con los Lineamientos para la Eutanasia en Animales de la Asociación Médica Veterinaria de Estados Unidos (Leary et al., 2013). Inmediatamente después se perfundieron vía intracardiaca con 60 ml de buffer salino de fosfatos (PBS) 1x y con 60 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Posteriormente, se decapitaron y se extrajeron sus cerebros. Los cerebros permanecieron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas a 4 °C y posteriormente se deshidrataron sumergiéndolos en un gradiente de sacarosa: 10, 20 y 30%, manteniéndolos 24 horas en cada solución a 4 °C. Finalmente, los cerebros se almacenaron a -70 °C hasta su corte.

Se realizaron secciones de la región dorsal del hipocampo (bregma -2.03 a -2.27 mm, Fig. 5) de 20 μm de espesor a -22 °C, empleando un criostato (Leica CM1850), para lo cual los cerebros se incluyeron en medio FSC 22™ Surgipath® (Leica Microsystems). Los cortes se montaron en portaobjetos para microscopio y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su tinción.

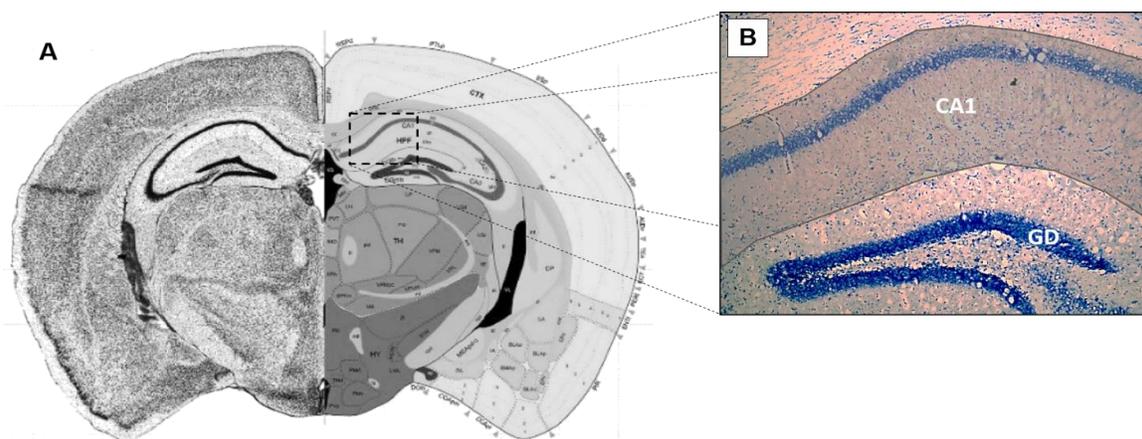


Figura 5. Localización de la región CA1 del hipocampo. Imágenes representativas del hipocampo de ratón (A) y de la región CA1 (B) que fue estudiada en el presente trabajo. *Cornu Ammonis 1*, CA1; *giro dentado*, GD. Modificada del Allen Mouse Brain Atlas (2008).

7.3.1 Tinción de Nissl

Los cortes de cerebro se rehidrataron en PBS 0.01 M durante 3 minutos. Posteriormente, se sumergieron en violeta de cresilo 0.5 % durante 3 minutos; inmediatamente después se sumergieron en agua ultrapurificada Milli-Q® durante 1 minuto para retirar el exceso de colorante.

A continuación, las muestras fueron sumergidas en etanol 70, 96% y absoluto, sucesivamente, durante 2 minutos en cada concentración. Por último, se sumergieron en xileno durante 2 minutos y se colocó un cubreobjetos sobre los tejidos utilizando CytoSeal™ 60.

7.3.2 Inmunofluorescencia

Los cortes de cerebro se rehidrataron en PBS durante 3 minutos. Posteriormente, se incubaron en una solución de citrato de sodio 10 mM, a 80 °C, durante 30 minutos. Los cortes se permeabilizaron con metanol absoluto en congelación, durante 10 minutos y se bloquearon con suero de cabra 5%, durante toda la noche a 4 °C, en cámara húmeda. Después, se incubaron durante 24 horas con los anticuerpos primarios IgG monoclonal de ratón anti-GFAP (1:200; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California, E.U.A.) e IgG policlonal de conejo anti-Iba-1 (1:750; FUJIFILM Wako Chemicals, E.U.A.) a 4°C, en una cámara húmeda. Finalmente, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios IgG de cabra Alexa-Fluor® 488 (AF488) anti-ratón (1:1000; Life Technologies; Carlsbad, California, E.U.A.) e IgG de cabra Alexa-Fluor® 594 (AF594) anti-conejo (1:15; Life Technologies, Oregón, E.U.A.) durante 1 hora; y con Hoechst 33342 (1 µg/mL; Thermo Scientific; Massachusetts, E.U.A) durante 15 minutos; a temperatura ambiente, en cámara húmeda y en oscuridad. Entre cada paso de la tinción, se realizaron tres lavados de las muestras utilizando TBS-Tween 0.1%, durante 5 minutos, en agitación. Todas las laminillas fueron fijadas con medio de montaje no fluorescente Vectashield® Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, California, E.U.A.).

7.4 Microscopía y análisis de imágenes

Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus Bx43 (Pennsylvania, E.U.A.). Se obtuvieron fotografías de seis campos de cada corte, en la región CA1 del hipocampo, con un aumento de 20x (Olympus WHN10x-H22; Olympus

UPlanFLN 20x). Las imágenes se adquirieron utilizando el software ImagePro Plus 7.0 (MediaCybernetics) y una cámara MicroPublisher 5.0 RTV (QImaging).

El análisis de las imágenes, para determinar el número de células GFAP+ e Iba+, el área y la intensidad media de fluorescencia (IMF) se realizó empleando los programas Adobe® Photoshop® CS6 (v. 13.0 x32; Adobe Systems Incorporated) e ImageJ (v. 1.46r; National Institutes of Health, E.U.A).

Para evaluar la morfología de las células de la microglía, las mismas muestras se visualizaron utilizando un microscopio confocal Nikon A1R+ STORM (Nikon Corporation; Tokio, Japón). Se localizaron campos en la región CA1 del hipocampo con células de la microglía presentes, y se obtuvieron imágenes apiladas en z con una profundidad de por lo menos 20 μm , en intervalos de 0.2 μm , con un aumento de 60x (Plan Apo VC 60xA WI) en los canales de Hoechst 33342 y Alexa Fluor® 594. Las imágenes se adquirieron usando una cámara Nikon A1 Plus a través del software NIS Elements C (Nikon Corporation, Tokio, Japón).

Las imágenes obtenidas fueron procesadas y evaluadas en el software ImageJ (v. 1.52p; National Institutes of Health, E.U.A.) utilizando los complementos AnalyzeSkeleton (2D/3D) (v. 3.1.3) y FracLac for ImageJ, siguiendo el protocolo descrito con anterioridad (Young & Morrison, 2018).

7.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados a través del software GraphPad Prism (v. 7.04; GraphPad Software, Inc.). Se realizó el análisis estadístico mediante pruebas de t de Student para muestras no pareadas. Si los datos no presentaban los criterios de normalidad y homocedasticidad, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media (E.E.M.) o como la media \pm desviación estándar (D.E.); y se consideraron significativos aquellos con un valor de $p < 0.05$.

Las medidas de longitud total de las ramificaciones y número de terminaciones de la microglía en la región CA1 del hipocampo se evaluaron mediante un análisis de correlación de Pearson utilizando el software GraphPad Prism (v. 7.04). A su vez, los índices de correlación obtenidos para cada cepa se compararon entre sí mediante una

transformación de Fisher a valores z, utilizando el paquete de análisis cocor para R (Diedenhofen & Musch, 2015), y se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

8. Resultados

8.1 Contenido de las proteínas GFAP e Iba-1 en el hipocampo de ratones tipo autista

Para evaluar posibles diferencias en las poblaciones de astrocitos y microglía en el hipocampo de ratones tipo autista (C58/J) con respecto a ratones de la cepa silvestre, se estudió el contenido de dos proteínas que se expresan por estas células.

En el caso del contenido de la proteína GFAP, una molécula que constituye mayoritariamente el citoesqueleto de los astrocitos, se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en el hipocampo de los ratones tipo autista en comparación con ratones silvestres (S) de la cepa C57BL/6J (Fig. 6 A y B, *arriba*).

Por otra parte, el contenido de la proteína Iba-1 no mostró cambios en el hipocampo de ratones tipo autista en comparación con sus contrapartes silvestres (Fig. 6 A y B, *abajo*).

8.2 Evaluación del número de astrocitos y microglía en la región CA1 del hipocampo de ratones tipo autista

Para evaluar posibles alteraciones en las poblaciones de astrocitos y microglía que se relacionen con cambios en el número de células en el hipocampo de los ratones tipo autista, se analizaron estas poblaciones celulares mediante inmunofluorescencia en la región CA1 del hipocampo (Fig. 7A).

Se sabe que los astrocitos en el hipocampo muestran patrones de distribución heterogéneos, pues en el *stratum lacunosum-moleculare* la densidad de astrocitos es mayor comparada con el *stratum radiatum* tanto en CA1 como en CA3 (Seifert & Steinhäuser, 2018). En nuestros resultados podemos observar que, en el caso de los astrocitos en el hipocampo, estos exhiben una organización visiblemente más empaquetada y homogénea hacia la porción más superficial del *stratum lacunosum-moleculare* en los ratones silvestres, en comparación con una distribución más heterogénea y dispersa a lo largo de los *strata radiatum* y *lacunosum-moleculare* en los ratones tipo

autista (Fig. 7B y 7C). Por su parte, la microglía muestra una distribución heterogénea a lo largo de la región CA1, con una localización especialmente densa alrededor del estrato de neuronas piramidales (SPi) en los ratones tipo autista, en comparación con los ratones silvestres donde no hay zonas con una mayor concentración de estas células (Fig. 7B y 7C).

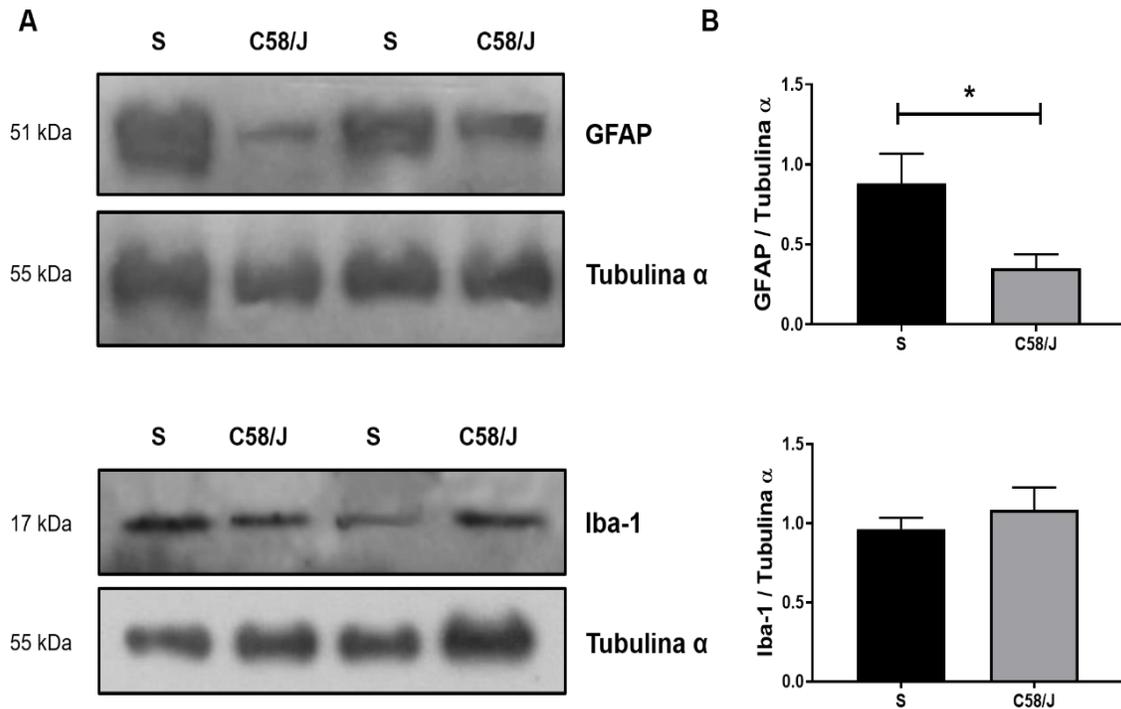


Figura 6. El contenido de las proteínas GFAP e Iba-1 presenta modificaciones en el hipocampo de los ratones tipo autista. **A)** Imágenes representativas de *western blot* de las proteínas GFAP (arriba) e Iba-1 (abajo) en el hipocampo de ratones tipo autista (C58/J) y silvestres (S). Se utilizó la proteína α -tubulina como control de carga. **B)** Análisis densitométricos de los *western-blot*s. Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; n = 6 ratones de cada cepa, datos de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba t de Student de dos colas, para muestras no pareadas. * p < 0.05.

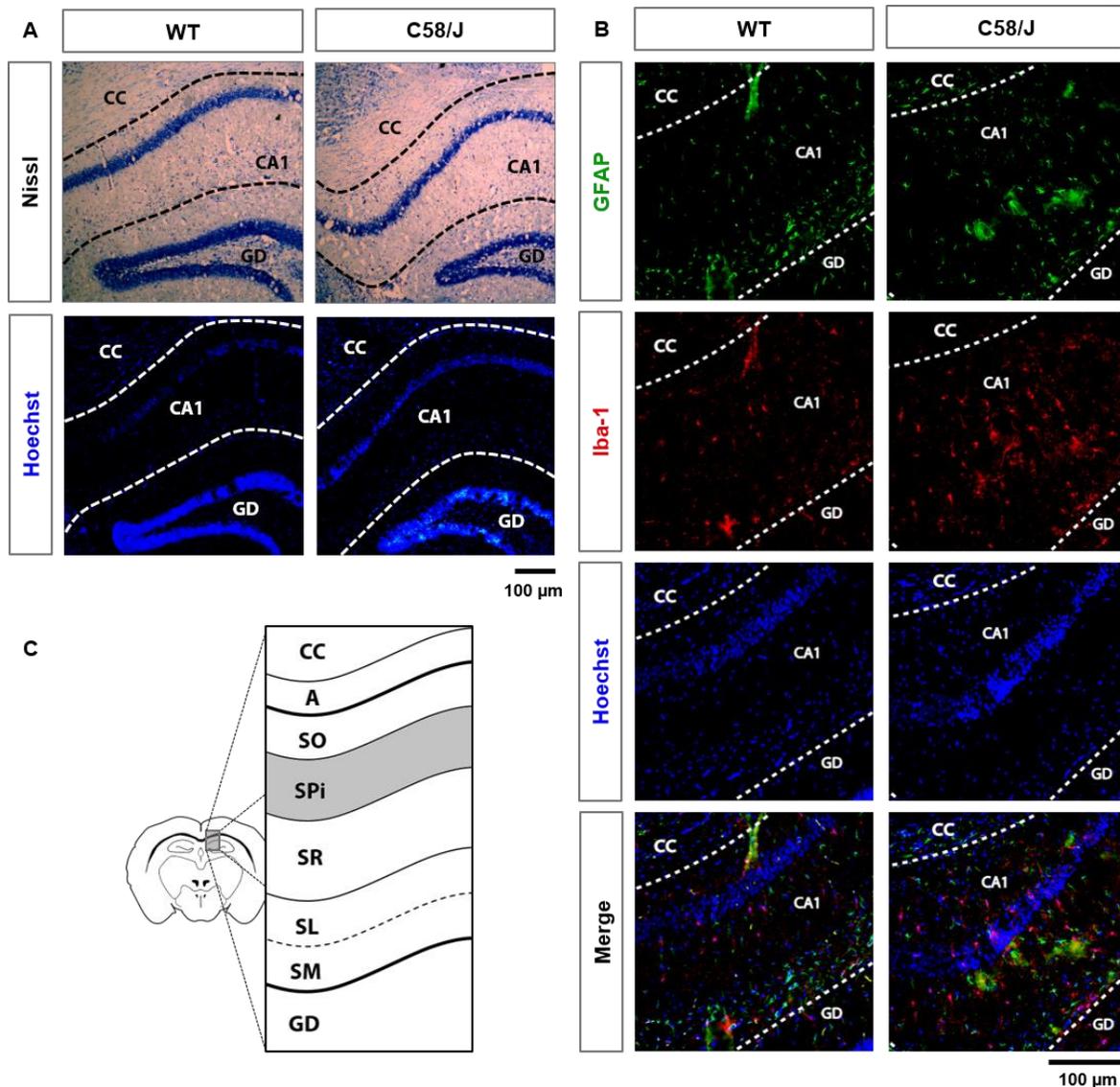


Figura 7. Evaluación de astrocitos y microglía en la región CA1 del hipocampo de ratones silvestres y tipo autista. **A)** Imágenes representativas de la región CA1 del hipocampo teñido con violeta de cresilo (Nissl) (arriba) y Hoechst 33364 (abajo). **B)** Imágenes representativas de la región CA1 del hipocampo de ambas cepas. Los astrocitos y microglía fueron evaluados a través de la expresión de las proteínas GFAP (AF488, verde) e Iba-1 (AF594, rojo), respectivamente. Además, para identificar los núcleos se empleó Hoechst 33364 (azul). **C)** Representación esquemática de la organización de las capas de la región CA1 del hipocampo de ratón; el cuerpo calloso, el alveus y el giro dentado no pertenecen a ésta. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de A) 10x y B) 20x. Barras de escala = 100 μm. Cuerpo calloso = **CC**; *cornu Ammonis 1* = **CA1**; *alveus* = **A**; *stratum oriens* = **SO**; *stratum piramidale* = **SPi**; *stratum radiatum* = **SR**; *stratum lucidum* = **SL**; *stratum moleculare* = **SM**; giro dentado = **GD**.

Al cuantificar estas células, se observó que el número de astrocitos por UA en la región CA1 del hipocampo de ratones tipo autista muestra una disminución significativa ($p < 0.0001$) en comparación con los ratones silvestres. Sin embargo, la IMF por UA para GFAP en estas imágenes, revela una tendencia a aumentar en los ratones tipo autista (Fig. 8A), lo cual podría deberse a un incremento del contenido de esta proteína en las células, asociado a astrocitos reactivos, o bien, a la presencia extracelular de ella. En ambos casos, futuros estudios serán necesarios para demostrar la existencia de cualquiera de estos procesos.

Por otro lado, el número de microglía por UA, en la misma región del hipocampo de los ratones tipo autista, presentó un aumento significativo ($p < 0.01$) con respecto a los ratones silvestres. En concordancia, también se observó un aumento significativo en la IMF por UA para la proteína Iba-1 en los ratones tipo autista en comparación con los silvestres ($p < 0.05$) (Fig. 8B). En conjunto, el aumento en el número de células Iba-1⁺ y en la IMF para esta proteína en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista, puede indicar un proceso de proliferación de la microglía (Marlatt et al., 2014) o un proceso de reclutamiento de células a esta región específica (Kurpius, Nolley, & Dailey, 2007; Schiefer, Kampe, Dodt, Zieglgänsberger, & Kreutzberg, 1999) lo que podría encontrarse asociado a un fenómeno de activación celular y a un posible fenómeno neuroinflamatorio en el cerebro de los ratones tipo autista.

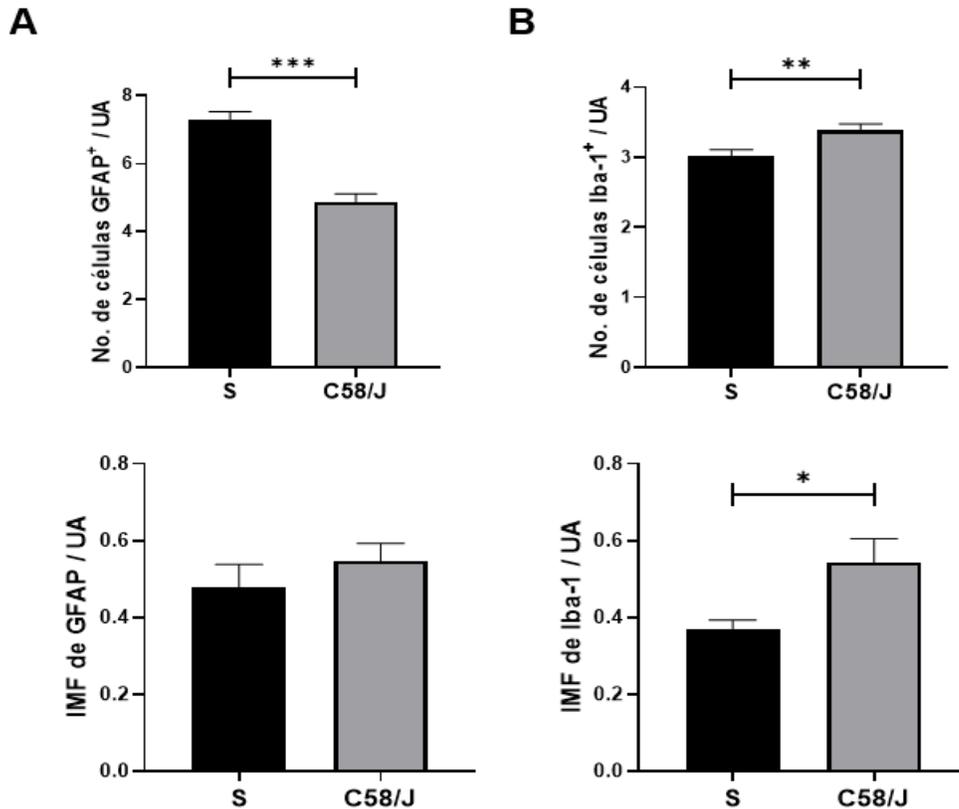


Figura 8. Los números de astrocitos y de microglía por unidad de área en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista C58/J están alterados. Número de células e intensidad media de fluorescencia (IMF) por unidad de área para **A**) GFAP e **B**) Iba-1 en la región CA1 del hipocampo de los ratones silvestres C57BL/6J (S) y tipo autista (C58/J). Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; $n = 3$ ratones, datos de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba t de Student de dos colas, para muestras no pareadas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

Al observar los resultados de inmunofluorescencia para GFAP, puede apreciarse la presencia de zonas inmunorreactivas en el parénquima del hipocampo (Fig. 7), además de un ligero incremento de la IMF por UA para esta proteína (Fig. 8A), a pesar de la reducción en el número de células GFAP⁺ en la misma zona (Fig. 8A). Esta discrepancia nos llevó a realizar una evaluación cualitativa de todos los campos teñidos por inmunofluorescencia para GFAP, la cual señaló que hay una mayor frecuencia de zonas inmunorreactivas a GFAP en el parénquima hipocampal de los ratones con fenotipo autista (Fig. 9).

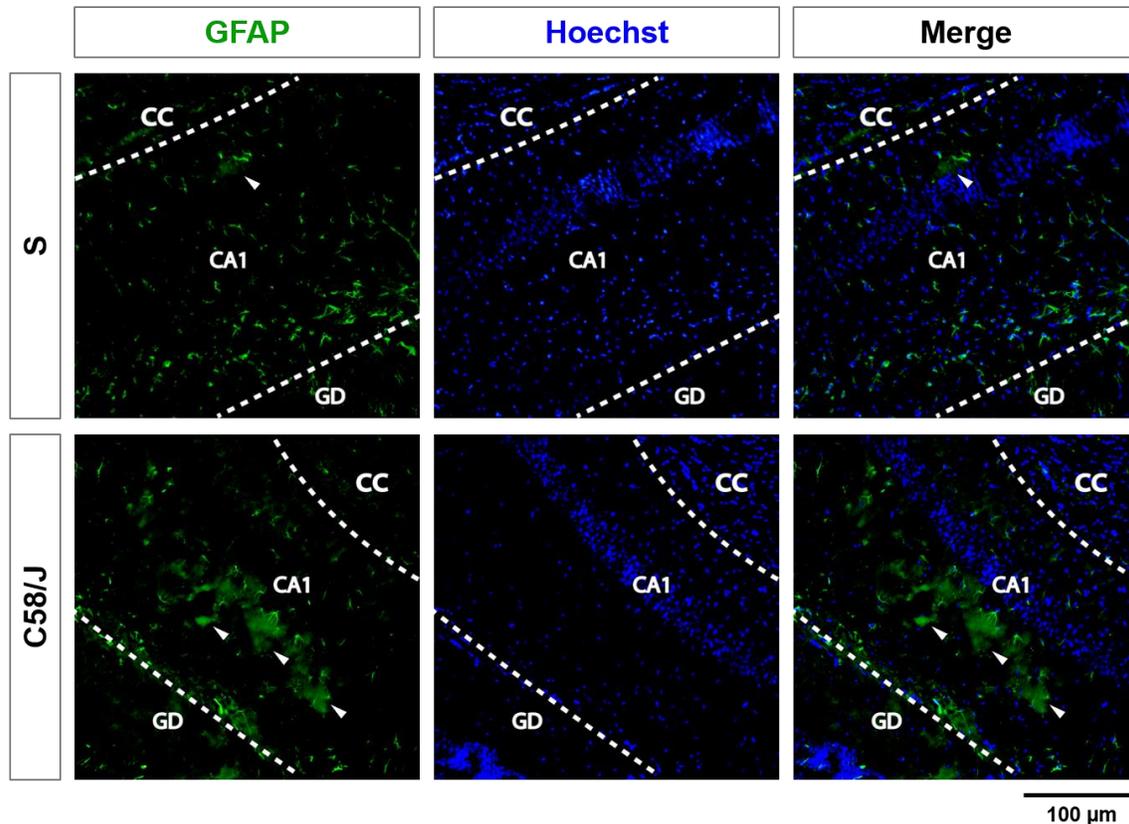


Figura 9. Los ratones de la cepa tipo autista presentan zonas inmunorreactivas a GFAP en el parénquima del hipocampo. Imágenes representativas de zonas inmunorreactivas a GFAP en el parénquima de la región de ratones silvestres (C57BL/6J, *arriba*) y tipo autista (C58/J, *abajo*). Estas zonas se señalan con cabezas de flecha en color blanco. Barra de escala = 100 μ m. Cuerpo caloso = **CC**; *cornu Ammonis 1* = **CA1**; *alveus* = **A**; Giro dentado = **GD**

8.3 Evaluación de la morfología de la microglía en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista

Dado que ha sido reportado que la microglía transformada – o activada – es capaz de adquirir una morfología ameboide, con menor número de procesos celulares o de menor longitud, con la capacidad de migrar, proliferar y fagocitar (Verkhatsky & Butt, 2013; Wake, Moorhouse, Miyamoto, & Nabekura, 2013), se decidió evaluar el estado morfológico de la microglía en los ratones tipo autista.

Para lograr lo anterior se decidió emplear el análisis fractal, el cual es un grupo de métodos utilizados para cuantificar formas difíciles de describir. El punto central de este tipo de análisis es la dimensión fractal (D_F), que se refiere a un número que describe el detalle

con el que cambia un patrón cuando éste se analiza a varias escalas. Esta variación de escalas es conocida como complejidad. Por lo tanto, mientras más grande sea la D_f más grande es la complejidad de la forma (Karperien, Ahammer, & Jelinek, 2013). Por su parte, la lacunaridad mide la heterogeneidad presente en una región. De tal manera, las formas con alta lacunaridad son poco homogéneas y las formas con baja lacunaridad son homogéneas, o rotacionalmente invariantes (Karperien et al., 2013).

Otros de los parámetros obtenidos para la microglía a partir de este análisis en el presente estudio fueron el área convexa envolvente (ACE), que se refiere al polígono mínimo con ángulos internos menores a 180° que es capaz de envolver a la célula; el área de la célula (AC), que es una relación directa del número de píxeles que conforman a la célula, el cual es transformado a su equivalente en micrómetros cuadrados (μm^2) ($1 \text{ pixel} = 0.1681 \mu\text{m}^2$); la densidad de la célula (DC, conocida también como solidez) que se obtiene a partir del cociente del AC sobre el ACE, y representa la relación entre la extensión de la célula y su área, dando razón de una célula más compacta mientras los valores sean más altos; y el perímetro de la célula (PC) que se basa en la línea de un solo píxel que delimita a la célula, se expresa en micrómetros (μm) ($1 \text{ pixel} = 0.41 \mu\text{m}$), y se relaciona con la cantidad de membrana que posee la célula (Fernández-Arjona, Grondona, Granados-Durán, Fernández-Llebrez, & López-Ávalos, 2017).

En nuestro análisis no se observaron cambios significativos en los parámetros de dimensión fractal, lacunaridad o área de la célula (Fig. 9A, 9B y 9D, respectivamente); indicando que no existen diferencias en la complejidad celular, heterogeneidad o tamaño de la microglía en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista.

Sin embargo, la microglía en la región CA1 del hipocampo mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en los parámetros de ACE y PC (Fig. 10C y 10F, respectivamente); mientras que la DC presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) en los ratones tipo autista (Fig. 10E). Los valores de ACE aumentados en la microglía de los ratones tipo autista indican que éstas presentan una mayor extensión celular; por lo cual, a su vez, las mismas células presentan una menor solidez de acuerdo con la disminución en la DC, indicando que las células se encuentran más compactas, ya que el AC no abarca una mayor porción de la ACE, en comparación con los ratones silvestres. Por otro lado, el perímetro indica que la microglía en los ratones tipo autista posee una mayor cantidad de membrana plasmática, comparada con los ratones silvestres. Los resultados de este análisis se resumen en la tabla 5.

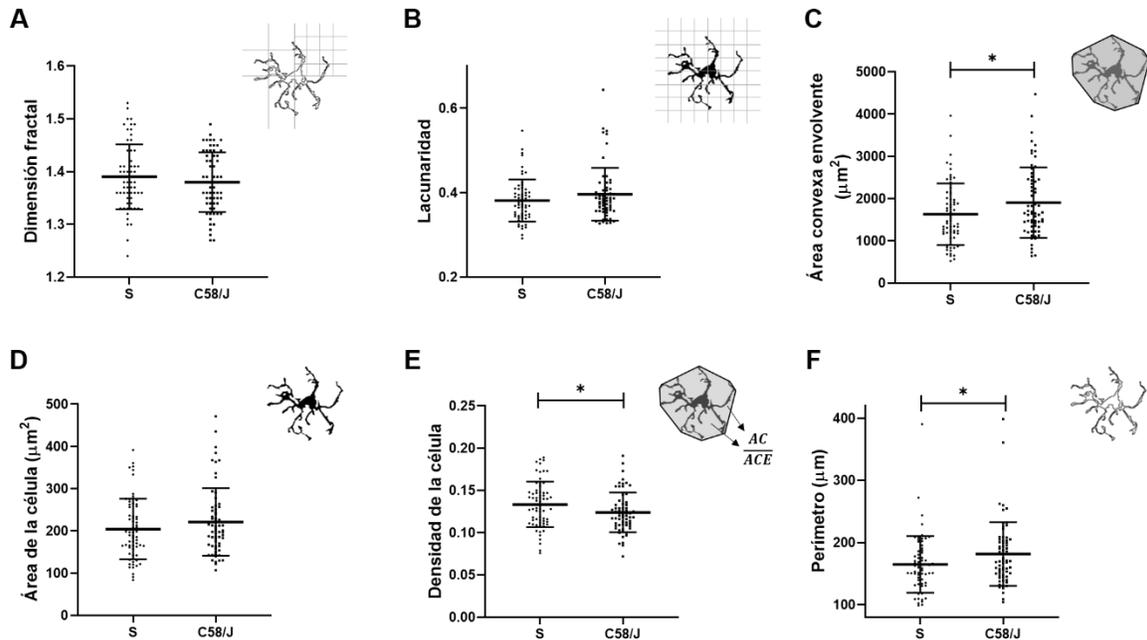


Figura 10. Los parámetros morfológicos de la microglía derivados de análisis fractal en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista (C58/J) muestran cambios. Medidas de A) dimensión fractal, B) lacunaridad, C) área convexa envolvente, D) área de la célula, E) densidad celular y F) perímetro celular, obtenidas por cada microglía. Las gráficas representan la media \pm D.E.; $n = 69$ células (C58/J, 3 ratones) y $n = 68$ células (S, 3 ratones), en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba t de Student de dos colas, para muestras no pareadas. * $p < 0.05$.

Tabla 5. Parámetros morfométricos de la microglía presente en la región CA1 del hipocampo de ratones tipo autista (C58/J) y silvestres (S)

| Parámetro | S | D.E. | C58/J | D.E. | Valor p |
|-------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|------------------|
| Dimensión fractal (D) | 1.390 | 0.06139 | 1.380 | 0.05668 | ns |
| Lacunaridad | 0.3815 | 0.05001 | 0.3965 | 0.06262 | ns |
| Área convexa envolvente (ACE) | 1631 | 730.3 | 1908 | 832.5 | < 0.05 |
| Área de la célula (AC) | 204.5 | 71.71 | 221.5 | 80.39 | ns |
| Densidad de la célula (DC) | 0.1334 | 0.02698 | 0.1240 | 0.02353 | < 0.05 |
| Perímetro de la célula (PC) | 164.9 | 45.63 | 181.7 | 51.29 | < 0.05 |

D.E. Desviación estándar
 ns No significativo

Con el objetivo de evaluar otras variables con la capacidad de describir aspectos distintos de la morfología de la microglía, se obtuvo el número de terminaciones por cada célula, así como la longitud total de las ramificaciones (μm) de la microglía en la región CA1 del hipocampo de ambas cepas. Estos parámetros describen el grado de ramificación de la célula. El número de terminaciones por célula fue graficado en función de la longitud de sus ramificaciones (Fig. 11).

Para conocer cómo se modifica el número de ramificaciones en función de la longitud total de éstas, se evaluó el grado de correlación entre estas dos variables mediante un coeficiente de correlación de Pearson (r), obteniendo valores de 0.8793 ($p < 0.001$) y de 0.6946 ($p < 0.001$) para los ratones S y C58/J, respectivamente (Fig. 11A y 11B, respectivamente), indicando que en ambas cepas, de forma general, la longitud total de las ramificaciones aumenta conforme aumenta el número de terminaciones por célula.

Para saber si la relación entre el número de terminaciones por célula y la longitud de las ramificaciones se modifica de igual forma en ambas cepas, ambos coeficientes de correlación fueron comparados entre sí mediante una transformación z de Fisher a través del paquete `cocor` para R, implementado por Diedenhofen & Musch (2015) (Figura 10C), observándose que existe una diferencia significativa entre ambos ($p < 0.0032$). Esto indica que la longitud total de las ramificaciones en relación con el número de terminaciones por célula se modifica de manera distinta en ambas cepas. Lo anterior puede indicar que existen poblaciones de la microglía en los ratones tipo autista morfológicamente distintas a las presentes en los ratones silvestres.

Al comparar la dispersión de la microglía tomando en cuenta los parámetros de longitud total de las ramificaciones y número de terminaciones, se observa que existen por lo menos dos poblaciones de células que se encuentran presentes de forma casi exclusiva en los ratones de la cepa tipo autista (Fig. 11D, líneas punteadas), indicando la posible existencia de poblaciones celulares con estados de activación o estados transicionales distintos en los ratones tipo autista, sugiriendo un posible evento de neuroinflamación en el hipocampo de los ratones de la cepa C58/J.

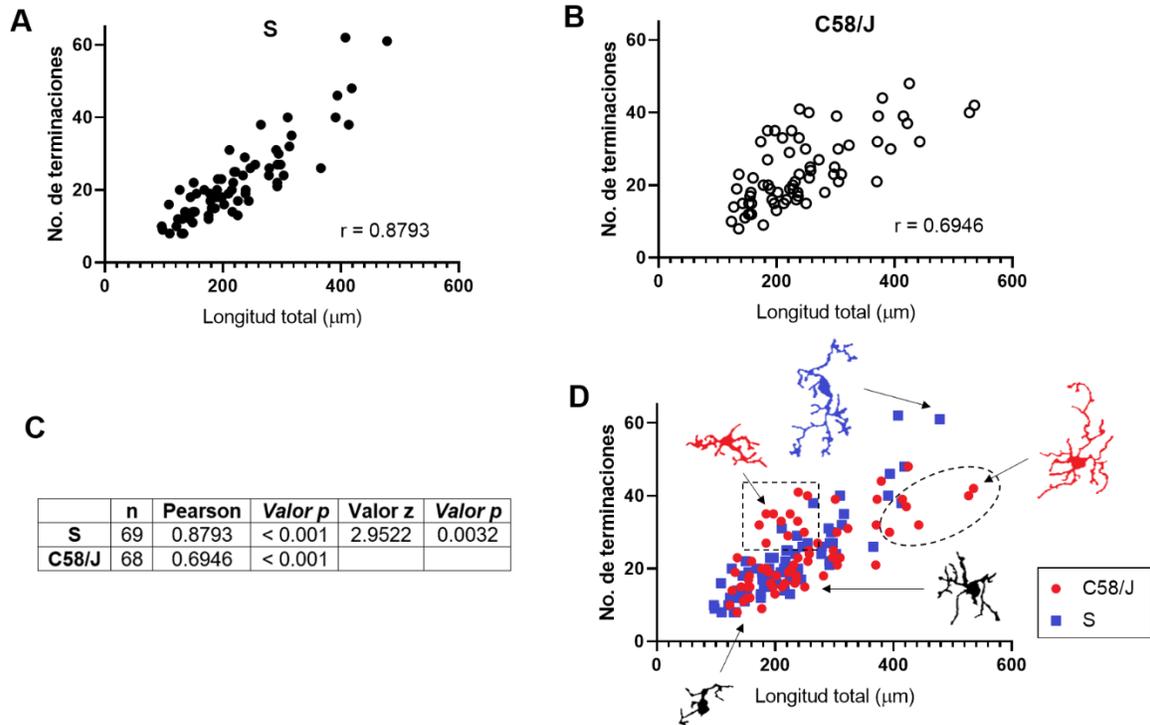


Figura 11. Los tipos morfológicos de la microglía presentes en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista (C58/J) difieren de los que se encuentran en los ratones silvestres. Gráficos de dispersión de los parámetros de longitud total de las ramificaciones y número de terminaciones de la microglía en la región CA1 del hipocampo de ratones silvestres **(A)** y tipo autistas **(B)**. Se muestra el coeficiente de correlación de Pearson entre ambos parámetros para las dos cepas. **C)** Resumen del análisis de comparación para coeficientes de correlación mediante transformación z de Fisher. **D)** Comparación de la dispersión de la microglía en la región CA1 del hipocampo de ratones silvestres (azul), tipo autista (rojo) y poblaciones comunes a las dos cepas (negro) a partir de los parámetros de longitud total de las ramificaciones y número de terminaciones. Mientras que ambas cepas comparten una gran proporción de estas poblaciones basándose en la morfología de las células, algunas morfologías se encuentran presentes de forma casi exclusiva en los ratones de la cepa C58/J (líneas punteadas), indicando la existencia de poblaciones celulares con estados de activación o estados transicionales de activación diferentes. Las gráficas representan la dispersión del número de terminaciones vs la longitud total de los procesos celulares (μm); $n = 69$ (C58/J) y 68 (S), en tres experimentos independientes.

9. Discusión

Se sabe que la microglía y los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el neurodesarrollo, incluyendo la regulación en la formación de sinapsis y la modulación de las vías inmunológicas e inflamatorias del SNC. Debido a que tanto la formación de sinapsis alterada como la neuroinflamación han sido vinculadas al desarrollo del TEA, ambas poblaciones de la glía han recibido creciente atención para intentar explicar los mecanismos que subyacen a la aparición de este grupo de trastornos (Rodríguez & Kern, 2011; D. Zhang, Hu, Qian, O'Callaghan, & Hong, 2010).

Los ratones de la cepa murina con fenotipo autista C58/J presentan una disminución en el contenido de GFAP en la región CA1 del hipocampo mientras que Iba-1 no presenta cambios

En varias patologías del SNC – por ejemplo, trauma, isquemia, trastorno depresivo mayor, esclerosis múltiple – los astrocitos son susceptibles a responder rápidamente a lesiones o alteraciones de la homeostasis, llevando a un proceso de astrogliosis (Eng & Ghirnikar, 1994; Sofroniew, 2014). La astrogliosis se caracteriza por un aumento de los filamentos intermedios que componen el citoesqueleto de los astrocitos, principalmente vimentina y GFAP, acompañado de hipertrofia celular y un aparente incremento en el número de astrocitos. El aumento en el contenido de GFAP o en su inmunorreactividad en tejido han sido descritos en varios modelos experimentales que involucran a la astrogliosis (Zhang et al., 2010).

Al respecto, se ha sugerido que los astrocitos en diversas áreas del cerebro de los sujetos con TEA pueden mostrar un patrón anómalo de activación (Petrelli et al., 2016; Zeidán-Chuliá et al., 2014). Por ejemplo, un estudio clínico elaborado por Bailey y colaboradores señaló la existencia de focos con gliosis en cerebros *post mortem* de dos sujetos diagnosticados con autismo, de 24 y 27 años; con un prominente reemplazo de células nerviosas por astrocitos reactivos en el lóbulo occipital en uno de ellos (Bailey et al., 1998). Si bien limitado por el número de sujetos y por los criterios diagnósticos diferentes a los que actualmente se usan, este estudio reconoce la posibilidad de que la heterogeneidad etiológica observada en el TEA esté relacionada con una reacción inespecífica de los astrocitos en el SNC de estos sujetos.

Algunos estudios han evaluado el contenido de la proteína GFAP en tejido cerebral *post mortem* de personas con TEA en regiones cerebrales diferentes a las que se evaluaron

en el presente trabajo. En ellos se halló que estos individuos presentan una elevación en el contenido de GFAP en las cortezas frontal, parietal y en el cerebelo (Laurence & Fatemi, 2005), así como en la materia blanca de la corteza cingulada anterior (área de Brodmann 24, BA24), pero no así en la materia gris de la misma región ni en la CPF anterior (BA10) de los mismos sujetos (edad media = 20.2 años) (Crawford et al., 2015), señalando que existen modificaciones en el contenido de esta proteína en estos sujetos, las cuales pueden ser sutiles y heterogéneas, incluso dentro de la misma región cerebral. No obstante, ningún estudio ha evaluado el contenido de esta proteína en tejido hipocampal post mortem de sujetos con TEA.

Nuestro estudio exploratorio de los astrocitos y la microglía en el hipocampo de ratones de la cepa C58/J, con fenotipo autista, indicó que existe una disminución en el contenido de la proteína GFAP (Fig. 6B), en contraste con lo que se ha reportado para otras áreas del cerebro en sujetos con TEA, lo cual podría deberse a que dentro de la formación hipocampal existen diferentes subregiones que son heterogéneas entre sí.

El modelo de autismo inducido por administración prenatal de ácido valproico (VPA) en ratas es un modelo cuya validez de aspecto y de concepto han sido bien probadas (Nicolini & Fahnestock, 2018). En este modelo se ha demostrado que las ratas macho nacidas de hembras tratadas con 500 mg/kg de VPA al día gestacional 12.5, presentan conductas repetitivas aumentadas, así como vocalizaciones ultrasónicas y conductas sociales reducidas. Estas alteraciones en la conducta se encuentran acompañadas por una ligera reducción en el contenido de GFAP en el hipocampo al día postnatal 35 (Bronzuoli et al., 2018). En concordancia, nosotros hallamos que, en ratones adultos de diez semanas, existe una disminución en el contenido de esta misma proteína en la misma región del cerebro, indicando que podría tratarse de un fenómeno que se observa acompañado de la aparición de conductas asociadas al TEA en estos modelos animales.

Un estudio previo elaborado en nuestro laboratorio indicó que no existen diferencias significativas en el contenido de GFAP en el hipocampo, en la CPF o en el cerebelo de los ratones macho de la cepa C58/J de diez semanas de edad, pero sí una disminución en el contenido del factor neurotrófico secretado por astrocitos TSP-1 (Barón-Mendoza et al., 2018). Una diferencia entre los ratones utilizados en ese estudio con respecto al presente yace en la utilización de madres nodrizas de la cepa C57BL/6J para amamantar a los ratones de la cepa C58/J en el primero. Al respecto, un estudio reportó que la separación materna durante la etapa de lactancia se relaciona con un aumento en el número de células

GFAP+ en el hipocampo de ratas Wistar albinas (Muñoz Valencia et al., 2019), sugiriendo que la utilización de nodrizas en roedores puede tener un impacto sobre el contenido de proteínas astrocíticas de las crías y explicaría los resultados reportados previamente por nuestro laboratorio.

Al evaluar la microglía en el hipocampo de los ratones con fenotipo autista, a través del contenido de la proteína Iba-1, no hallamos diferencias en éste (Fig. 6B) probablemente debido a que de esta forma se analiza la formación hipocampal completa donde se incluyen subregiones donde las poblaciones de la microglía podrían presentar conformaciones diferentes o cambios más sutiles. Futuros estudios serán necesarios para explorar la densidad de la microglía a lo largo de las demás subregiones del hipocampo de los ratones con fenotipo autista.

Los ratones de la cepa murina con fenotipo autista C58/J presentan alteraciones en el número de astrocitos y microglía de la región CA1 del hipocampo

Existen pocos estudios que han evaluado las poblaciones de astrocitos en cerebros *post mortem* de individuos con TEA. Uno de ellos señala la existencia de una marcada respuesta celular por parte de estos en el cerebelo, en el giro frontal medial y en la corteza cingulada anterior que se manifiesta a través de un aumento de la inmunorreactividad a GFAP en estas regiones del SNC (Vargas et al., 2005) lo que indica un proceso de astrogliosis. Un par de estudios adicionales reportaron que no existen diferencias en la densidad ni en la morfología de los astrocitos en la corteza prefrontal dorsolateral (CPFdl) (Lee et al., 2017), ni en la amígdala (Morgan et al., 2014) de sujetos con TEA, sin embargo, los autores no descartan la posibilidad de una activación en las poblaciones de astrocitos en otras áreas del cerebro.

En nuestro caso, al evaluar de forma específica la región CA1 en el hipocampo (Fig. 7A) de los ratones tipo autista mediante inmunofluorescencia, observamos que estos presentan una disminución en el número de astrocitos por UA (Fig. 8A), lo que concuerda con una disminución en el contenido de GFAP en el hipocampo de estos ratones. No obstante, la misma región del hipocampo en estos ratones presentó una elevación en el IMF para GFAP, la cual puede deberse a la presencia de zonas inmunorreactivas a GFAP en el parénquima del hipocampo; misma que nosotros reportamos de forma cualitativa en el presente estudio. Será necesario evaluar en estudios posteriores si estas zonas inmunorreactivas corresponden a la presencia de GFAP extracelular contenido en cuerpos

apoptóticos o en el espacio perivascular, pues no se conocen funciones de esta proteína fuera de la célula.

De manera interesante, recientemente se reportó la presencia de cuerpos apoptóticos inmunorreactivos a GFAP concentrados en zonas perivasculares de diversas áreas del cerebro *post mortem* de sujetos con TEA de diferentes edades, incluido el hipocampo. Estos cuerpos apoptóticos se correlacionan positivamente en número con la cantidad de linfocitos T CD8+ en las mismas zonas perivasculares, con presencia de fibrosis debida probablemente a la toxicidad mediada por estas células (DiStasio, Nagakura, Nadler, & Anderson, 2019). Aunque preliminar, este estudio sugiere la posibilidad de que una porción de sujetos con TEA idiopático podría presentar procesos inflamatorios que involucran la apoptosis de astrocitos como una de las causas que subyacen las alteraciones neuronales que devienen en las conductas características del TEA.

En el modelo de autismo en ratas inducido por la administración prenatal de VPA descrito previamente se ha reportado que una reducción en el número de células GFAP+ en la región CA1 del hipocampo al día postnatal 35 pero no a los 15 ni a los 90 días (Bronzuoli et al., 2018), señalando que los cambios observados en estas células podrían estar sujetos a procesos muy sutiles que aparecen de forma transitoria, pero son modulados rápidamente para minimizar los daños en el SNC.

Se han observado alteraciones en la organización de la microglía en la región CPF dorsolateral de individuos con TEA. En esta región, la microglía aparece anormalmente próxima a las neuronas en intervalos de 25, 75 y 100 μm , en comparación con sujetos neurotípicos, rodeando en algunos casos el soma de las neuronas (Morgan et al., 2012). Esto sugiere que, durante el TEA, la distribución espacial de la microglía se encuentra alterada, indicando posibles procesos de reclutamiento a zonas aledañas a las neuronas. Nosotros reportamos en este estudio, de forma cualitativa, que la microglía muestra una concentración en la capa de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista. De forma interesante, Lee y colaboradores (2017) reportaron la presencia de cúmulos de microglía en la corteza temporal de cerebros *post mortem* de sujetos con TEA (Lee et al., 2017) como evidencia adicional de una disposición espacial anómala de la microglía en sujetos con TEA.

Además, se ha reportado que la densidad de microglía por unidad de área se encuentra aumentada en las cortezas frontoinsular, visual (Tetreault et al., 2012) y

prefrontal dorsolateral (Morgan et al., 2010) en los sujetos con TEA. De manera similar, nosotros reportamos que la microglía se encuentra aumentada por unidad de área en la región CA1 del hipocampo de los ratones tipo autista, indicando que estas células atraviesan un proceso de proliferación o de migración a ciertas áreas del hipocampo; pues se sabe que tras ser activadas por estímulos diversos (isquemia, patógenos o restos celulares) estas células son capaces de proliferar, migrar a las zonas de daño y secretar factores neurotóxicos y neurotróficos por igual (Garden & Möller, 2006).

Los ratones de la cepa murina con fenotipo autista C58/J presentan poblaciones de la microglía en la región CA1 del hipocampo con una morfología diferente a la observada en ratones silvestres

También hallamos que existen cambios en la morfología de la microglía en la región de hipocampo evaluada, que se manifiestan a través de aumentos en el área convexa envolvente y en el perímetro de la célula (Fig. 10). Estos resultados señalan que una porción de la microglía en el hipocampo de los ratones con fenotipo autista presenta cambios sutiles en estos parámetros sugiriendo la presencia de células con una morfología más compacta y con una mayor cantidad de membrana celular.

Se ha reportado ampliamente que los cambios morfológicos en la microglía se relacionan con su estado de activación. Los estados altamente ramificados con un volumen del soma menor se vinculan a un estado no activado y de vigilancia (Dwyer & Ross, 2016); mientras que, tras ser activadas, la morfología celular se vuelve más compacta y los procesos celulares declinan en número y longitud adoptando una forma amebode, volviéndose casi indistinguibles de los macrófagos derivados de monocitos (Hanisch & Kettenmann, 2007; Taylor, Morganti-Kossmann, Lifshitz, & Ziebell, 2014).

Al analizar los patrones de ramificación y longitud de los procesos celulares de la misma microglía, no observamos una separación contundente de las poblaciones que indicara un cambio en el estado de activación global de éstas en la región CA1 del hipocampo (Fig. 11). Más bien, la mayor parte de las poblaciones de la microglía que se pueden hallar en los ratones silvestres se encuentran también presentes en los ratones tipo autista, sin embargo, estos últimos presentan subconjuntos de células con menor número de ramificaciones de longitudes variables (Fig. 11, líneas punteadas), que podrían indicar estados diferentes de activación o de *priming* para montar respuestas inmunológicas.

Al respecto, se ha reportado que las alteraciones morfológicas de la microglía en el cerebro de los sujetos con TEA parecen ser moderadamente heterogéneas de individuo a individuo. Mientras que un conjunto de los sujetos analizados presenta alteraciones en la morfología de la microglía moderadas a severas, otros presentan alteraciones mínimas a leves (Morgan et al., 2010). Más aún, se ha reportado que, en la corteza temporal de sujetos con TEA, no existen diferencias en la densidad de la microglía sino en la proporción de células con fenotipos activados y fenotipos en reposo cuando se evalúan a partir de la morfología, utilizando la proteína Iba-1 como marcador de esta población celular (Lee et al., 2017).

De hecho, Lee y colaboradores (2017) sugieren la posibilidad de que la disminución en la cantidad de células ramificadas, cuya principal función homeostática es sondear las terminales sinápticas constantemente (Paolicelli et al., 2011; Wake et al., 2009), y su desplazamiento hacia un fenotipo activado podría relacionarse con una disminución en la actividad de poda sináptica en diversos estadios del desarrollo, llevando a un aumento en el número de espinas dendríticas, tal como se ha reportado en los sujetos con TEA cuando se comparan las mismas regiones del SNC con sujetos neurotípicos (Hutsler & Zhang, 2015; Tang et al., 2014), contribuyendo a los defectos en la conectividad cerebral en este grupo de trastornos.

De forma interesante, estudios elaborados en nuestro laboratorio hallaron que los ratones de la cepa murina C58/J con fenotipo autista presentan un aumento en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales del hipocampo (Maqueda-Martínez, tesis de licenciatura en preparación), además de un mayor número de espinas dendríticas con fenotipos inmaduros de acuerdo con su morfología (Barón-Mendoza, en preparación), indicando que podrían existir mecanismos convergentes en la aparición de los signos conductuales que esta cepa de ratones comparte con los sujetos con TEA.

El exceso en la densidad de espinas dendríticas pudiera ser bien explicado por deficiencias en la actividad de las células de la glía, pues se ha reportado que tanto los astrocitos como la microglía son capaces de reconocer y eliminar espinas dendríticas a través de distintos mecanismos moleculares (Stein & Zito, 2019).

Por ejemplo, los astrocitos son capaces de modular la retracción de espinas dendríticas en el hipocampo de ratón a través de la señalización por el receptor EphA4, a través su ligando efrina-A3 (Murai, Nguyen, Irie, Yamaguchi, & Pasquale, 2002); por su

parte, se ha demostrado que, en la microglía del hipocampo de ratones, el receptor a fractalquina (CX3CR1) es necesario para el reconocimiento y fagocitosis de espinas dendríticas durante la poda sináptica (Paolicelli et al., 2011). Estos resultados indican que alteraciones en el funcionamiento de las poblaciones de la glía podrían tener un impacto sobre la dinámica estructural de las espinas dendríticas, no obstante, será necesario comprobar si un proceso relacionado a la funcionalidad de las células gliales en el hipocampo de la cepa murina C58/J se vincula con estas modificaciones en la densidad de espinas dendríticas.

Fenómenos de activación de la microglía en diversas zonas del SNC tales como el cerebelo (Vargas et al., 2005), la CPF (Morgan et al., 2010), el cerebro medio, la corteza orbitofrontal y la corteza cingulada anterior (Suzuki et al., 2013) han sido reportados en los sujetos con TEA. Esto podría vincularse con la hiperconectividad local y la subconectividad a larga distancia entre regiones del SNC que se ha propuesto que ocurre durante el TEA (Courchesne & Pierce, 2005), sin embargo, futuros estudios serán necesarios para comprobar la existencia de alteraciones similares en la cepa murina C58/J con fenotipo autista.

Los cambios en las poblaciones de astrocitos y de microglía en una región del hipocampo reportados aquí podrían explicar modificaciones en las poblaciones neuronales que, a su vez, podrían significar un impacto en la conducta observada en esta cepa de ratones. Por un lado, la disminución en el número de astrocitos podría tener repercusiones en el soporte mecánico y metabólico de las neuronas en el hipocampo, llevando a una disminución en la cantidad de factores tróficos que estimulan la elongación de neuritas, generando el fenotipo de reducida complejidad en el árbol dendrítico que se observa en el hipocampo de esta cepa (Fig. 12).

Por otro lado, el aumento en el número de células de la microglía podría significar la existencia de un proceso neuroinflamatorio que se presenta en las etapas tempranas del desarrollo, que persiste hasta la edad adulta del ratón. Estos eventos de inflamación temprana podrían estar impactando en la funcionalidad de la microglía, previniéndola de cumplir su papel en la eliminación temprana de sinapsis redundantes, generando la densidad de espinas dendríticas aumentada, así como el incremento en el número de espinas dendríticas inmaduras que también se observa en esta cepa (Fig. 12). Un posible escenario adicional indica que la microglía podría estar adoptando un fenotipo de activación M2, cuyas funciones son principalmente antiinflamatorias, con el objetivo de suplir la función

astrocítica y reestablecer el estado homeostático del SNC; sin embargo, estas hipótesis deberán ser probadas en experimentos posteriores para esclarecer el tipo de activación que se presenta la microglía en el cerebro de la cepa murina C58/J.

La limitación principal del presente estudio yace en que las descripciones hechas provienen de una sola subregión del hipocampo; por ello se plantea la necesidad de evaluar las poblaciones gliales en el resto del hipocampo y en otras regiones del cerebro de los ratones C58/J con fenotipo autista. Algunas limitaciones adicionales recaen sobre la capacidad del presente estudio para describir un estado de neuroinflamación en el hipocampo de los ratones con fenotipo autista, pues falla al analizar la morfología astrocítica para poder explorar la presencia de astrocitos hipertróficos como parte de un proceso de astrogliosis; estudios posteriores deberán evaluar estas poblaciones de células haciendo uso marcadores celulares adicionales a GFAP. La presencia de zonas inmunorreactivas a GFAP en el parénquima del hipocampo deberá ser subsecuentemente estudiada mediante técnicas que permitan confirmar la presencia extracelular de esta proteína o bien como parte de cuerpos apoptóticos. Por su parte, aunque útil como una primera aproximación, la morfología es sólo una de las herramientas para poder describir y confirmar la activación de la microglía; por ello se postula la necesidad de evaluar marcadores celulares adicionales que puedan dar cuenta de un proceso neuroinflamatorio en el hipocampo de los ratones con fenotipo autista.

Finalmente, aunque postulamos un modelo preliminar que podría explicar la relación entre las alteraciones de la glía y las alteraciones neurológicas observadas en la cepa murina C58/J, con fenotipo autista (Fig. 12), estudios posteriores serán necesarios para detallar los procesos celulares de la glía que repercuten en la funcionalidad neuronal y cómo se vinculan con la aparición del fenotipo conductual observado en esta cepa de ratones.

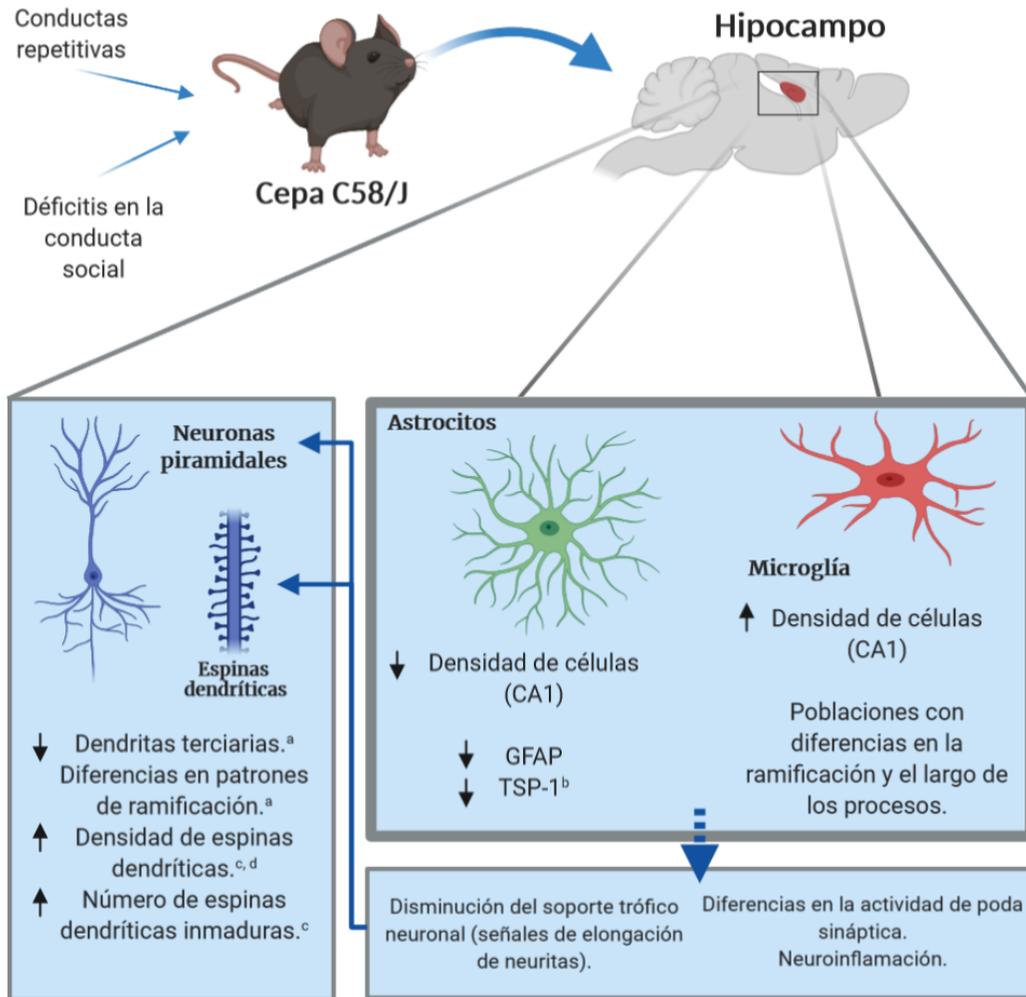


Figura 12. La cepa C58/J como modelo de estudio del TEA. Se resumen los hallazgos reportados en la cepa que permiten establecer paralelismos con el trastorno del espectro autista en humanos. Las poblaciones de astrocitos y de microglía en el hipocampo de los ratones de la C58/J presentan alteraciones que pueden afectar su funcionamiento normal. Se ha propuesto que estas alteraciones pueden tener un impacto en el papel trófico que ejercen los astrocitos sobre las neuronas; además, posibles alteraciones inmunológicas en el SNC podrían generar perfiles de activación de la microglía que pueden interferir en la funcionalidad neuronal. Evidencias adicionales sugieren que la dinámica del citoesqueleto neuronal en el hipocampo de estos ratones presenta alteraciones que podrían repercutir en la complejidad del árbol dendrítico y en los procesos de plasticidad estructural, tal como se ha reportado en los sujetos con TEA. Aunque el hipocampo no ha sido estudiado tan extensamente en estos individuos, se han elaborado hipótesis que sugieren su participación en el origen y desarrollo del TEA.

↑ = aumento; ↓ = disminución.

^a Barón-Mendoza et al., 2019, ^b Barón-Mendoza et al., 2018. ^c Barón-Mendoza, en preparación. ^d Maqueda-Martínez, tesis de licenciatura en preparación.

10. Conclusiones

- La cepa murina C58/J, con fenotipo autista, presenta una disminución en el contenido de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) en el hipocampo, en comparación con la cepa murina silvestre C57BL/6J.
- La cepa murina C58/J, con fenotipo autista, no presenta cambios en el contenido de la proteína Iba-1 en el hipocampo, en comparación con la cepa murina silvestre C57BL/6J.
- La cepa murina C58/J, con fenotipo autista, presenta una disminución en la densidad de astrocitos, así como un aumento en la densidad de la microglía en la región CA1 del hipocampo, en comparación con la cepa murina silvestre C57BL/6J.
- La microglía en la región CA1 del hipocampo de la cepa murina C58/J, con fenotipo autista, presenta morfologías distintas de las encontradas en la misma región del hipocampo de la cepa silvestre C57BL/6J.

11. Perspectivas

- Evaluar de forma comparativa las características celulares de las poblaciones de la glía en distintos tiempos del desarrollo de la cepa murina C58/J (prenatal, perinatal, infancia, adolescencia).
- Evaluar si existen diferencias en la densidad de células de la glía en las otras subregiones de la formación hipocampal (CA2, CA3, giro dentado), así como en otras regiones del SNC (corteza prefrontal y cerebelo) en la cepa murina C58/J.
- Evaluar la presencia de GFAP en el espacio perivascular del hipocampo de la cepa murina C58/J, y su posible asociación con cuerpos apoptóticos.
- Evaluar si existen subpoblaciones de la microglía en el hipocampo de la cepa murina C58/J con estados de activación que se relacionen con un proceso neuroinflamatorio.
- Evaluar si la microglía en el hipocampo de la cepa murina C58/J presenta alteraciones en la fagocitosis que repercutan en el proceso de poda sináptica en esta región del SNC.
- Evaluar si existen alteraciones en el contenido de factores solubles relevantes para la respuesta inmunológica en el cerebro y en el suero de la cepa murina C58/J.

12. Referencias

- Abbott, N. J. (2002). Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *Journal of Anatomy*, 200(6), 629–638. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x>
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Abrahams, B. S., & Geschwind, D. H. (2008). *Advances in autism genetics : on the threshold of a new neurobiology*. 9(May), 341–356. <https://doi.org/10.1038/nrg2346>
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), 675–677. <https://doi.org/10.1038/457675a>
- Allen, N. J., Bennett, M. L., Foo, L. C., Wang, G. X., Chakraborty, C., Smith, S. J., & Barres, B. A. (2012). Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature*, 486(7403), 410–414. <https://doi.org/10.1038/nature11059>
- Allen, N. J., & Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron*, 96(3), 697–708. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.056>
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia*, 36(2), 165–179. <https://doi.org/10.1002/glia.1106>
- Aloisi, F., De Simone, R., Columba-Cabezas, S., Penna, G., & Adorini, L. (2000). Functional Maturation of Adult Mouse Resting Microglia into an APC Is Promoted by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interaction with Th1 Cells. *The Journal of Immunology*, 164(4), 1705–1712. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.1705>
- Amaral, D. G. (2002, January 1). The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: Implications for understanding social anxiety. *Biological Psychiatry*, Vol. 51, pp. 11–17. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01307-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01307-5)
- Amaral, D. G., & Lavenex, P. (2007). Hippocampal Neuroanatomy. In P. Andersen, R. Morris, D. G. Amaral, T. Bliss, & J. O'Keefe (Eds.), *The hippocampus book* (pp. 37–114). Oxford University Press.

- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th ed.). <https://doi.org/10.1016/B0-12-657410-3/00457-8>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D. G., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). The Hippocampal Formation. In P. Andersen, R. Morris, D. G. Amaral, T. Bliss, & J. O'Keefe (Eds.), *The hippocampus book* (pp. 3–8). Oxford University Press.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Piane Olié, S. H., Robitaille, R., & Volterra, A. (2014). *Perspective Gliotransmitters Travel in Time and Space*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007>
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., & Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.003>
- Avni, E., Ben-Itzhak, E., & Zachor, D. A. (2018). The Presence of Comorbid ADHD and Anxiety Symptoms in Autism Spectrum Disorder: Clinical Presentation and Predictors. *Frontiers in Psychiatry*, *9*(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00717>
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D. L., Maenner, M. J., Daniels, J., Warren, Z., ... Dowling, N. F. (2018). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 Years - Autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summaries*, *67*(6). <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6706a1>
- Barker, A. J., & Ullian, E. M. (2010). Astrocytes and synaptic plasticity. *Neuroscientist*, *16*(1), 40–50. <https://doi.org/10.1177/1073858409339215>
- Barón-Mendoza, I., Del Moral-Sánchez, I., Martínez-Marcial, M., García, O., Garzón-Cortés, D., & González-Arenas, A. (2019). Dendritic complexity in prefrontal cortex and hippocampus of the autistic-like mice C58/J. *Neuroscience Letters*, *703*(March), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.018>
- Barón-Mendoza, I., García, O., Calvo-Ochoa, E., Rebollar-García, J. O., Garzón-Cortés, D., Haro-Valencia, R., & González-Arenas, A. (2018). Alterations in neuronal cytoskeletal and astrocytic proteins content in the brain of the autistic-like mouse strain C58/J. *Neuroscience Letters*, *682*(April), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.004>

- Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, 309, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>
- Bartsch, Thorsten, Döhring, J., Reuter, S., Finke, C., Rohr, A., Brauer, H., ... Jansen, O. (2015). Selective neuronal vulnerability of human hippocampal CA1 neurons: Lesion evolution, temporal course, and pattern of hippocampal damage in diffusion-weighted MR imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(11), 1836–1845. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.137>
- Bauman, M. D., Crawley, J. N., & Berman, R. F. (2019). Autism: Animal Models. *ELS*, (March), 1–22. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022368.pub2>
- Bauman, M. D., & Schumann, C. M. (2018). Advances in nonhuman primate models of autism: Integrating neuroscience and behavior. *Experimental Neurology*, 299(May 2017), 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.07.021>
- Bertrand, J., Mars, A., Boyle, C., Bove, F., Yeargin-Allsopp, M., & Decoufle, P. (2001). Prevalence of autism in a United States population: The Brick Township, New Jersey, investigation. *Pediatrics*, 108(5), 1155–1161. <https://doi.org/10.1542/peds.108.5.1155>
- Bey, A. L., & Jiang, Y. hui. (2014). Overview of mouse models of autism spectrum disorders. *Current Protocols in Pharmacology*, 2014(September), 5.66.1-5.66.26. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0566s66>
- Beyer, M., Gimsa, U., Eyüpoglu, I. Y., Hailer, N. P., & Nitsch, R. (2000). Phagocytosis of neuronal or glial debris by microglial cells: Upregulation of MHC class II expression and multinuclear giant cell formation in vitro. *Glia*, 31(3), 262–266. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200009\)31:3<262::AID-GLIA70>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200009)31:3<262::AID-GLIA70>3.0.CO;2-2)
- Bialas, A. R., & Stevens, B. (2013). TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1773–1782. <https://doi.org/10.1038/nn.3560>
- Blick, M. G., Puchalski, B. H., Bolanos, V. J., Wolfe, K. M., Green, M. C., & Ryan, B. C. (2015). Novel object exploration in the C58/J mouse model of autistic-like behavior. *Behavioural Brain Research*, 282, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.030>

- Braunschweig, D., Krakowiak, P., Duncanson, P., Boyce, R., Hansen, R. L., Ashwood, P., ... Van De Water, J. (2013). Autism-specific maternal autoantibodies recognize critical proteins in developing brain. *Translational Psychiatry*, 3(7), e277-9. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.50>
- Bronzuoli, M. R., Facchinetti, R., Ingrassia, D., Sarvadio, M., Schiavi, S., Steardo, L., ... Scuderì, C. (2018). Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Molecular Autism*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0254-0>
- Bullock, T. H., Moore, J. K., & Fields, R. D. (1984). Evolution of myelin sheaths: both lamprey and hagfish lack myelin. In *Neuroscience Letters* (Vol. 48).
- Bushong, E. A., Martone, M. E., & Ellisman, M. H. (2004). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22(2), 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2003.12.008>
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience*, 22(1), 183–192. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-01-00183.2002>
- Carlén, M., Meletis, K., Göritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., ... Frisén, J. (2009). *Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke*. <https://doi.org/10.1038/nn.2268>
- Casanova, M. F. M. F. (2007). The Neuropathology of Autism. *Brain Pathology*, 2000(24), 422–433. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00100.x>
- Cervantes, P. E., & Matson, J. L. (2015). Comorbid Symptomology in Adults with Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 45(12), 3961–3970. <https://doi.org/10.1007/s10803-015-2553-z>
- Chadman, K. K. (2017, December 2). Animal models for autism in 2017 and the consequential implications to drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, Vol. 12, pp. 1187–1194. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1383982>
- Cheng, C., Lau, S. K. M., & Doering, L. C. (2016). modulates synapse and spine defects in the fragile X mouse model. *Molecular Brain*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0256-9>

- Cheng, C., Sourial, M., & Doering, L. C. (2012). Astrocytes and Developmental plasticity in fragile X. *Neural Plasticity*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/197491>
- Choudhury, M. E., Miyanishi, K., Takeda, H., Islam, A., Matsuoka, N., Kubo, M., ... Tanaka, J. (2020). Phagocytic elimination of synapses by microglia during sleep. *Glia*, 68(1), 44–59. <https://doi.org/10.1002/glia.23698>
- Christensen, D. L., Baio, J., Van Naarden Braun, K., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., ... Yeargin-Allsopp, M. (2016). Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years - Autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2012. *MMWR Surveillance Summaries*, 65(3), 1–23. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6503a1>
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. A., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., ... Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120(3), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., ... Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394–400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>
- Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(5), 311–321. <https://doi.org/10.1038/nrn3484>
- Colello, R. J., Pott, U., & Schwab, M. E. (1994). *The Role of Oligodendrocytes and Myelin on Axon Maturation Developing Rat Retinofugal Pathway*. 74(May).
- Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Courchesne, E., & Pierce, K. (2005, April 1). Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: Local over-connectivity but long-distance disconnection. *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 15, pp. 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.03.001>
- Crawford, J. D., Chandley, M. J., Szebeni, K., Szebeni, A., Waters, B., & Ordway, G. A. (2015). Elevated GFAP Protein in Anterior Cingulate Cortical White Matter in Males

- With Autism Spectrum Disorder. *Autism Research*, 8(6), 649–657. <https://doi.org/10.1002/aur.1480>
- D'Mello, C., Le, T., & Swain, M. G. (2009). *Neurobiology of Disease Cerebral Microglia Recruit Monocytes into the Brain in Response to Tumor Necrosis Factor Signaling during Peripheral Organ Inflammation*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3567-08.2009>
- D'Souza, H., & Karmiloff-Smith, A. (2017). Neurodevelopmental disorders. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 8(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1002/wcs.1398>
- Dawson, G., & Toth, K. (2015). Autism Spectrum Disorders. In *Developmental Psychopathology* (pp. 317–357). <https://doi.org/10.1002/9780470939406.ch8>
- Del Bigio, M. R. (1995). The ependyma: A protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/glia.440140102>
- Del Bigio, M. R. (2010). Ependymal cells: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 55–73. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0624-y>
- DeLong, G. R. (1992). Autism, amnesia, hippocampus, and learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16(1), 63–70. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80052-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80052-1)
- Diedenhofen, B., & Musch, J. (2015). Cocor: A comprehensive solution for the statistical comparison of correlations. *PLoS ONE*, 10(4), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121945>
- DiStasio, M. M., Nagakura, I., Nadler, M. J., & Anderson, M. P. (2019). T lymphocytes and cytotoxic astrocyte blebs correlate across autism brains. *Annals of Neurology*, 86(6), 885–898. <https://doi.org/10.1002/ana.25610>
- Domesick, V. B. (1972). Thalamic Relationships of the Medial Cortex in the Rat (Part 1 of 2). *Brain, Behavior and Evolution*, 6(1–6), 457–470. <https://doi.org/10.1159/000123727>
- Dugandžija-Novaković, S., Koszowski, A. G., Levinson, S. R., & Shrager, P. (1995). Clustering of Na⁺ Channels and Node of Ranvier Formation in Remyelinating Axons. *Journal of Neuroscience*, 15(11), 492–503. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-01-00492.1995>

- Dunlap, J. J. (2019). The Journal for Nurse Practitioners Autism Spectrum Disorder Screening and Early Action. *TJNP: The Journal for Nurse Practitioners*, 15(7), 496–501. <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2019.04.001>
- Duvernoy, H., Cattin, F., & Risold, P. (2013). The Human Hippocampus. In *Springer-Verlag*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Dwyer, J. B., & Ross, D. A. (2016). Modern Microglia: Novel Targets in Psychiatric Neuroscience. *Biological Psychiatry*, 80(7), e47–e49. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.006>
- Edmonson, C., Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2014). Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Molecular Autism*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-3>
- Ellegood, J., Anagnostou, E., Babineau, B. A., Crawley, J. N., Lin, L., Genestine, M., ... Lerch, J. P. (2015). Clustering autism: Using neuroanatomical differences in 26 mouse models to gain insight into the heterogeneity. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 118–125. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.98>
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y. J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., ... Fombonne, E. (2012). Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Research*, 5(3), 160–179. <https://doi.org/10.1002/aur.239>
- Eng, L. F., & Ghimikar, R. S. (1994). GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathology*, 4(3), 229–237. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1994.tb00838.x>
- Ergaz, Z., Weinstein-Fudim, L., & Ornoy, A. (2016). Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*, 64, 116–140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.024>
- Etherton, M.R., Földy, C., Sharma, M., Tabuchi, K., Liu, X., Shamloo, M., ... Südhof, T. C. (2011a). Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13764–13769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111093108>
- Etherton, M. R., Tabuchi, K., Sharma, M., Ko, J., & Südhof, T. C. (2011b). An autism-associated point mutation in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA

- receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus. *EMBO Journal*, 30(14), 2908–2919. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.182>
- Ey, E., Leblond, C. S., & Bourgeron, T. (2011). Behavioral profiles of mouse models for autism spectrum disorders. *Autism Research*, 4(1), 5–16. <https://doi.org/10.1002/aur.175>
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(August), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00235>
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric Research*, 65(6), 591–598. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e7203>
- Fombonne, E., Marcin, C., Cecilia, A., Ruth, M., Diaz, C., Villalobos, M., ... Diaz, C. (2016). Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato , Mexico : The Leon survey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(5), 1669–1685. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2696-6>
- Foo, L. C., Allen, N. J., Bushong, E. A., Ventura, P. B., Chung, W. S., Zhou, L., ... Barres, B. A. (2011). Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron*, 71(5), 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.022>
- Garcia, O., Torres, M., Helguera, P., Coskun, P., & Busciglio, J. (2010). A Role for *Thrombospondin-1* Deficits in Astrocyte-Mediated Spine and Synaptic Pathology in Down ' s Syndrome. 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014200>
- Garden, G. A., & Möller, T. (2006). Microglia biology in health and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(2), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9015-5>
- Gehrmann, J., Banati, R. B., & Kreutzberg, G. W. (1993). Microglia in the immune surveillance of the brain: Human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *Journal of Neuroimmunology*, 48(2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/0165->

- Geschwind, D. H. (2011, September). Genetics of autism spectrum disorders. *Trends in Cognitive Sciences*, Vol. 15, pp. 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.07.003>
- Geuze, E., Vermetten, E., & Bremner, J. D. (2005, February). MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, Vol. 10, pp. 160–184. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001579>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., ... Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Giulian, D. (1987). Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, 18(1), 155–171. <https://doi.org/10.1002/jnr.490180123>
- Gleason, D., Fallon, J. H., Guerra, M., Liu, J. C., & Bryant, P. J. (2008). Ependymal stem cells divide asymmetrically and transfer progeny into the subventricular zone when activated by injury. *Neuroscience*, 156(1), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.065>
- Gonzalez-Perez, O., & Alvarez-Buylla, A. (2011). Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Research Reviews*, 67(1–2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.01.001>
- Groen, W., Teluij, M., Buitelaar, J., & Tendolkar, I. (2010). Amygdala and Hippocampus Enlargement During Adolescence in Autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 49(6), 552–560. <https://doi.org/10.1097/00004583-201006000-00004>
- Guerini, F. R., Bolognesi, E., Chiappedi, M., Ghezzi, A., Canevini, M. P., Mensi, M. M., ... Clerici, M. (2015). An HLA-G*14bp insertion/deletion polymorphism associates with the development of autistic spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 44, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.002>
- Guerini, F. R., Bolognesi, E., Chiappedi, M., Ripamonti, E., Ghezzi, A., Zanette, M., ... Clerici, M. (2018). HLA-G coding region polymorphism is skewed in autistic spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 67, 308–313.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.09.007>

- Guilmatre, A., Mosca, A.-L., Legallic, S., Frébourg, T., Saugier Veber, P., Campion, D., ... Di Rosa, G. (2009). Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Archives of General Psychiatry*, 66(9), 947–956. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.80>
- Gupta, S., Ellis, S. E., Ashar, F. N., Moes, A., Bader, J. S., Zhan, J., ... Arking, D. E. (2014). Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nature Communications*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6748>
- Haber, M., Zhou, L., & Murai, K. K. (2006). *Cooperative Astrocyte and Dendritic Spine Dynamics at Hippocampal Excitatory Synapses*. 26(35), 8881–8891. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1302-06.2006>
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Hansel, C. (2019). Deregulation of synaptic plasticity in autism. *Neuroscience Letters*, 688, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.003>
- Hartline, D. K., & Colman, D. R. (2007, January 9). Rapid Conduction and the Evolution of Giant Axons and Myelinated Fibers. *Current Biology*, Vol. 17. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.042>
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S. I., Harada, S. I., Yamashita, J., & Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*, 19(1), 13–26. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199701\)19:1<13::AID-GLIA2>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199701)19:1<13::AID-GLIA2>3.0.CO;2-B)
- Hendrickx, D. A. E., van Eden, C. G., Schuurman, K. G., Hamann, J., & Huitinga, I. (2017). Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *Journal of Neuroimmunology*, 309(April), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.04.007>

- Hertz, L., & Chen, Y. (2016). Neuroscience and Biobehavioral Reviews Importance of astrocytes for potassium ion (K +) homeostasis in brain and glial effects of K + and its transporters on learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 71, 484–505. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.018>
- Hillen, A. E. J., Burbach, J. P. H., & Hol, E. M. (2018). Cell adhesion and matricellular support by astrocytes of the tripartite synapse. *Progress in Neurobiology*, 165–167(July 2017), 66–86. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.02.002>
- Homberg, J. R., Kyzar, E. J., Nguyen, M., Norton, W. H., Pittman, J., Poudel, M. K., ... Kalueff, A. V. (2016). Understanding autism and other neurodevelopmental disorders through experimental translational neurobehavioral models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 65, 292–312. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.013>
- Hrabovska, S. V., & Salyha, Y. T. (2016). Animal Models of Autism Spectrum Disorders and Behavioral Techniques of their Examination. *REVIEWS Neurophysiology*, 48(5). <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9613-2>
- Hutsler, J. J., & Zhang, H. (2015). *Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders* *Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders*. (November 2009). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.120>
- Iadecola, C., & Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1369–1376. <https://doi.org/10.1038/nn2003>
- Insausti, R., & Amaral, D. G. (2012). Hippocampal Formation. In *The Human Nervous System* (pp. 896–942). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374236-0.10024-0>
- Isaksen, J., Diseth, T. H., Schjølberg, S., & Skjeldal, O. H. (2013). Autism Spectrum Disorders - Are they really epidemic? *European Journal of Paediatric Neurology*, 17(4), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.03.003>
- Ismail, F. Y., & Shapiro, B. K. (2019). What are neurodevelopmental disorders? *Current Opinion in Neurology*, 32(4), 611–616. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000710>
- Jacobs, S., Nathwani, M., & Doering, L. C. (2010). Fragile X astrocytes induce developmental delays in dendrite maturation and synaptic protein expression. *BMC*

Neuroscience, 11, 132–143.

Jacobson, S., Marcus, E. M., & Pugsley, S. (2018). The Limbic System, Temporal Lobe, and Prefrontal Cortex. In *Neuroanatomy for the Neuroscientist* (pp. 477–529). https://doi.org/10.1007/978-3-319-60187-8_16

Jacquet, B. V., Salinas-Mondragon, R., Liang, H., Therit, B., Buie, J. D., Dykstra, M., ... Ghashghaei, H. T. (2009). FoxJ1-dependent gene expression is required for differentiation of radial glia into ependymal cells and a subset of astrocytes in the postnatal brain. *Development*, 136(23), 4021–4031. <https://doi.org/10.1242/dev.041129>

Jeye, B. M., MacEvoy, S. P., Karanian, J. M., & Slotnick, S. D. (2018). Distinct regions of the hippocampus are associated with memory for different spatial locations. *Brain Research*, 1687, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.029>

Karperien, A., Ahammer, H., & Jelinek, H. F. (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(JANUARY 2013), 1–34. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00003>

Kaur, G., Han, S. J., Yang, I., & Crane, C. (2010). Microglia and Central Nervous System Immunity. *Neurosurgery Clinics of North America*, 21(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2009.08.009>

Kawamura, Y., Takahashi, O., & Ishii, T. (2008). Reevaluating the incidence of pervasive developmental disorders: Impact of elevated rates of detection through implementation of an integrated system of screening in Toyota, Japan. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 62(2), 152–159. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2008.01748.x>

Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends in Neurosciences*, 31(12), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.003>

Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience*, 18(7), 942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>

Khalil, R., Kenny, C., Hill, R. S., Mochida, G. H., Nasir, R., Partlow, J. N., ... Chahrour, M. H. (2018). PSMD12 haploinsufficiency in a neurodevelopmental disorder with autistic features. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 177(8), 736–745. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32688>

- Kishimoto, N., & Sawamoto, K. (2012). Planar polarity of ependymal cilia. *Differentiation*, 83(2), S86–S90. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.10.007>
- Klauck, S. M., & Poustka, A. (2006). Animal models of autism. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3(4), 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2006.11.005>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Knowles, W. D. (1992). Normal Anatomy and Neurophysiology of the Hippocampal Formation. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 9(2), 253–263. <https://doi.org/10.1097/00004691-199204010-00006>
- Koeppen, J., Nguyen, A. Q., Nikolakopoulou, A. M., Garcia, M., Hanna, S., Woodruff, S., ... Ethell, I. M. (2018). Functional consequences of synapse remodeling following astrocyte-specific regulation of ephrin-B1 in the adult hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 38(25), 5710–5726. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3618-17.2018>
- Kofler, J., & Wiley, C. A. (2011). Microglia: Key Innate Immune Cells of the Brain. *Toxicologic Pathology*, 39(1), 103–114. <https://doi.org/10.1177/0192623310387619>
- Kofuji, P., & Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4), 1043–1054. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.008>
- Kotagiri, P., Chance, S. A., Szele, F. G., & Esiri, M. M. (2014). Subventricular zone cytoarchitecture changes in Autism. *Developmental Neurobiology*, 74(1), 25–41. <https://doi.org/10.1002/dneu.22127>
- Krencik, R., van Asperen, J. V., & Ullian, E. M. (2017). Human astrocytes are distinct contributors to the complexity of synaptic function. *Brain Research Bulletin*, 129, 66–73. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2016.08.012>
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Kucukdereli, H., Allen, N. J., Lee, A. T., Feng, A., Ozlu, M. I., Conatser, L. M., ... Eroglu, C. (2011). Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins hevin and SPARC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32). <https://doi.org/10.1073/pnas.1104977108>

- Kumar, S., Reynolds, K., Ji, Y., Gu, R., Rai, S., & Zhou, C. J. (2019). Impaired neurodevelopmental pathways in autism spectrum disorder: A review of signaling mechanisms and crosstalk. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s11689-019-9268-y>
- Kurpius, D., Nolley, E. P., & Dailey, M. E. (2007). Purines induce directed migration and rapid homing of microglia to injured pyramidal neurons in developing hippocampus. *GLIA*, *55*(8), 873–884. <https://doi.org/10.1002/glia.20509>
- Laboratory, T. J. (2009). *The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice* (Sixth Edit; J. M. Currer, Ed.). The Jackson Laboratory.
- Ladeby, R., Wirenfeldt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I., & Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Research Reviews*, *48*(2), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.009>
- Lai, M.-C. C., Lombardo, M. V., Baron-Cohen, S., Barthélémy, C., Bonnet-Brilhault, F., Lai, M.-C. C., ... Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *The Lancet*, *383*(9920), 896–910. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61539-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61539-1)
- Laurence, J. A., & Fatemi, S. H. (2005). Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum*, *4*(3), 206–210. <https://doi.org/10.1080/14734220500208846>
- Lauritsen, M. B. (2013). Autism spectrum disorders. *European Child & Adolescent Psychiatry*, *22*(S1), 37–42. <https://doi.org/10.1007/s00787-012-0359-5>
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-W](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-W)
- Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Grandin, T., ... Patterson-Kane, E. (2013). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. American Veterinary Medical Association.
- Lee, A. S., Azmitia, E. C., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2017). Developmental microglial priming in postmortem autism spectrum disorder temporal cortex. *Brain, Behavior, and Immunity*, *62*, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.019>

- Leitner, Y. (2014). The Co-Occurrence of Autism and Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children – What Do We Know? . *Frontiers in Human Neuroscience* , Vol. 8, p. 268. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2014.00268>
- Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X. M., ... 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>
- Li, Y., Zhang, X., & Li, Y. (2019). Antineuroinflammatory therapy: potential treatment for autism spectrum disorder by inhibiting glial activation and restoring synaptic function. *CNS Spectrums*, 25(4), 493–501. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S1092852919001603>
- Lippoldt, A., Jansson, A., Kniesel, U., Andbjør, B., Andersson, A., Wolburg, H., ... Haller, H. (2000). Phorbol ester induced changes in tight and adherens junctions in the choroid plexus epithelium and in the ependyma. *Brain Research*, 854(1–2), 197–206. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02355-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02355-0)
- Livanis, A., Almodovar, D., & Skolnik, E. (2017). Autism Spectrum and Social Pragmatic Language Disorders. In S. Goldstein & M. DeVries (Eds.), *Handbook of DSM-5 Disorders in Children and Adolescents* (pp. 377–400). https://doi.org/10.1007/978-3-319-57196-6_19
- López-Madróna, V. J., Matias, F. S., Pereda, E., Canals, S., & Mirasso, C. R. (2017). On the role of the entorhinal cortex in the effective connectivity of the hippocampal formation. *Chaos*, 27(4). <https://doi.org/10.1063/1.4979001>
- Lord, C., Cook, E. H., Leventhal, B. L., & Amaral, D. G. (2000). Review Autism Spectrum Disorders coordinating vocalizations with their intentions, and com. In *Neuron* (Vol. 28).
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392, 508–520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
- Lotter, V. (1967). Epidemiology of autistic conditions in young children - II. Some characteristics of the parents and children. *Social Psychiatry*, 1(4), 163–173. <https://doi.org/10.1007/BF00578950>
- Loucas, T., Charman, T., Pickles, A., Simonoff, E., Chandler, S., Meldrum, D., & Baird, G. (2008). Autistic symptomatology and language ability in autism spectrum disorder and

- specific language impairment. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, 49(11), 1184–1192. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2008.01951.x>
- Maezawa, I., Swanberg, S., Harvey, D., LaSalle, J. M., & Jin, L. W. (2009). Rett syndrome astrocytes are abnormal and spread MeCP2 deficiency through gap junctions. *Journal of Neuroscience*, 29(16), 5051–5061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0324-09.2009>
- Makinodan, M., Tatsumi, K., Manabe, T., Yamauchi, T., Makinodan, E., Matsuyoshi, H., ... Wanaka, A. (2008). Maternal immune activation in mice delays myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring. *Journal of Neuroscience Research*, 86(10), 2190–2200. <https://doi.org/10.1002/jnr.21673>
- Marlatt, M. W., Bauer, J., Aronica, E., Van Haastert, E. S., Hoozemans, J. J. M., Joels, M., & Lucassen, P. J. (2014). Proliferation in the alzheimer hippocampus is due to microglia, not astroglia, and occurs at sites of amyloid deposition. *Neural Plasticity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/693851>
- Masi, A., Quintana, D. S., Glozier, N., Lloyd, A. R., Hickie, I. B., & Guastella, A. J. (2015). Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 20(4), 440–446. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.59>
- Mathis, C., Denisenko-nehrbass, N., Girault, J., & Borrelli, E. (2001). *Essential role of oligodendrocytes in the formation and maintenance of central nervous system nodal regions*. 4890, 4881–4890.
- Matson, J. L., & Shoemaker, M. (2009). Intellectual disability and its relationship to autism spectrum disorders. *Research in Developmental Disabilities*, 30(6), 1107–1114. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2009.06.003>
- Mauch, D. H., Na, K., & Schumacher, S. (2001). *CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol*. 294(November), 1354–1358.
- Meltzer, A., & Van De Water, J. (2017). The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 284–298. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.158>
- Menendez Iglesias, B., Cerase, J., Ceracchini, C., Levi, G., & Aloisi, F. (1997). Analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands in cultured mouse microglia: upregulation by

interferon-g and lipopolysaccharide and downregulation by interleukin-10, prostaglandin E and cyclic 2 AMP-elevating agents. In *Journal of Neuroimmunology* (Vol. 72).

Merrill, J. E., Ignarro, L. J., Sherman, M. P., Melinek, J., & Lane, T. E. (1993). Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *151*(4), 2132–2141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8102159>

Modabbernia, A., Velthorst, E., & Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular Autism*, *8*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>

Morgan, J. T., Barger, N., Amaral, D. G., & Schumann, C. M. (2014). Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder. *PLoS ONE*, *9*(10), 29–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110356>

Morgan, J. T., Chana, G., Abramson, I., Semendeferi, K., Courchesne, E., & Everall, I. P. (2012). Abnormal microglial-neuronal spatial organization in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Brain Research*, *1456*, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.036>

Morgan, J. T., Chana, G., Pardo, C. A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., ... Everall, I. P. (2010). Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biological Psychiatry*, *68*(4), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.024>

Morrens, J., van den Broeck, W., & Kempermann, G. (2012). Glial cells in adult neurogenesis. *Glia*, *60*(2), 159–174. <https://doi.org/10.1002/glia.21247>

Moy, S. S., Nadler, J. J., Magnuson, T. R., & Crawley, J. N. (2006). Mouse Models of Autism Spectrum Disorders: The Challenge for Behavioral Genetics. *American Journal of Medical Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)*, *142*, 40–51. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30081>

Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Nonneman, R. J., Segall, S. K., Andrade, G. M., ... Magnuson, T. R. (2008). Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research*, *191*(1), 118–129.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.015>

- Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Perez, A., Holloway, L. P., Barbaro, R. P., ... Crawley, J. N. (2007). Mouse behavioral tasks relevant to autism: Phenotypes of 10 inbred strains. *Behavioural Brain Research*, *176*(1), 4–20.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.07.030>
- Moy, S. S., Riddick, N. V., Nikolova, V. D., Teng, B. L., Agster, K. L., Nonneman, R. J., ... Bodfish, J. W. (2014). Repetitive behavior profile and supersensitivity to amphetamine in the C58/J mouse model of autism. *Behavioural Brain Research*, *259*, 200–214.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.052>
- Muñoz Valencia, A., Velásquez Quiroga, J., Saddam López Arias, J., Chavarro Tibacan, J., Dueñas, Z., Muñoz, V. A. ;, ... Dueñas, Z. (2019). Cellular count changes in different rat brain areas due to early maternal separation. *Arch Med (Manizales)*, *19*(1), 12–22.
<https://doi.org/doi.org/10.30554/archmed.19.1.2983.2019>
- Murai, K. K., Nguyen, L. N., Irie, F., Yamaguchi, Y., & Pasquale, E. B. (2002). *Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling*.
<https://doi.org/10.1038/nn994>
- National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. (2011). *Autism: recognition, referral and diagnosis of children and young people on the autism spectrum. NICE Clinical Guideline*. Reino Unido: RCOG Press.
- Nave, K. A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, *468*(7321), 244–252. <https://doi.org/10.1038/nature09614>
- Nedergaard, M., Ransom, B., & Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*, *26*(10), 523–530.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.008>
- Nicolini, C., & Fahnstock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology*, *299*, 217–227.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, *308*(5726), 1314–1318.
<https://doi.org/10.1126/science.1110647>

- Nishida, H., & Okabe, S. (2007). *Direct Astrocytic Contacts Regulate Local Maturation of Dendritic Spines*. *27*(2), 331–340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4466-06.2007>
- Ogata, K., & Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, *113*(1), 221–233. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00041-6)
- Onaolapo, A. Y., & Onaolapo, O. J. (2017). *Global Data on Autism Spectrum Disorders Prevalence: A Review of Facts, Fallacies and Limitations*. *5*(2), 14–23. <https://doi.org/10.13189/ujcm.2017.050202>
- Ordy, J. M., Wengenack, T. M., Bialobok, P., Coleman, P. D., Rodier, P., Baggs, R. B., ... Kates, B. (1993). Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. *Experimental Neurology*, Vol. 119, pp. 128–139. <https://doi.org/10.1006/exnr.1993.1014>
- Ortiz-Álvarez, G., Daclin, M., Shihavuddin, A., Lansade, P., Fortoul, A., Faucourt, M., ... Spassky, N. (2019). Adult Neural Stem Cells and Multiciliated Ependymal Cells Share a Common Lineage Regulated by the Geminin Family Members. *Neuron*, *102*(1), 159-172.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.051>
- Ota, Y., Zanetti, A. T., & Hallock, R. M. (2013). The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plasticity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/185463>
- Ouyang, Y. B., Voloboueva, L. A., Xu, L. J., & Giffard, R. G. (2007). Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *Journal of Neuroscience*, *27*(16), 4253–4260. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0211-07.2007>
- Pachter, J. S., De Vries, H. E., & Fabry, Z. (2003, June 1). The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Vol. 62, pp. 593–604. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.6.593>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., ... Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, *333*(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>

- Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V., Oliet, S. H. R., Schousboe, A., Haydon, P. G., ... Verkhatsky, A. (2012, April). Glial cells in (patho)physiology. *Journal of Neurochemistry*, Vol. 121, pp. 4–27. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x>
- Parpura, V., & Verkhatsky, A. (2012). Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: Evolution of the concept. *ASN Neuro*, 4(4), 201–205. <https://doi.org/10.1042/AN20120019>
- Patterson, P. H. (2011). Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7), 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.001>
- Pearson, B. L., Corley, M. J., Vasconcellos, A., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2013). Heparan sulfate deficiency in autistic postmortem brain tissue from the subventricular zone of the lateral ventricles. *Behavioural Brain Research*, 243(1), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.062>
- Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K., & Pakkenberg, B. (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of Aging*, 29(11), 1754–1762. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013>
- Petrelli, F., Pucci, L., & Bezzi, P. (2016). Astrocytes and microglia and their potential link with autism spectrum disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00021>
- Pfriege, F. W., & Barres, B. A. (1997). Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science*, 277(5332), 1684–1687. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1684>
- Phetrasuwan, S., Miles, M. S., Mesibov, G. B., & Robinson, C. Defining Autism Spectrum Disorders. , 14 *Journal for Specialists in Pediatric Nursing* § (2009).
- Phillips, L. M., & Lampson, L. A. (2000). Local neurochemicals and site-specific immune regulation in the CNS. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Vol. 59, pp. 177–187. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.3.177>
- Poliak, S., & Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of ranvier. *Nature Reviews Neuroscience*, Vol. 4, pp. 968–980. <https://doi.org/10.1038/nrn1253>
- Posar, A., & Visconti, P. (2017). Autismo em 2016: necessidade de respostas. *Jornal de Pediatria*, 93(2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.09.002>

- Rasband, M. N., & Macklin, W. B. (2012). Myelin Structure and Biochemistry. *Basic Neurochemistry*, 180–199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00010-9>
- Raymond, G. V., Bauman, M. L., & Kemper, T. L. (1995). Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathologica*, 91(1), 117–119. <https://doi.org/10.1007/s004010050401>
- Richardson, W. D., Young, K. M., Tripathi, R. B., & McKenzie, I. (2011, May 26). NG2-glia as Multipotent Neural Stem Cells: Fact or Fantasy? *Neuron*, Vol. 70, pp. 661–673. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.013>
- Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., Nelson, S., & Romano, J. (1996). Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 370(2), 247–261. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960624\)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2)
- Rodriguez, J. I., & Kern, J. K. (2011). Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *Neuron Glia Biology*, 7(2–4), 205–213. <https://doi.org/10.1017/S1740925X12000142>
- Ronald, A., & Hoekstra, R. A. (2011). Autism spectrum disorders and autistic traits: A decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, Vol. 156, pp. 255–274. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31159>
- Ryan, B. C., Young, N. B., Crawley, J. N., Bodfish, J. W., & Moy, S. S. (2010). Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain. *Behavioural Brain Research*, 208(1), 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.031>
- Sahin, M., & Sur, M. (2015). Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders. *Science*, 350(6263). <https://doi.org/10.1126/science.aab3897>
- Saitoh, O., Karns, C., & Courchesne, E. (2001). Development of the hippocampal formation from 2 to 42 years. *Brain*, 124(7), 1317. Retrieved from papers://3ef1dd7b-eb58-45d1-97b3-39da2cdb02b4/Paper/p1380
- Saresella, M., Piancone, F., Marventano, I., Zoppis, M., Hernis, A., Zanette, M., ... Clerici, M. (2016). Multiple inflammasome complexes are activated in autistic spectrum

- disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 125–133.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.009>
- Satoh, J. ichi, Lee, Y. B., & Kim, S. U. (1995). T-cell costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) are expressed in human microglia but not in astrocytes in culture. *Brain Research*, 704(1), 92–96. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01177-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01177-3)
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., ... Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691–705.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schiefer, J., Kampe, K., Dodt, H. U., Zieglgänsberger, W., & Kreutzberg, G. W. (1999). Microglial motility in the rat facial nucleus following peripheral axotomy. *Journal of Neurocytology*, 28(6), 439–453. <https://doi.org/10.1023/A:1007048903862>
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 6–17).
<https://doi.org/10.1159/000360925>
- Schulz, C., Perdiguero, E. G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., ... Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 335(6077), 86–90.
<https://doi.org/10.1126/science.1219179>
- Schumann, C. M., Hamstra, J., Goodlin-Jones, B. L., Lotspeich, L. J., Kwon, H., Buonocore, M. H., ... Amaral, D. G. (2004). The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *Journal of Neuroscience*, 24(28), 6392–6401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1297-04.2004>
- Sedgwick, J. D., Schwender, S., Imrich, H., Dorries, R., Butcher, G. W., & Ter Meulen, V. (1991). Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7438–7442.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7438>
- Seifert, G., Henneberger, C., & Steinhäuser, C. (2018). Diversity of astrocyte potassium channels: An update. *Brain Research Bulletin*, 136, 26–36.

<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.002>

Seifert, G., & Steinhäuser, C. (2018). Heterogeneity and function of hippocampal macroglia. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 653–670. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2746-1>

Shalom, D. Ben. (2003). Memory in autism: Review and synthesis. *Cortex*, 39(4–5), 1129–1138. [https://doi.org/10.1016/S0010-9452\(08\)70881-5](https://doi.org/10.1016/S0010-9452(08)70881-5)

Sharma, S. R., Gonda, X., & Tarazi, F. I. (2018). Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 190, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.007>

Shrager, P. (1988). Ionic channels and signal conduction in single remyelinating frog nerve fibres. *The Journal of Physiology*, 404(1), 695–712. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017314>

Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., ... Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>

Simonoff, E., Pickles, A., Charman, T., Chandler, S., Loucas, T., & Baird, G. (2008). Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: Prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 47(8), 921–929. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e318179964f>

Simons, M., & Trajkovic, K. (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of Cell Science*, 119(21), 4381–4389. <https://doi.org/10.1242/jcs.03242>

Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>

Sofroniew, M. V. (2014). Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a020420–a020420. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>

Somjen, G. G. (1988). Nervenkitz: Notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia*,

1(1), 2–9. <https://doi.org/10.1002/glia.440010103>

- Sparks, B. F., Friedman, S. D., Shaw, D. W., Aylward, E. H., Echelard, D., Artru, A. A., ... Dager, S. R. (2002). Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. *Neurology*, *59*(2), 184–192. <https://doi.org/10.1212/WNL.59.2.184>
- Spassky, N., Merkle, F. T., Flames, N., Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *Journal of Neuroscience*, *25*(1), 10–18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-04.2005>
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, J. (1991). The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113720>
- Stein, I. S., & Zito, K. (2019). Dendritic Spine Elimination: Molecular Mechanisms and Implications. *Neuroscientist*, *25*(1), 27–47. <https://doi.org/10.1177/1073858418769644>
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., ... Barres, B. A. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell*, *131*(6), 1164–1178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(10), 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Stratton, J. A., Shah, P., Sinha, S., Crowther, E., & Biernaskie, J. (2019). A tale of two cousins: Ependymal cells, quiescent neural stem cells and potential mechanisms driving their functional divergence. *FEBS Journal*, *286*(16), 3110–3116. <https://doi.org/10.1111/febs.14930>
- Streit, W. J., Condeelis, J. R., Fendrick, S. E., Flanary, B. E., & Mariani, C. L. (2005). Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurological Research*, *27*(7), 685–691. <https://doi.org/10.1179/016164105X49463>
- Strock, M. (2007). Autism Spectrum Disorders (Pervasive Developmental Disorders). In *National Institute of Mental Health (NIMH)*. National Institute of Mental Health (NIMH). 6001 Executive Boulevard room 8184, MSC 9663, Bethesda, MD 20892-9663. Tel: 866-615-6454; Tel: 301-443-4513; Fax: 301-443-4279; e-mail: nimhinfo@nih.gov; Web

site: <http://www.nimh.nih.gov/>.

Susuki, K., & Rasband, M. N. (2008, December). Molecular mechanisms of node of Ranvier formation. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 20, pp. 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.09.007>

Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., ... Mori, N. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *Archives of General Psychiatry*, 70(1), 49–58. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.272>

Suzumura, A., Marunouchi, T., & Yamamoto, H. (1991). Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Research*, 545(1–2), 301–306. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91302-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91302-H)

Szuchet, S., Domowicz, M. S., & Hudson, L. D. (2010). Oligodendrocytes. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000289.pub2>

Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., ... Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron*, 83(5), 1131–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>

Taylor, S. E., Morganti-Kossmann, C., Lifshitz, J., & Ziebell, J. M. (2014). Rod microglia: A morphological definition. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097096>

Tetreault, N. A., Hakeem, A. Y., Jiang, S., Williams, B. A., Allman, E., Wold, B. J., & Allman, J. M. (2012). Microglia in the cerebral cortex in autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42(12), 2569–2584. <https://doi.org/10.1007/s10803-012-1513-0>

Thapar, A., Cooper, M., & Rutter, M. (2017). Neurodevelopmental disorders. *The Lancet Psychiatry*, 4(4), 339–346. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)30376-5](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)30376-5)

Tobe, R., Kim, Y. S., Owley, T. B., & Leventhal, B. L. (2012). The Autistic Spectrum Disorders. In *Clinical Child Psychiatry* (pp. 353–376). <https://doi.org/10.1002/9781119962229.ch21>

Toro, R., Konyukh, M., Delorme, R., Leblond, C., Chaste, P., Fauchereau, F., ... Bourgeron,

- T. (2010). Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends in Genetics: TIG*, 26(8), 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.05.007>
- Tsilioni, I., Patel, A. B., Pantazopoulos, H., Berretta, S., Conti, P., Leeman, S. E., & Theoharides, T. C. (2019). IL-37 is increased in brains of children with autism spectrum disorder and inhibits human microglia stimulated by neurotensin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(43), 21659–21665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906817116>
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., & Barres, B. A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science*, 291(5504), 657–661. <https://doi.org/10.1126/science.291.5504.657>
- Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, 57(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>
- Velmeshev, D., Schirmer, L., Jung, D., Haeussler, M., Perez, Y., Mayer, S., ... Kriegstein, A. R. (2019). Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science*, 364(6441), 685–689. <https://doi.org/10.1126/science.aav8130>
- Verkhatsky, A., & Butt, A. (2013). Glial Physiology and Pathophysiology. In *Glial Physiology and Pathophysiology*. <https://doi.org/10.1002/9781118402061>
- Verkhatsky, A., Rodríguez, J. J., & Parpura, V. (2013). Astroglia in neurological diseases. *Future Neurology*, 8(2), 149–158. <https://doi.org/10.2217/fnl.12.90>
- Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J. K., Tian, Y., Horvath, S., ... Geschwind, D. H. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, 474(7351), 380–386. <https://doi.org/10.1038/nature10110>
- Volkmar, F. R., Reichow, B., Westphal, A., & Mandell, D. S. (2014). Autism and the Autism Spectrum: Diagnostic concepts. *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders - Fourth Edition*, 1, 3–27.
- Vorstman, J. A. S., Parr, J. R., Moreno-De-Luca, D., Anney, R. J. L., Nurnberger, J. I., & Hallmayer, J. F. (2017). Autism genetics: Opportunities and challenges for clinical translation. *Nature Reviews Genetics*, 18(6), 362–376.

<https://doi.org/10.1038/nrg.2017.4>

- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., & Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *Journal of Neuroscience*, *29*(13), 3974–3980. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009>
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Miyamoto, A., & Nabekura, J. (2013). Microglia: Actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends in Neurosciences*, *36*(4), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.007>
- Wallraff, A., Köhling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K., & Steinhäuser, C. (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *26*(20), 5438–5447. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0037-06.2006>
- Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochemistry International*, *36*(4–5), 291–300. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00137-0)
- Wang, F., Yuan, T., Pereira, A., Verkhratsky, A., Huang, J. H., & Huang, J. H. (2016). Glial Cells and Synaptic Plasticity. *Neural Plasticity*, *2016*, 5042902. <https://doi.org/10.1155/2016/5042902>
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., ... Wisniewski, T. (2010). The neuropathology of autism: Defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathologica*, *119*(6), 755–770. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0655-4>
- Wei, H., Zou, H., Sheikh, A. M., Malik, M., Dobkin, C., Brown, W. T., & Li, X. (2011). IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *Journal of Neuroinflammation*, *8*. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-52>
- Weinhard, L., Neniskyte, U., Vadasiute, A., di Bartolomei, G., Aygün, N., Riviere, L., ... Gross, C. (2018). Sexual dimorphism of microglia and synapses during mouse postnatal development. *Developmental Neurobiology*, *78*(6), 618–626. <https://doi.org/10.1002/dneu.22568>

- Werling, D. M., & Geschwind, D. H. (2013, April). Sex differences in autism spectrum disorders. *Current Opinion in Neurology*, Vol. 26, pp. 146–153. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835ee548>
- Werling, D. M., Parikshak, N. N., & Geschwind, D. H. (2016). Gene expression in human brain implicates sexually dimorphic pathways in autism spectrum disorders. *Nature Communications*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms10717>
- Wing, L. (1996). Autistic spectrum disorders. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 312(7027), 327–328. <https://doi.org/10.1136/bmj.312.7027.327>
- Wing, L., & Potter, D. (2002). The epidemiology of autistic spectrum disorders: Is the prevalence rising? *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(3), 151–161. <https://doi.org/10.1002/mrdd.10029>
- Witcher, M. R., Kirov, S. A., & Harris, K. M. (2007). Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *GLIA*, 55(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/glia.20415>
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauß, B., Schmid, E. M., Öcalan, M., ... Risau, W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells: Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *Journal of Cell Science*, 107(5), 1347–1357.
- World Health Organization. (2004). *ICD-10: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems: tenth revision*. (2nd ed, p. Spanish version, 1st edition published by PAHO as). 2nd ed, p. Spanish version, 1st edition published by PAHO as. World Health Organization.
- World Health Organization. (2013). Autism spectrum disorders & other developmental disorders: From raising awareness to building capacity. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*, 1(September), 1–36.
- Yamada, J., & Jinno, S. (2014). Age-related differences in oligodendrogenesis across the dorsal-ventral axis of the mouse hippocampus. *Hippocampus*, 24(8), 1017–1029. <https://doi.org/10.1002/hipo.22287>
- Yates, K., & Couteur, A. Le. (2016). Diagnosing autism / autism spectrum disorders. *Paediatrics and Child Health*, 26(12), 513–518.

<https://doi.org/10.1016/j.paed.2016.08.004>

- Young, K., & Morrison, H. (2018). Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using imagej. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(136), 1–9. <https://doi.org/10.3791/57648>
- Yu, W. P., Collarini, E. J., Pringle, N. P., & Richardson, W. D. (1994). Embryonic expression of myelin genes: Evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron*, 12(6), 1353–1362. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90450-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90450-2)
- Zablotsky, B., Black, L. I., & Blumberg, S. J. (2014). *Estimated Prevalence of Children With Diagnosed Developmental Disabilities in the United States, 2014-2016 Key findings Data from the National Health Interview Survey*. Retrieved from https://www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db291_table.pdf#3.
- Zalc, B., Goujet, D., & Colman, D. (2008). The origin of the myelination program in vertebrates. *Current Biology*, 18(12), 511–512. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.010>
- Zappaterra, M. W., & Lehtinen, M. K. (2012, September 14). The cerebrospinal fluid: Regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 69, pp. 2863–2878. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0957-x>
- Zeidán-Chuliá, F., Salmina, A. B., Malinovskaya, N. A., Noda, M., Verkhatsky, A., & Moreira, J. C. F. (2014). The glial perspective of autism spectrum disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 38, 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.11.008>
- Zeidman, P., & Maguire, E. A. (2016). Anterior hippocampus: The anatomy of perception, imagination and episodic memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.24>
- Zhang, D., Hu, X., Qian, L., O'Callaghan, J. P., & Hong, J. S. (2010). Astroglial pathology in CNS pathologies: Is there a role for microglia? *Molecular Neurobiology*, 41(2–3), 232–241. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8098-4>
- Zhang, H., & Miller, R. H. (1996). Density-dependent feedback inhibition of oligodendrocyte precursor expansion. *Journal of Neuroscience*, 16(21), 6886–6895. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-21-06886.1996>

Apéndice I. Lista de reactivos

| | | |
|--|---------------------------|-------------|
| Acetato de sodio | Préstamo | |
| Ácido acético glacial | J.T. Baker | 9508-02 |
| Albúmina sérica bovina liofilizada | Biowest | M18037P6154 |
| Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | Reasol | ST1207054 |
| Cloroformo | J.T. Baker | 9180-02 |
| Cloruro de potasio (KCl) | Reasol | 22481 |
| Cloruro de sodio, cristal (NaCl) | J.T. Baker | 3624-01 |
| CytoSeal™ 60 | Thermo Scientific | 8310-4 |
| Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) | Sigma-Aldrich | SZBE2860V |
| Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) | Sigma-Aldrich | SLBM6715V |
| FSC 22™ Surgipath® | Leica Microsystems | |
| Glicina | Sigma-Aldrich | G8898-500G |
| Hoechst 33342 | Thermo Scientific | 62249 |
| Metanol (CH_3OH) | J.T. Baker | 9093-03 |
| Paraformaldehído | Sigma-Aldrich | MKCD5278 |
| Sacarosa, cristal ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) | J.T. Baker | 4072-01 |
| Suero de cabra normal | Cell Signaling Technology | 5425S |
| Sulfato dodecil de sodio (SDS) | Sigma-Aldrich | L3771-100G |
| Trizma® base | Sigma-Aldrich | SLBV9322 |
| Trizma® hydrochloride | Sigma-Aldrich | SLBV2649 |
| Triton™ X-100 | Sigma-Aldrich | SLBN2536V |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich | SLBK8990V |
| Vectashield® Antifade Mounting Medium | Vector Laboratories | ZE0625A |
| Violeta de cresilo | Préstamo | |

Apéndice II. Lista de soluciones

Albúmina 2%

Albúmina sérica bovina liofilizada 0.2 g
En 10 ml de TBS-Tween 0.1%

Acetato de sodio 1 M

Acetato de sodio 6.8 g
En un volumen final de 46 ml con agua destilada

Ácido acético 1 M

Ácido acético glacial 14.5 ml
En un volumen final de 250 ml con agua destilada

Buffer de citrato de sodio 10 mM

Citrato de sodio 1.47 g
Tween ® 20 20 µl
En 500 ml de agua destilada
pH = 6.0

Glicina ácida

Glicina 0.75 g
SDS 10% 5 ml
En un volumen final de 100 ml con agua destilada
pH = 2.5

PBS 1x (0.01 M)

Cloruro de sodio 8 g
Cloruro de potasio 0.2 g
Fosfato de sodio dibásico 1.44 g
Fosfato monopotásico 0.24 g
En un volumen final de 1 L con agua destilada
pH = 7.4

PBS-Triton X-100 0.5%

PBS 1x 497.5 ml
Triton X-100 2.5 ml

PBS-Triton X-100 2%

PBS 1x 490 ml
Triton X-100 10 ml

SDS 10%

Sulfato dodecil de sodio 5 g
En un volumen final de 50 ml con agua
destilada

Suero de cabra 5%

Suero de cabra normal 50 µl
TBS 1x 950 µl

TBS 10x

Trizma ® hydrochloride 70.2 g
Trizma ® base 6.7 g
Cloruro de sodio (NaCl) 87.66 g
En un volumen final de 1 L con agua destilada
pH = 7.5

TBS-T 0.1%

TBS 10 x 100 ml
Tween ® 20 1 ml
En un volumen final de 1 L con agua destilada

Violeta de cresilo 0.5%

Violeta de cresilo 0.125 g
Acetato de sodio 1 M 15 ml
Ácido acético 1 M 85 ml
En un volumen final de 250 ml con agua
destilada

Apéndice III. Lista de anticuerpos

Anticuerpos primarios

| | | |
|--|--------------------------|-----------|
| IgG monoclonal de ratón anti-GFAP (2E1) | Santa Cruz Biotechnology | sc-33673 |
| IgG policlonal de conejo anti-Iba1 | FUJIFILM Wako Chemicals | 019-19741 |
| IgG monoclonal de ratón anti-Tubulina α | Santa Cruz Biotechnology | sc-398103 |

Anticuerpos secundarios

| | | |
|--|--------------------------|--------------|
| IgG de cabra Alexa-Fluor® 488 anti-ratón | Life Technologies | A-11034 |
| IgG de cabra Alexa-Fluor® 594 anti-conejo | Life Technologies | R37117 |
| Proteína de unión a IgGk de ratón conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) | Santa Cruz Biotechnology | sc-516102 |
| IgG de cabra conjugado a HRP anti-conejo | Jackson ImmunoResearch | 1111-035-003 |