



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON DHA SOBRE PROTEÍNAS DE UNIÓN
A ACTINA EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE RATONES CON FENOTIPO
AUTISTA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Psic. Ileri Alejandra del Moral Sánchez

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Aliesha Araceli González Arenas
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Gabriel Roldán Roldán
Facultad de Medicina

Dra. Elena Zambrano González
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

ASESORÍA TÉCNICA

Dra. Isabel Cristina Barón Mendoza
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México, mayo, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

*“No hay nada permanente excepto el cambio”
-Heráclito*

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser un continuo espacio de desarrollo y crecimiento profesional, académico y personal.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por abrirme sus espacios desde la licenciatura, que son ya para mí como un segundo hogar.

Al Programa de Maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas por fomentar el pensamiento crítico y compartir el conocimiento.

Al CONACyT por la beca otorgada (CVU 1002690).

A la Dra. Aliesha Araceli González Arenas por brindarme la oportunidad de continuar desarrollando este proyecto en su laboratorio. Por crear un grupo y un ambiente de trabajo sano y seguro, gracias infinitas.

A mi comité tutor, Dra. Elena Zambrano González y Dr. Gabriel Roldán Roldán, por el apoyo y sus valiosas observaciones y aportaciones al proyecto.

A la cDra. Isabel Cristina Barón Mendoza, por la asesoría técnica durante la realización del proyecto.

Índice

I.	Lista de Figuras	ii
II.	Abreviaturas	ii
1.	Resumen	1
2.	Antecedentes.....	2
2.1	Trastorno del Espectro Autista (TEA).....	2
2.1.1	Diagnóstico.....	2
2.1.2	Tratamiento	3
2.1.3	Epidemiología.....	3
2.1.4	Etiología	4
2.2	Citoesqueleto y plasticidad neuronal.....	5
2.2.1	Espinas dendríticas	8
2.2.2	Implicaciones en el TEA	10
2.3	Corteza prefrontal	11
2.3.1	Conectividad.....	12
2.3.2	Implicaciones en el TEA	14
2.4	Ácido Docosahexaenoico	15
2.4.1	DHA como tratamiento para el TEA.....	17
2.5	Modelos de estudio para el TEA	18
2.5.1	Cepa C58/J como modelo de estudio para el TEA.....	18
3.	Justificación.....	20
4.	Hipótesis.....	20
5.	Objetivos.....	20
5.1	Objetivo general.....	20
5.2	Objetivos particulares	20
6.	Metodología.....	21
6.1	Animales.....	21
6.2	Cuantificación de proteínas.....	21
6.2.1	Diseción de la corteza prefrontal y obtención de proteínas	21
6.2.2	Electroforesis y Western Blot.....	22

6.2.3	Densitometría y análisis estadístico	23
6.3	Análisis <i>in silico</i> de factores de transcripción para ABPs	23
6.4	Análisis de la densidad de espinas dendríticas	23
6.4.1	Tinción de Golgi-Cox	23
6.4.2	Corte en criostato	24
6.4.3	Determinación de la densidad de espinas dendríticas	24
7.	Resultados.....	25
7.1	Peso corporal y del cerebro	25
7.2	Expresión de las proteínas del citoesqueleto	26
7.3	Análisis <i>in silico</i> de factores de transcripción	28
7.4	Densidad de las espinas dendríticas.....	29
8.	Discusión.....	30
9.	Conclusiones	33
10.	Perspectivas	34
11.	Referencias	34

I. Lista de Figuras

Figura 1. Proteínas del citoesqueleto neuronal involucradas en la plasticidad estructural..	7
Figura 2. Morfología de las espinas dendríticas.	8
Figura 3. Proteínas de unión a actina y su función en la plasticidad sináptica de las espinas dendríticas.	10
Figura 4. Diagrama de la conectividad de la CPF con estructuras corticales y subcorticales involucradas en la conducta emocional y su regulación.	13
Figura 5. Diagrama de la conectividad de la CPF con estructuras corticales y subcorticales involucradas con el control motor y la conducta dirigida a metas.	14
Figura 6. Efecto de la suplementación con DHA sobre el peso del cerebro de ratones C57BL/6 y C58/J entre 8 y 10 semanas de edad.	25
Figura 7. Peso corporal de ratones C57BL/6 y C58/J entre 7 y 16 semanas de edad.	26
Figura 8. Expresión de cofilina y p-cofilina en la CPF de ratones suplementados y no suplementados con DHA en la CPF.	27
Figura 9. Expresión de sinaptopodina en la CPF de ratones suplementados y no suplementados con DHA en la CPF.	28
Figura 10. Sitios de unión de factores de transcripción al promotor del gen Cof.	29
Figura 11. Sitios de unión de factores de transcripción al promotor del gen SYNPO.	29
Figura 12. Densidad de las espinas dendríticas de neuronas piramidales de la capa II/III de la CPF.	30
Figura 13. Vías de señalización de GPRs 40/120, activados por DHA.	32

II. Abreviaturas

5-HT	Serotonina
A	Fenotipo autista
ABPs	Proteínas de unión a actina
ADN	Ácido desoxirribonucléico
Akt	Proteína cinasa B
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
AMPARs	Receptores AMPA
ANOVA	Análisis de Varianza
ALA	Ácido α -linolénico
APA	Asociación Americana de Psiquiatría
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CA	Cuerno de Ammon
CLIMA	Clínica mexicana de autismo
CNVs	Variaciones en el número de copias
Cof	Cofilina
CPF	Corteza prefrontal
CREB	Elemento de respuesta a unión de AMP cíclico
D2R	Receptores a dopamina tipo 2
DHA	Ácido docosahexaenoico
DL	Dorsolateral
DSM	Manual diagnóstico y estadístico de la APA

EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
EtOH	Etanol
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
GPR	Receptor acoplado a proteínas G
HRP	Peroxidasa de rábano
LC-PUFA-n3	Ácido graso poliinsaturado de cadena larga omega 3
LTP	Potenciación a largo plazo
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos
MIA	Activación inmune materna
MeOH	Metanol
OM	Orbitomedial
OMS	Organización Mundial de la Salud
p-Cof	Cofilina fosforilada
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisómicos
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
RIPA RXR	Ensayo de radioinmunoprecipitación
SFARI	Ácido retinoico
SYNPO	Iniciativa de investigación sobre autismo de la Fundación Simons
TBS	Sinaptopodina
	Solución salina amortiguadora con Tris

TEA

Trastorno del Espectro Autista

1. Resumen

El autismo es un grupo de trastornos del neurodesarrollo pre y posnatal colectivamente denominado trastorno del espectro autista (TEA). Éste cuenta con una etiología muy heterogénea a la cual se han asociado mecanismos genéticos que regulan la expresión de genes involucrados en el rearrreglo del citoesqueleto y la plasticidad neuronal. En sujetos con TEA, se han descrito cambios en el número y morfología de las espinas dendríticas, las cuales son sitios primarios de contacto para la mayor parte de las sinapsis excitatorias. El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso poliinsaturado omega-3 de cadena larga (LC-PUFA n-3) que ha sido propuesto como tratamiento para el TEA, pues se ha encontrado que activa cascadas de señalización que inducen el rearrreglo del citoesqueleto y ha sido relacionado con mejoras de las funciones cognitivas. Aunque se conocen algunos receptores y vías de señalización neuronales que pueden ser activadas por el DHA, aún no se ha descrito su impacto sobre los mecanismos involucrados en el rearrreglo del citoesqueleto. Un modelo de interés para el estudio del TEA es la cepa C58/J pues presenta un fenotipo conductual de tipo autista. Previamente en nuestro grupo se demostró que existen cambios en el contenido de proteínas asociadas al citoesqueleto, así como cambios en la complejidad del árbol dendrítico y las espinas dendríticas de la corteza prefrontal y el hipocampo de ratones adultos de esta cepa. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto será evaluar los efectos de la suplementación con DHA sobre el contenido de las proteínas de unión a actina (ABPs) cofilina y sinaptopodina, las cuales están relacionadas con el rearrreglo del citoesqueleto en la corteza prefrontal (CPF) de ratones adultos con fenotipo autista.

Palabras clave: Trastorno del Espectro Autista, citoesqueleto, neuronas piramidales, dendritas, espinas dendríticas, actina, cofilina, sinaptopodina corteza prefrontal, suplementación, DHA, C58/J

2. Antecedentes

2.1 Trastorno del Espectro Autista (TEA)

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es considerado un trastorno del neurodesarrollo pre y posnatal (American Psychiatric Association, 2013) que se caracteriza por la presencia de deficiencias en la comunicación social, así como patrones repetitivos en la conducta, intereses o actividades, que persisten a lo largo de la vida (Bourgeron, 2015).

El TEA fue identificado por primera vez por Leo Kanner en 1943 y Hans Asperger en 1944 (Kandel et al., 2013), no obstante, fue aceptado como diagnóstico hasta la década de los 80's (Jumah et al., 2016). Éste tiene su origen muy temprano en el desarrollo (antes de los 3 años) y persiste hasta la adultez (Ajram et al., 2017; Yeargin-Allsopp et al., 2003). De acuerdo con DiCicco-Bloom et al. (2006) éste es uno de los desórdenes de la niñez más impactantes en términos de prevalencia, morbilidad, consecuencias, impacto en la familia y costo a la sociedad.

2.1.1 Diagnóstico

El manual diagnóstico y estadístico (DSM) de la Asociación Americana de Psiquiatría (APA), en su 5ª y más reciente edición (American Psychiatric Association, 2013) establece cinco criterios de diagnóstico enlistados alfabéticamente de la A a la E, que a continuación se presentan:

- A) Déficit persistente en la comunicación e interacción social en múltiples contextos.
- B) Conductas, intereses o actividades restringidas y repetitivas.
- C) Los síntomas deben estar presentes en el periodo temprano del desarrollo.
- D) Los síntomas causan discapacidades sociales, ocupacionales, u otras áreas importantes de funcionamiento.
- E) Estas alteraciones no pueden ser explicadas por discapacidad intelectual o retraso en el desarrollo global.

De estos criterios, las características esenciales para el diagnóstico son los puntos A y B, y la etapa en la cual se presenten las deficiencias funcionales variará de acuerdo con las características personales y ambientales del sujeto.

Estos criterios también se describen en nivel de severidad del 1 al 3 dependiendo de los síntomas, relacionados con la autosuficiencia y necesidad de un cuidador primario. Asimismo, el DSM-V aclara que se debe especificar si el trastorno se presenta con o sin discapacidad intelectual y/o del lenguaje, asociado con una condición médica o genética conocida o factor ambiental, vinculado con otro desorden del neurodesarrollo, mental o conductual, o con catatonía.

2.1.2 Tratamiento

Actualmente, los medicamentos aprobados para tratar los síntomas conductuales del TEA son risperidona y aripiprazol, los cuales son antipsicóticos atípicos usados para el tratamiento de diversos síntomas, como los síntomas positivos de la esquizofrenia, y la conducta repetitiva en el TEA. La risperidona es un antagonista altamente selectivo de los receptores D2 y 5-HT_{2A}, lo que lo convierte en un útil antipsicótico (Uriarte, 2014). También se ha encontrado que la risperidona fortalece el efecto neuroprotector y antioxidante de los astrocitos y se usa para tratar la irritabilidad, movimientos estereotipados, agresión, ansiedad y depresión (McCracken et al., 2002; McDougle et al., 1998). Por su parte, el aripiprazol actúa como antagonista parcial de receptores D2 y 5-HT_{1A}, y es usado para tratar desórdenes depresivos, tics e irritabilidad (Hirsch & Pringsheim, 2016; Marcus et al., 2009; Owen et al., 2009; Uriarte, 2014). Aunque estos fármacos son los únicos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Matson et al., 2011), existen otros que están siendo probados en ensayos clínicos (Eissa et al., 2018). Aunque estos tratamientos parecen ser elusivos (Brumback et al., 2018; Eissa et al., 2018), los programas de intervención conductual, educativos y de apoyo profesional suelen mejorar el comportamiento a medida que incrementa la edad del individuo (Kandel et al., 2013; Martínez-Cerdeño et al., 2016).

2.1.3 Epidemiología

La prevalencia del TEA ha incrementado de manera continua desde el primer estudio epidemiológico realizado por Lotter (1966). Este incremento se ha dado consistentemente de manera global (World Health Organization, 2013) y puede deberse a los cambios en los conceptos y criterios de diagnóstico, así como a la sensibilización y concientización de la sociedad (Lai et al., 2014). De acuerdo con la OMS (World Health Organization, 2013) uno

en cada 160 niños se encuentra afectado con el TEA, lo que indicaría que aproximadamente el 0.63% de la población mundial padece este trastorno.

En México, el equipo de Fombonne et al., (2016) con apoyo de la Clínica Mexicana de Autismo (CLIMA) dirigió el primer estudio epidemiológico del país en la ciudad de León, Guanajuato con 12,116 niños de ocho años de edad. Este estudio reveló que la prevalencia era de 0.87%, mayor que la prevalencia en países latinoamericanos como Brasil y Argentina, pero menor en comparación a la prevalencia de 2.79% en Estados Unidos (Xu et al., 2018). Asimismo, se encontró que el 86% de los sujetos con TEA eran de sexo masculino (Fombonne et al., 2016).

Lo anterior coincide con distintos estudios epidemiológicos que indican una mayor prevalencia en hombres que en mujeres con una relación de 3:1 (Loomes et al., 2017). Schaafsma & Pfaff (2014) proponen que existen factores que pueden explicar la predominancia de este trastorno en varones, entre los cuales destacan mecanismos genéticos como la sobreexpresión de genes cromosomales por polisomía o monosomía (D. V. Bishop et al., 2011; Creswell & Skuse, 1999; Geerts et al., 2003; van Rijn & Swaab, 2011), genes ligados al cromosoma Y (Arnold, 2009; Arnold & Chen, 2009; Cohen et al., 2011), expresión específica de genes ligados al cromosoma X (Adegbola et al., 2008; Aziz et al., 2011; Chocholska et al., 2006; Chung et al., 2011; Correia et al., 2010), mosaicismo e inactivación sesgada del cromosoma X (Allen-Brady et al., 2010; Piton et al., 2008; Shinawi et al., 2009; Yoshida et al., 2011) (Allen-Brady, Cannon, Robison, McMahon, & Coon, 2010; Piton et al., 2008; Shinawi et al., 2009; Yoshida et al., 2011), e impronta materna (Bishop et al., 2000; Creswell & Skuse, 1999; Kesler et al., 2003). No obstante, también se han propuesto mecanismos de camuflaje de los síntomas típicos del TEA en mujeres, pues se han reportado conductas compensatorias que mitigan las deficiencias sociales del trastorno (Dean et al., 2016; Micai et al., 2019; Tierney et al., 2016); lo que dificulta el diagnóstico (Hull et al., 2020).

2.1.4 Etiología

Éste trastorno cuenta con una variabilidad fenotípica muy amplia que refleja una heterogeneidad etiológica muy marcada (Ajram et al., 2017), por lo que tampoco existe una neuropatología clara (Kandel et al., 2013). Sin embargo, todo apunta a que la base neurobiológica del autismo es una combinación compleja de variantes genéticas (Marshall

et al., 2008), regulación epigenética (Geschwind, 2011), factores ambientales (Hertz-Picciotto et al., 2006), anormalidades de las células gliales (Casanova et al., 2006), neurogénesis aberrante (Wegiel et al., 2010), factores del sistema inmune (Meltzer & Van de Water, 2017), entre otros riesgos (Brumback et al., 2018; Martínez-Cerdeño et al., 2016) por lo que hasta hoy la etiología no se debe a una sola causa.

Entre los factores ambientales que se han relacionado con el TEA se han identificado las infecciones de las madres durante el embarazo, parto prematuro, deficiencia de ácido fólico y exposición a toxinas y metales (Joensuu et al., 2018).

Algunos autores han sugerido que se trata de un trastorno poligénico con diferentes combinaciones entre individuos, pues se han identificado aproximadamente 1000 genes asociados al TEA (Bourgeron, 2015; Kandel et al., 2013). De la misma forma, se ha propuesto el aumento en la variación del número de copias (CNVs) de distintos genes, que puede generar una inestabilidad genómica por la supresión y duplicación de genes (Persico & Napolioni, 2013).

Diferentes investigaciones han dado lugar a la identificación de genes de riesgo para el desarrollo de la patología que se relacionan directamente con el citoesqueleto neuronal y su plasticidad. Estos genes se encuentran enlistados en los sitios web de acceso público *SFARI Gene* (<http://gene.sfari.org/database/humangene/>) y *AutismKB 2.0: A knowledgebase for the genetic evidence of autism spectrum disorder* (http://db.cbi.pku.edu.cn/autismkb_v2/index.php).

2.2 Citoesqueleto y plasticidad neuronal

El citoesqueleto es un sistema filamentoso vital para la funcionalidad de la célula ya que le da direccionalidad, le da forma y fuerza, distribuye sus organelos, le permite moverse y participa en su división. Los tres sistemas de filamentos que conforman el citoesqueleto son los filamentos intermedios, los microtúbulos y los filamentos de actina (Alberts, 2015). Éstos y sus proteínas asociadas conforman aproximadamente una cuarta parte del total de proteínas en la célula (Billingsley & Kincaid, 1997; Kandel et al., 2013).

De acuerdo con el tipo celular, función o etapa de desarrollo en particular, el citoesqueleto puede especializarse bioquímicamente. Además, cada elemento del citoesqueleto funge papeles únicos y esenciales para la funcionalidad del sistema nervioso (Squire et al., 2008). En las neuronas se conservan las tres categorías de filamentos, pero el tipo de filamentos intermedios en las células nerviosas reciben el nombre de neurofilamentos. Estos filamentos son estables y casi completamente polimerizados, miden 10 nm de diámetro y proporcionan fuerza y resistencia al estrés mecánico. Están conformados por subunidades muy pequeñas, lo que los hace largos y fibrosos. Rodean a la superficie interna de la envoltura nuclear, protegiendo al ADN y son el componente más abundante en los axones, lo cual ayuda a las neuronas a extender axones largos y compactos (Alberts, 2015; Kandel et al., 2013).

Los microtúbulos dan posición a los organelos rodeados de membrana y dirigen el transporte intracelular (Hyams & Lloyd, 1993; McKean et al., 2001). Están conformados por subunidades de heterodímeros de α y β -tubulina (Squire et al., 2008). Tienen forma de cilindros huecos y miden 25 nm de diámetro, y son rígidos, largos y rectos. En el sistema nervioso, desarrollan y mantienen la forma celular extendiendo andamios de un extremo de la neurona a otro. En dendritas y axones maduros, los microtúbulos mantienen su estabilidad gracias a las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), que promueven la polimerización orientada y el ensamblaje de polímeros de tubulina. Estas MAPs se distribuyen diferencialmente en axones y dendritas; por ejemplo, la MAP2 se encuentra más concentrada en las dendritas, y Tau en los axones (Goedert et al., 1991; Matus, 1991)

Los microfilamentos o filamentos de actina, son los más delgados (3-7 nm), determinan la forma de la superficie celular y son necesarios para la locomoción (Kessels et al., 2011). La actina se encuentra en forma monomérica (G-actina) o como actina globular polimerizada (F-actina) formando dos cadenas (Guadix, 2007). Los filamentos de actina son cortos y se concentran en la periferia celular (plasma cortical) y forman una densa red con proteínas de unión a actina. Son importantes para la funcionalidad celular como los conos de crecimiento axonal, la generación de microdominios específicos y la creación de especializaciones morfológicas en la pre y postsinápsis (Fregozo & Pérez Vega, 2012). No se debe dejar de lado el importante papel de las proteínas asociadas, pues éstas se unen a los filamentos o a sus subunidades, lo que permite determinar los lugares de ensamblaje de nuevos filamentos, regular la ruptura de filamentos para formar nuevas subunidades,

cambiar la cinética de ensamblaje y desensamblaje, transformar la energía en fuerza y unir filamentos entre sí o a otras estructuras (Alberts, 2015).

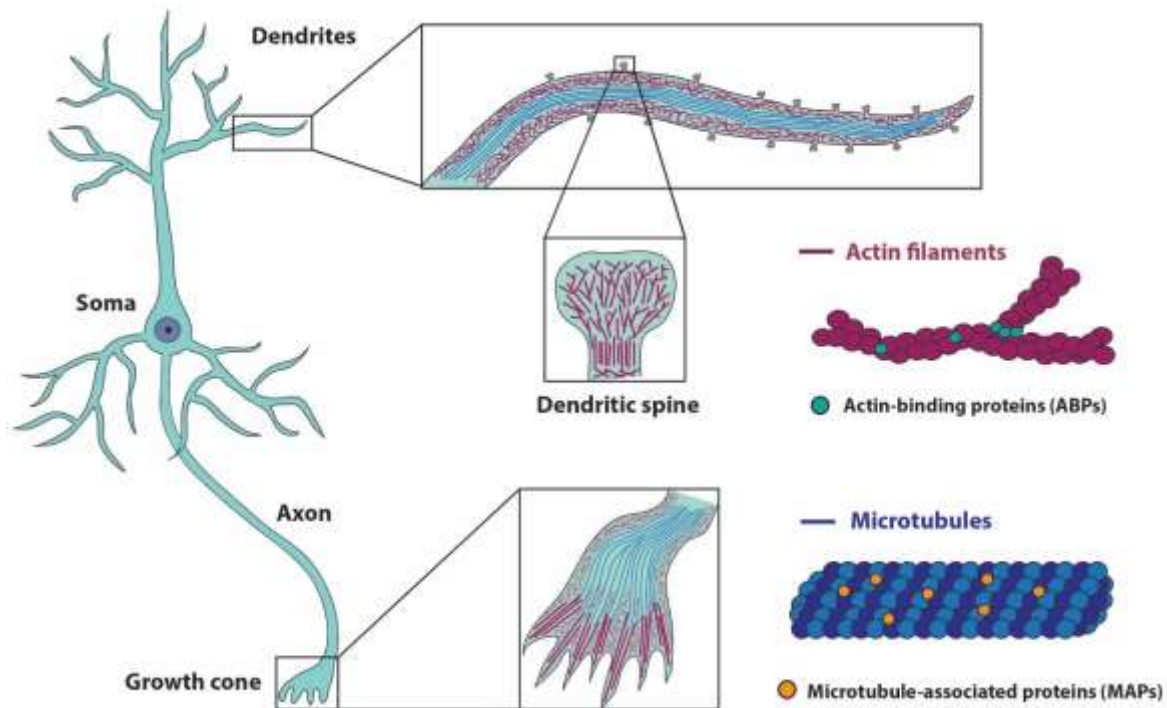


Figura 1. Proteínas del citoesqueleto neuronal involucradas en la plasticidad estructural. *Modificada de Barón-Mendoza & González-Arenas, 2020.

Cuando el cerebro es estimulado, se pueden desencadenar cambios de acuerdo con dos propiedades neuronales. La primera es la excitabilidad, que es la capacidad de las células nerviosas para reaccionar ante un input o estímulo entrante. La segunda se refiere a transformaciones funcionales y estructurales que pueden surgir en circuitos específicos como resultado de estímulos apropiados. Esta propiedad es conocida como plasticidad neuronal (Kandel et al., 2013).

La plasticidad neuronal se define como la capacidad de las neuronas para someterse a cambios en respuesta a la estimulación (Castrén & Hen, 2013). Para que ocurra plasticidad neuronal se requiere del rearrreglo del citoesqueleto (Lamprecht & LeDoux, 2004). El estado dinámico de microtúbulos y microfilamentos permite la plasticidad en una neurona madura (Kandel et al., 2013). Esto puede verse reflejado en el fortalecimiento y debilitamiento de

las sinapsis mediante la modificación morfológica de espinas dendríticas para modular la conectividad o la transmisión sináptica (Urbanska et al., 2012).

2.2.1 Espinas dendríticas

Las espinas dendríticas son el sitio primario de contacto entre dendritas y axones. Éstas son protrusiones del eje dendrítico, que sirven como sitio postsináptico primario de contacto para la mayoría de las sinapsis excitatorias del Sistema Nervioso Central (SNC) (Fischer et al., 1998; Hering & Sheng, 2001). Existen diversas clasificaciones de acuerdo con la morfología de las espinas, el grupo de Risher et al., 2014 las dividió en filopodios, delgadas largas, delgadas, regordetas, de hongo, y ramificadas. Diferentes estudios han comprobado que la estructura de la espina está directamente relacionada con las características funcionales de la sinapsis (Tashiro & Yuste, 2003). Asimismo, han sido propuestas como la base morfológica de la plasticidad sináptica pues son susceptibles a modificaciones dependientes de la actividad sináptica (Yuste & Bonhoeffer, 2004), y por lo tanto están involucradas en procesos de aprendizaje y memoria (Tashiro & Yuste, 2003).

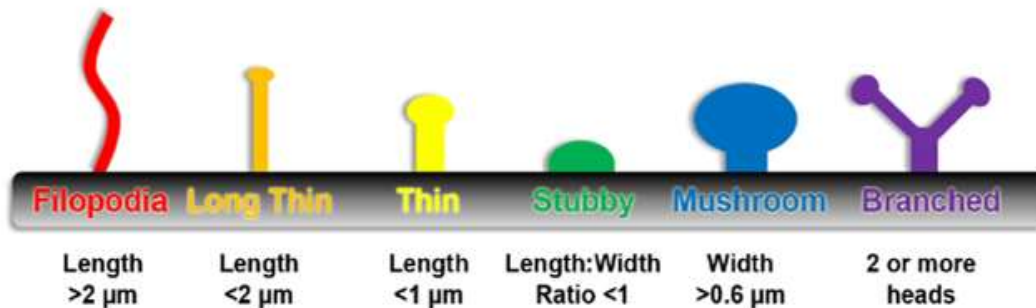


Figura 2. Morfología de las espinas dendríticas. *Reproducida de Risher et al., 2014.

2.2.1.1 Proteínas de unión a actina

Los cambios morfológicos de las espinas dendríticas dependen del rearrreglo del citoesqueleto de actina (Borovac et al., 2018; Hering & Sheng, 2001; Spence & Soderling, 2015; Tashiro & Yuste, 2003). Además de encontrarse en las espinas, éstos se concentran en la periferia de la célula (actina cortical) y determinan la forma de la superficie celular. Los microfilamentos son necesarios para la locomoción (Kessels et al., 2011), así como para la

formación de los conos de crecimiento axonal, la generación de microdominios específicos y la creación de especializaciones morfológicas en la pre y postsinápsis (Fregozo & Pérez Vega, 2012). Las proteínas de unión a actina (ABPs) se unen a los filamentos o a sus subunidades, lo que permite determinar los lugares de ensamblaje de nuevos filamentos, regular la ruptura de filamentos para formar nuevas subunidades, cambiar la cinética de ensamblaje y desensamblaje, transformar la energía en fuerza y unir filamentos entre sí o a otras estructuras (Alberts, 2015).

Dentro de las ABPs relevantes para la plasticidad de las espinas dendríticas destaca la cofilina. La cofilina se encuentra abundantemente en la densidad postsináptica (PSD) (Racz & Weinberg, 2006) y es una proteína encargada despolimerizar los filamentos de actina en su extremo negativo (Sarniere & Bamberg, 2004). Esta actividad es inhibida, mediante la fosforilación de la proteína en el residuo de serina 3 (Ser-3) (Yang et al., 1998). Por lo tanto, la actividad de la cofilina es de suma importancia para la dinámica de la PSD (Frost et al., 2010) pues se ha comprobado que la retracción de los filamentos de actina es crucial para el reclutamiento e inserción de receptores AMPA (AMPArs) en esta zona (Spence & Soderling, 2015).

Por su parte, la sinaptopodina (SYNPO) es una ABP rica en prolina, por lo que tiene una estructura lineal que permite la alineación paralela de los filamentos de actina (Mundel et al., 1997). Ésta se encuentra en abundancia en el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el núcleo estriado y el hipocampo, y más específicamente en las espinas dendríticas (Mundel et al., 1997, 1997; Segal et al., 2010) y en los segmentos iniciales de los axones (Schlüter et al., 2017). Ha sido ampliamente relacionada con el aparato espinal, el cual es una extensión del retículo endoplásmico liso dentro del cuello de las espinas dendríticas, siendo este la principal fuente de calcio intracelular de las espinas dendríticas (Deller et al., 2000, 2007; Segal et al., 2010). Se ha observado que ratones que no expresan SYNPO carecen del aparato espinal y deficiencias en la inducción de potenciales a largo plazo (LTPs) (Deller et al., 2003). Ha sido observada mayormente en espinas con morfología de hongo que, como se mencionó anteriormente, está relacionada con la maduración de éstas (Tashiro & Yuste, 2003); por lo que se ha propuesto que la SYNPO confiere estabilidad a las espinas dendríticas (Fischer et al., 2000; Okubo-Suzuki et al., 2008).

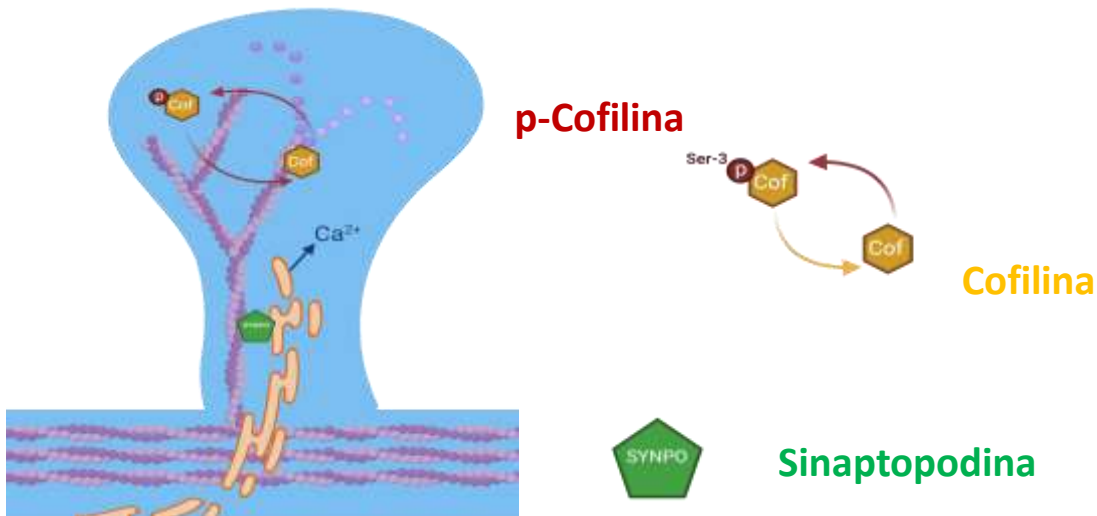


Figura 3. Proteínas de unión a actina y su función en la plasticidad sináptica de las espinas dendríticas.

2.2.2 Implicaciones en el TEA

Las anomalías del desarrollo cerebral y su conectividad en el TEA podrían estar asociadas con alteraciones en la plasticidad neuronal que incluye procesos de neuritogénesis, elongación de axones y dendritas (Bakos et al., 2015). Los genes de riesgo en el TEA suelen codificar para proteínas de andamiaje sináptico, receptores, moléculas de adhesión celular, proteínas que controlan la dinámica de actina, proteínas involucradas en la remodelación de cromatina, transcripción, síntesis o degradación de proteínas (Joensuu et al., 2018).

Muchos de los genes susceptibles del autismo convergen en vías postsinápticas de células glutamatérgicas, en el desarrollo y maduración de contactos sinápticos o la transmisión sináptica (Joensuu et al., 2018). Se han encontrado, también, mutaciones en algunos genes relacionados con la plasticidad neuronal asociados al TEA. Estos hallazgos podrían indicar que, dentro de los cambios en el sistema nervioso de pacientes con TEA, se encuentren cambios en la morfología y plasticidad de las neuronas.

2.3 Corteza prefrontal

La corteza prefrontal (CPF) forma parte de la neocorteza y se encuentra en el polo anterior de los cerebros de mamíferos, justo delante de la corteza motora y delimita subcorticalmente con la superficie dorsomedial de la corteza límbica (Smith et al., 2012). Los diferentes tipos de corteza representan aproximadamente el 40% del volumen total del cerebro humano, y de ésta alrededor del 90% es neocorteza (Pinel, 2012; Portellano, 2011). Su grosor es constante entre especies (2-4 mm) y se caracteriza por su organización en seis capas y diversas minicolumnas que incrementan la eficiencia computacional (Kandel et al., 2013). Las capas de la neocorteza se distinguen por el tipo, densidad y disposición celular (Snell & Ovid Technologies, 2014). Las principales eferencias de la neocorteza se dan mediante las neuronas piramidales, siendo las de la capa II/III las encargadas de la comunicación corticocortical, y las piramidales de las capas V/VI de la comunicación subcortical (Kandel et al., 2013; Purves, 2018).

Existe una diferencia en la maduración de las capas neuronales de la CPF. Las capas IV, V y VI maduran antes que las capas II y III (Poliakov, 1961). Específicamente, el modelamiento y diferenciación de las neuronas piramidales de la capa III continúa hasta la pubertad (Mrzljak et al., 1991). Esta maduración termina hacia la tercera década de vida en los humanos y se ha relacionado con el control cognitivo del proceso atencional (Fuster, 2015).

Asimismo, la neocorteza tiene una organización minicolumnar. La formación minicolumnar comienza temprano en el desarrollo con la migración y diferenciación celular por medio de la glía radial. Durante el primer año de vida hay una gran densidad neuronal, pero al llegar a los dos años comienza el proceso apoptótico de refinación haciendo que las minicolumnas se espacien y den lugar al acomodo de axones y dendritas a través de las capas corticales (Amaral et al., 2008). Las columnas miden una fracción de milímetro y sus neuronas están dispuestas en grupos de alineación radial que abarcan todas las capas corticales. Responden de manera parecida, por lo que se cree que forman parte de una red de procesamiento local (Kandel et al., 2013; Purves, 2018). Además, existen interneuronas GABAérgicas que se acomodan en el núcleo y en la periferia de la minicolumna modulando la señalización de las neuronas piramidales para el procesamiento de información (Casanova et al., 2006).

2.3.1 Conectividad

La CPF recibe proyecciones de diversas áreas corticales y subcorticales, y proyecta a casi todas las estructuras de las que recibe información (Fuster, 2015) La mayor parte de esas proyecciones retroactivas son de tipo top-down a otros sistemas corticales sensitivos y motores (Fuster, 2015; Kandel et al., 2013; Smith et al., 2012).

De acuerdo con sus aferencias, la CPF puede dividirse principalmente en dos áreas: CPF dorsolateral (CPFDL), que recibe aferencias visuales, auditivas y somatosensoriales; y CPF orbitomedial (OM), la cual recibe aferencias olfatorias, gustativas, además de auditivas y algunas somatosensoriales (Helen Barbas et al., 2011; Carmichael & Price, 1995; Fuster, 2015; Öngür & Price, 2000). También se ha encontrado que, específicamente la OM recibe y proyecta fibras hacia el tálamo medial (Ilinsky et al., 1985; Middleton & Strick, 1994; Porrino & Goldman-Rakic, 1982), el hipotálamo (Jacobson et al., 1978; Kievit & Kuypers, 1975; Rempel-Clover & Barbas, 1998), la corteza límbica (Amaral & Price, 1984; H Barbas & De Olmos, 1990; Helen Barbas et al., 2011; Cavada & Reinoso-Suárez, 1985; Llamas et al., 1989; McDonald, 1991; Morecraft et al., 1992; Porrino & Goldman-Rakic, 1982) y la corteza temporal medial, incluyendo al hipocampo (Bachevalier et al., 1997; Carmichael & Price, 1995; Cavada et al., 2000; Pandya & Yeterian, 1985; Vogt & Pandya, 1987; Webster et al., 1994). Este circuito conforma el sustrato anatómico para la conducta emocional e instintiva (Fuster, 2015).

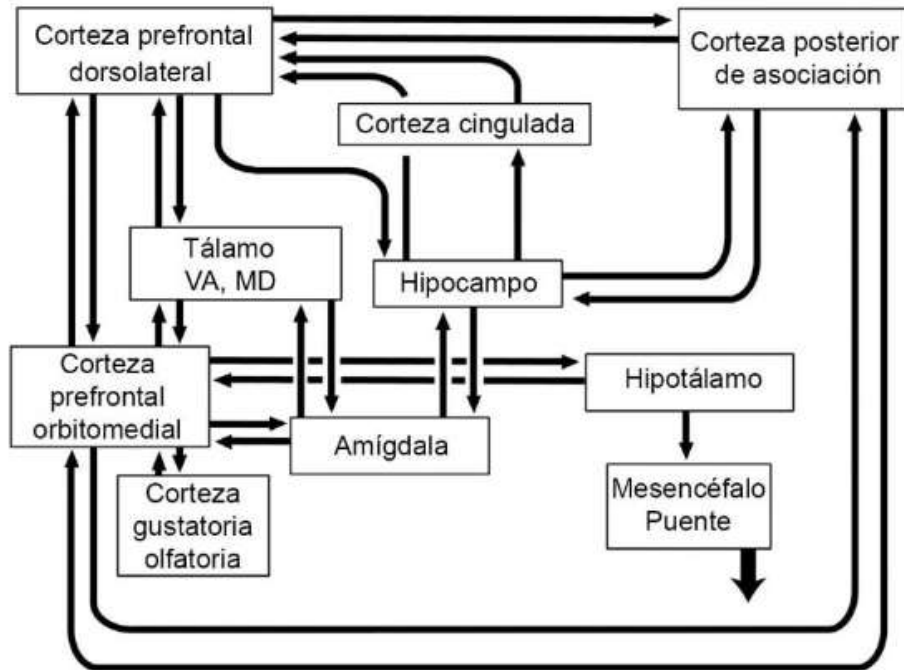


Figura 4. Diagrama de la conectividad de la CPF con estructuras corticales y subcorticales involucradas en la conducta emocional y su regulación. *Reproducido de Fuster, 2015.

Del mismo modo, el área DL de la CPF recibe y proyecta fibras hacia el tálamo lateral (Kelly & Strick, 2004; Schell & Strick, 1984), el núcleo caudado dorsal (De Vito & Smith Jr, 1964; Johnson et al., 1968; Kemp & Powell, 1971; Kitai et al., 1976; Leonard, 1969) y áreas posteriores de la neocorteza (Helen Barbas & Mesulam, 1981; Benevento & Fallon, 1975; Huerta et al., 1987; Jacobson et al., 1978; Pandya & Kuypers, 1969; Petrides & Pandya, 1984). Esta red supone una estructura jerárquica donde la CPF proyecta a corteza premotora, ésta a su vez envía fibras a la corteza motora primaria y ésta envía información a áreas corticales sensoriales, así como a áreas subcorticales como el tálamo y, de manera indirecta a estructuras involucradas en el control motor como los ganglios basales y el cerebelo. Lo anterior forma un ciclo de percepción-acción, es decir, un flujo circular de procesamiento de la información que vincula al organismo con su ambiente para poder ejecutar conductas dirigidas a metas (Fuster, 2015).

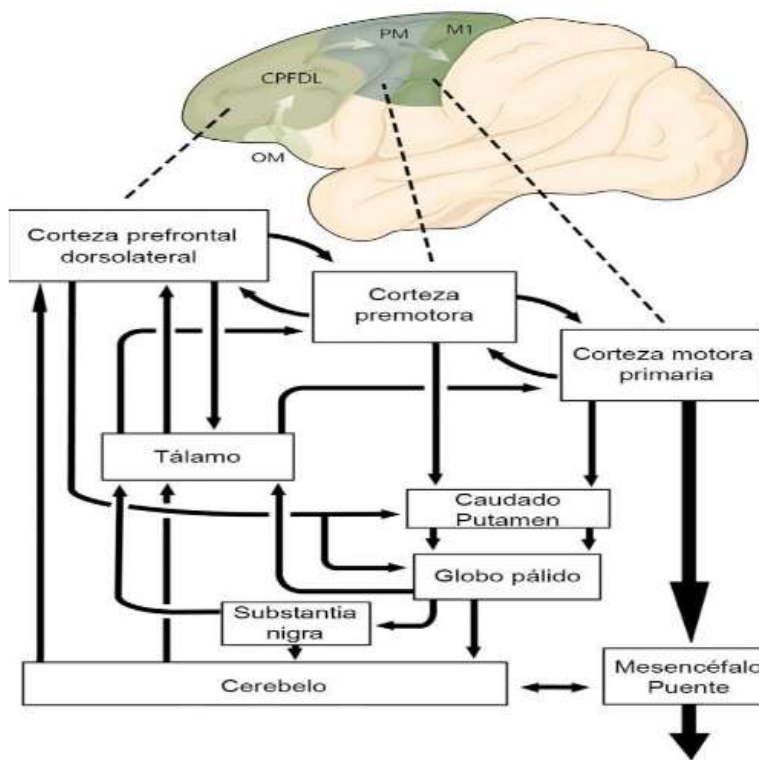


Figura 5. Diagrama de la conectividad de la CPF con estructuras corticales y subcorticales involucradas con el control motor y la conducta dirigida a metas. *Modificado de Fuster, (2015) y Kandel et al., (2013).

2.3.2 Implicaciones en el TEA

La CPF ha sido asociada con signos característicos del TEA como la regulación de respuestas socioemocionales y la dificultad para llevar a cabo funciones ejecutivas. Es por ello que se han llevado a cabo diversas investigaciones que buscan conocer las características neurobiológicas que subyacen a este trastorno y su relación con esta estructura.

Por ejemplo, se han observado diferencias en el volumen cerebral dependiendo de la edad, pues en etapas tempranas existe un incremento en la materia gris del lóbulo frontal de niños con TEA (Courchesne et al., 2001) y éste va disminuyendo en etapas posteriores del desarrollo (Carper & Courchesne, 2005). Estos cambios podrían ser debidos al aumento en el número de neuronas en la infancia (Courchesne et al., 2011) que a su vez puede relacionarse con la reducción en el ancho de las minicolumnas en la neocorteza (Casanova et al., 2006). Además, se han reportado anomalías en la citoarquitectura laminar y desorganización de las neuronas corticales (Stoner et al., 2014), decremento en la

expresión de proteínas relevantes en el proceso de mielinización e incremento de (Broek et al., 2014). Estos hallazgos podrían relacionarse con los cambios en patrones de conectividad de la CPF (Barnea-Goraly et al., 2004; Monk et al., 2009).

2.4 Ácido Docosahexaenoico

El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga omega-3 (LC-PUFA n-3). Este es un ácido graso esencial, es decir que es necesario para el mantenimiento de una salud óptima, pero el porcentaje de biosíntesis es muy bajo (alrededor del 5%) por lo que debe ser obtenido de la dieta (Yehuda et al., 2005). La tabla 1 enlista el contenido de PUFAs-n3 en los alimentos,

Tabla 1. Contenido de Ácidos grasos ω 3 en los alimentos. ALA: Ácido α -linolénico; EPA: Ácido eicosapentaenoico; DHA: Ácido docosahexaenoico. *Traducido de *Office of Dietary Supplements – Omega-3 fatty acids, NIH*

Alimento	Gramos por porción		
	ALA	DHA	EPA
Aceite de linaza, 1cda.	7.26		
Semillas de chía, 1oz.	5.06		
Nuez de castilla, 1oz.	2.57		
Linaza entera, 1cda.	2.35		
Salmón atlántico asado (piscifactoría), 3oz.		1.24	0.59
Salmón atlántico asado (salvaje), 3oz.		1.22	0.35
Arenque atlántico asado, 3oz.		0.94	0.77
Aceite de canola, 1cda.	1.28		

Sardinas enlatadas en salsa de tomate, drenadas, 3oz.		0.74	0.45
Verdel atlántico asado, 3oz.		0.59	0.43
Salmón rosa enlatado, drenado, 3oz.	0.04	0.63	0.28
Aceite de soya, 1cda.	0.92		
Trucha arcoíris salvaje asada, 3oz.		0.44	0.40
Nueces negras, 1oz.	0.76		
Mayonesa, 1 cda.	0.74		
Atún light enlatado en agua, drenado, 3oz.		0.17	0.02
Tilapia asada, 3oz.	0.04	0.11	
Escalopas asadas, 3oz.		0.09	0.06
Bacalao pacífico asado, 3oz.		0.10	0.04
Atún de aleta amarilla asado, 3oz.		0.09	0.01
Frijoles enlatados, ½ taza	0.10		
Frijoles refritos enlatados, vegetarianos, ½ taza	0.07		
Carne molida 85% magra, asada, 3oz.	0.04		
Pan de trigo integral, 1 rebanada	0.04		
Huevo asado, 1 huevo		0.03	
Pechuga de pollo rostizada, 3oz.		0.02	0.01
Leche baja en grasa (1%), 1 taza	0.01		

Continuación tabla 1. Contenido de Ácidos grasos ω 3 en los alimentos. ALA: Ácido α -linolénico; EPA: Ácido eicosapentaenoico; DHA: Ácido docosahexaenoico. *Traducido de Office of Dietary Supplements – Omega-3 fatty acids, NIH

El cerebro contiene grandes cantidades de lípidos (Bradbury, 2011; Mazahery et al., 2017; Singh, 2005). El DHA se encuentra en abundancia en la corteza cerebral, las membranas de centros de comunicación sináptica y las mitocondrias (Singh, 2005), y es el PUFA más abundante en la materia gris en SNC (Bradbury, 2011).

Además de ser estructuralmente relevante en las neuronas, también activa cascadas de señalización al unirse con sus receptores PPAR γ , GPR40 y GPR120. Se ha visto que esta activación induce el rearrreglo del citoesqueleto; por ejemplo, se ha visto que la suplementación oral con DHA incrementa la densidad de espinas dendríticas en los hipocampos de gerbos maduros (Sakamoto et al., 2007). Además, la activación de PPAR γ ha sido relacionada con el crecimiento de neuritas en células de neuroblastoma humano (Miglio et al., 2009), y la activación del receptor GPR40 ha sido asociada con un incremento en la fosforilación de CREB, Akt, ERK1/2 y la síntesis de BDNF, lo que promueve la plasticidad neuronal (Yamashima, 2015) además de promover la neurogénesis en el hipocampo adulto (Yamashima, 2008). Por otra parte, la activación de éstos receptores y sus vías también han sido relacionados con cambios cognitivo-conductuales como mejoras en pruebas conductuales asociadas a memoria y aprendizaje en un modelo murino de Alzheimer (Quintanilla et al., 2014), procesos de adquisición y consolidación de la memoria (Yamashima, 2015), y efectos ansiolíticos en ratones (Auguste et al., 2016).

2.4.1 DHA como tratamiento para el TEA

El consumo de DHA ha sido relacionado con la mejora de procesos cognitivos como la atención y la memoria en sujetos neurotípicos (Boucher et al., 2011; Kirby et al., 2010a, 2010b; Kuratko et al., 2013; Richardson et al., 2012). Es por ello que se ha propuesto la intervención nutrimental con PUFAs para el tratamiento del TEA. Se han observado mejoras globales en el desempeño en instrumentos de medición y diagnósticos elaborados para personas con TEA (Meguid et al., 2008; Meiri et al., 2009; Ooi et al., 2015); así como en conductas típicas del trastorno, como reducción del comportamiento hiperactivo (Amminger et al., 2007; Bent et al., 2011; Infante et al., 2020), mejora de la conducta social (Mazahery et al., 2019; Parellada et al., 2017; Yui et al., 2012) y del lenguaje (Sheppard et al., 2017).

2.5 Modelos de estudio para el TEA

En la actualidad existen varios modelos animales que han ayudado en el estudio del TEA. Estos modelos deben contar con la misma disfunción biológica que cause la enfermedad en el humano, así como una respuesta análoga a los tratamientos que prevengan o reviertan los síntomas en el humano para ser válidos (Silverman et al., 2010). Dentro de estos modelos se encuentran aquellos que tienen relación genética con el trastorno donde se altera un gen, o bien, vías de señalización afectadas en el autismo (Moy, Nadler, Magnuson, & Crawley, 2006); modelos de síndromes comórbidos y modelos conductuales que muestran los síntomas centrales del TEA (Ellegood & Crawley, 2015).

Particularmente, los ratones de laboratorio *mus musculus* han sido ampliamente utilizados para el desarrollo de modelos genéticos y no genéticos ya que, al conocerse detalladamente su conducta silvestre, permite observar, medir y analizar los cambios conductuales relacionados con la sintomatología del trastorno (Hrabovska & Salyha, 2016). Entre los modelos genéticos más utilizados destacan Shank3 (ex4-9^J), Nlgn4^(-/-) y Nr1h3^(-/-); así como modelos sindrómicos, es decir que presentan otro trastorno comórbido al TEA como Fmr1^(-/-), Mecp2^{tm1Hzo} y Tsc1 (Bauman et al., 2019; Bey & Jiang, 2014). Del mismo modo, existen modelos ambientales como las ratas Wistar expuestas a ácido valproico, el cual es un fármaco antiepiléptico teratógeno, durante la gestación (Nicolini & Fahnstock, 2018); y el modelo de activación inmune materna (MIA) (Kentner et al., 2019). No obstante, la limitación en este tipo de modelos es que tienen una causa específica y bien identificada, mientras que el TEA, como se mencionó previamente, es multifactorial y su etiología heterogénea es dada por la interacción entre factores genéticos y ambientales. Es por ello que se han propuesto modelos conductuales para emular la heterogeneidad del trastorno como la cepa BTBR T+ tf/J y la C58/J (Bauman et al., 2019; Bey & Jiang, 2014; Ellegood et al., 2015).

2.5.1 Cepa C58/J como modelo de estudio para el TEA

La cepa C58/J fue desarrollada por McDowell en 1921 mediante el cruce endogámico de ratones C57 BL/6 a partir de la F38+ (000669 - C58/J, s/f; Flurkey, 2009). Ésta ha sido ampliamente utilizada como modelo conductual para la investigación del TEA (Blick et al., 2015; Moy et al., 2006; Muehlmann et al., 2012; Ryan et al., 2010), pues presenta conductas que asemejan a las deficiencias en la interacción social y a las conductas

restringidas y repetitivas observadas en el TEA en humanos como ansiedad incrementada, actividad exploratoria disminuida , marcaje o reconocimiento social decrementado (Ryan et al., 2010), hiperactividad motora en forma de saltos verticales, acicalamiento repetitivo y “piruetas o volteretas”, que se presentan a temprana edad y continúan durante la adultez (Blick et al., 2015; Moy et al., 2006; Muehlmann et al., 2012; Ryan et al., 2010).

También se ha probado la respuesta de los C58/J a diversos tratamientos farmacológicos propuestos para disminuir los síntomas del TEA. Por ejemplo, se ha encontrado que los saltos repetitivos disminuyen administrando antagonistas de mGluR5 (Silverman et al., 2010), así como una disminución de los estereotipos motores con el uso de un tratamiento agudo de oxitocina (Teng et al., 2013) y reducción de los saltos en los flancos traseros ante la administración de R-Baclofen (Silverman et al., 2010). Por lo anterior, este modelo representa una ventaja en la investigación sobre el TEA pues además de presentar los síntomas conductuales característicos de este trastorno y responder a diversos tratamientos farmacológicos, su origen endogámico mantiene la heterogeneidad característica del autismo.

Previamente nuestro grupo demostró que los ratones macho adultos de la cepa C58/J presenta cambios en proteínas relacionadas con el rearreglo del citoesqueleto, particularmente se observó un decremento significativo en el contenido de p-cofilina en la CPF, en comparación con una cepa neurotípica (Barón-Mendoza et al., 2018). Posteriormente, se realizó un análisis de Sholl para analizar la complejidad del árbol dendrítico de neuronas piramidales CPF e hipocampo de ésta cepa, encontrando que el modelo de TEA despliega una menor complejidad dendrítica en comparación con la cepa control (Barón-Mendoza et al., 2019). Asimismo, se analizó el número y clasificación de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo y se encontró que la cepa C58/J presenta un mayor número de espinas de tipo larga delgada en la dendritas apicales y basales, que indican inmadurez de las espinas, y un menor número de espinas maduras de tipo hongo en las dendritas basales, que indicarían disminución de espinas maduras. Estos resultados contribuyen a las teorías que proponen que existen cambios funcionales y morfológicos en las neuronas de sujetos con TEA.

3. Justificación

La conectividad neuronal atípica en el TEA ha sido asociada con alteraciones en la plasticidad estructural de las espinas dendríticas. Para la formación de éstas es necesaria la dinámica del citoesqueleto de actina mediante la actividad de las ABPs. Se ha propuesto que el DHA podría tener un efecto sobre estas proteínas. Por lo anterior, es importante evaluar los efectos de la suplementación con DHA sobre las ABPs, cofilina y sinaptopodina en la CPF de ratones con fenotipo autista.

4. Hipótesis

En la CPF:

- El contenido de las ABPs cofilina, p-cofilina y sinaptopodina será menor en los ratones con fenotipo autista en comparación con el fenotipo silvestre.
- El contenido de estas proteínas incrementará en ambas cepas al ser suplementadas con DHA.
- La densidad de espinas dendríticas será mayor en los ratones con fenotipo autista en comparación con los ratones neurotípicos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar los efectos de la suplementación con DHA en la CPF de la cepa C58/J (fenotipo autista), a través del análisis del contenido de las proteínas de unión a actina (cofilina y sinaptopodina).

5.2 Objetivos particulares

Todos los objetivos se llevarán a cabo en ratones adultos de la cepa C58/J y ratones C57/BL6 (WT) suplementados con DHA o vehículo.

1. Examinar si existen diferencias en el peso del cerebro.

2. Evaluar el contenido de cofilina y p-cofilina, y sinaptopodina.
3. Realizar un análisis *in silico* de sitios de unión de factores transcripción, que responden a DHA, a los promotores de los genes que codifican para cofilina y sinaptopodina.
4. Determinar la densidad de espinas dendríticas en segmentos de neuronas piramidales de la CPF.

6. Metodología

6.1 Animales

Para evaluar el efecto de la suplementación con DHA en los ratones con fenotipo autista se establecieron los siguientes grupos:

- C58/J (fenotipo autista) con vehículo (EtOH 5% + Sacarosa 3%)
- C57/BL6 (control) con vehículo (EtOH 5% + Sacarosa 3%)
- C58/J con suplementación (250mg/kg DHA + veh)
- C57/BL6 con suplementación (250mg/kg DHA + veh)

Los animales fueron alojados en un sistema 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 12:12h) en cama de aserrín esterilizado (ENVIGO). Recibieron una dieta comercial peletizada (TG rodent diet T2018S.15, ENVIGO) y agua ad libitum de un sistema de agua automatizado. A partir de la sexta semana de vida se les administró el tratamiento a todos los grupos durante cuatro semanas. Los animales fueron sacrificados a las 10 semanas de edad mediante decapitación (de acuerdo con los Lineamientos para la Eutanasia en Animales 2013), y posteriormente se extrajeron y pesaron los cerebros.

6.2 Cuantificación de proteínas

6.2.1 Disección de la corteza prefrontal y obtención de proteínas

Para analizar los cambios en el contenido de las proteínas de citoesqueleto, se obtuvo la CPF de cada cría de acuerdo con el atlas de Paxinos y Franklin (2013). Éstas fueron homogeneizadas en 500 μl de buffer de lisis (RIPA) con inhibidor de proteasas. El

homogeneizado se centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C para obtener las proteínas totales, las cuales fueron cuantificadas usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific Inc., Delaware, USA). Los homogeneizados se guardaron en congelación hasta su uso.

6.2.2 Electroforesis y Western Blot

Las muestras (100µg) fueron adicionadas con buffer Laemmli y se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, se separaron por peso molecular en geles desnaturalizantes SDS-PAGE de acrilamida al 15% para cofilina y p-cofilina y al 10% para SYNPO a 80 mV. En el primer carril se agregó un marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad, California, USA). Los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa previamente activada con MeOH en una cámara semihúmeda. Se bloquearon las membranas con una solución de leche descremada al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se incubaron con anticuerpos primarios específicos durante toda la noche a 4°C. Una vez terminada la incubación, las membranas se reincubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) durante 40 minutos a temperatura ambiente y en agitación. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia (SuperSignal™ West ThermoScientific, Massachusetts, EUA) registrada por autorradiografía.

Para evaluar el control de carga, se disociaron los complejos antígeno-anticuerpo usando glicina ácida (pH 2.5) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación (técnica de stripping). Las membranas fueron nuevamente bloqueadas como se describió previamente y se incubaron con anticuerpo primario anti- α tubulina a 4°C durante toda la noche. Después, la membrana se reincubó con anticuerpo secundario específico durante 40 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Las placas se revelarán con el método previamente descrito.

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

6.2.3 Densitometría y análisis estadístico

Las bandas obtenidas se analizaron mediante densitometría usando el programa ImageJ 1.8. Los resultados de la densitometría fueron evaluados con el programa estadístico GraphPad Prism 8.0.2 realizando ANOVA de una vía, seguida de una prueba Tukey post hoc. Los valores de $p < 0.05$ serán considerados significativos.

6.3 Análisis *in silico* de factores de transcripción para ABPs

Las secuencias de los promotores para los genes de ratón que codifican para las proteínas cofilina y sinaptopodina se obtuvieron de la base de datos *e!Ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>) (Hunt et al., 2018). Ésta secuencias fueron posteriormente analizadas en la base de datos de Algorithmic Genetics Groups (ALGGEN) de promotores (<http://alggen.lsi.upc.es/>) (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002) para buscar posibles sitios de unión para los factores de transcripción CREB y el complejo PPAR-RXR. Los resultados fueron filtrados para obtener un mínimo de 85% de similitud en los sitios de unión.

6.4 Análisis de la densidad de espinas dendríticas

6.4.1 Tinción de Golgi-Cox

Para llevar a cabo el conteo y clasificación de las espinas dendríticas, se llevó a cabo la tinción de Golgi-Cox. Ésta es un conjunto de técnicas donde se lleva a cabo una fijación con sales dicrómicas, seguida por la exposición a sales metálicas o plúmbicas que se depositan, formando un fijado característico que marca los cuerpos celulares y sus prolongaciones (Alonso, 1994). Una vez extraídos los cerebros, estos serán teñidos con el FD Rapid Golgi Stain Kit (FD NeuroTechnologies, Inc.) bajo los lineamientos del manual del usuario. La tinción, basada en la técnica de Golgi-Cox descrita por Glaser y Van der Loos (1981) y Ramón-Moliner (1970), consiste en una solución de impregnación compuesta por dicromato de potasio, cromato de potasio y cloruro de mercurio (Koyama & Tohyama, 2012). Cada cerebro fue sumergido en 3 ml de la solución de impregnación preparada con una mezcla de volúmenes iguales de la solución A y B (cloruro de mercurio, cromato de potasio y dicromato de potasio). Después de 24 horas, la solución se reemplazó por solución fresca y los cerebros se almacenaron durante 2 semanas a 25°C en la oscuridad. Posteriormente los cerebros fueron sumergidos en la solución C (contenido no especificado en el manual),

la cual fue reemplazada por solución fresca después de 24 horas, y se almacenaron por una semana más bajo las mismas condiciones.

6.4.2 Corte en criostato

Los cerebros se precongelaron con hielo seco y se fijaron a la platina con FSC 22 el cual es un compuesto de inclusión base agua, usado en los cortes por congelación y la temperatura del criostato se fijó en -25°C para comenzar los cortes por congelación. La corteza prefrontal de los cerebros (bregma 3.17, 1.97 mm) se cortó en rebanadas de $70\mu\text{m}$ de acuerdo con el atlas de Paxinos y Franklin (2013).

Los cortes fueron montados con ayuda de pinceles en portaobjetos de microscopio cubiertos con gelatina (2.5 g grenetina; 0.2 g $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ /500ml). Cada corte fue enmarcado con plumón hidrofóbico (Super Pap Pen, BioCare Medical, USA) y se llevó a cabo el revelado de la tinción cubriendo las rebanadas con una mezcla de las soluciones D, E y agua Milli-Q en una proporción 1:1:2 (contenido no especificado en el manual). Las muestras se lavaron con agua Milli-Q, después se dejarán secar naturalmente y serán protegidas con resina y cubreobjetos.

6.4.3 Determinación de la densidad de espinas dendríticas

Se seleccionaron 20 neuronas piramidales en la capa II/III de la CPF (bregma 3.17 a 2.93 mm) de cada cepa, que estuvieran completamente teñidas con la dendrita apical bien identificable y lo más aisladas posible de otras neuronas para que sus procesos fueran claros y evitar ruido durante el análisis. Las imágenes se adquirieron usando un microscopio Olympus BX51-WI -DSU (Disk Scanning Unit) (Tokyo, JP.; Objective Microscope: 100X) acoplado al software Stereoinvestigator 9® software (MBF Bioscience, VT, US), que permite obtener una serie de imágenes en z-stack (con una distancia de $2\mu\text{m}$ entre imágenes) de las secciones apical y basales de las neuronas.

Se seleccionaron 6 segmentos dendríticos de $25\mu\text{m}$ de las dendritas apical y basales. Las dendritas serán clasificadas en apicales y basales, y se realizó un conteo manual del área proximal ($<40\mu\text{m}$ del soma) y distal ($>40\mu\text{m}$ del soma) tanto de la dendrita apical como de las dendritas basales para obtener una muestra representativa de las espinas del árbol dendrítico de cada neurona. Se analizaron un total de 12 segmentos dendríticos por neurona y cada espina se contará de forma manual.

7. Resultados

7.1 Peso corporal y del cerebro

Se extrajeron los cerebros de ratones macho adultos de entre 8 y 10 semanas, C58/J y sus controles C57BL/6 con y sin suplementación con DHA. Éstos fueron pesados y se encontró que tanto el factor tratamiento ($F_{1,19}=28.77$, $p<0.05$) como el factor fenotipo ($F_{1,19}=126.1$, $p<0.05$) tienen una relación significativa con el peso del cerebro; sin embargo, no se encontró una significancia estadística en la interacción de ambos factores. Los cerebros de ratones con fenotipo autista pesan menos en comparación con los ratones silvestres ($p<0.05$). Asimismo, se encontró que la suplementación con DHA aumenta el peso de los ratones vehículo de ambas cepas ($p<0.05$). Es importante destacar que no hay diferencias significativas entre los grupos WT-Veh y A-DHA (Fig. 6).

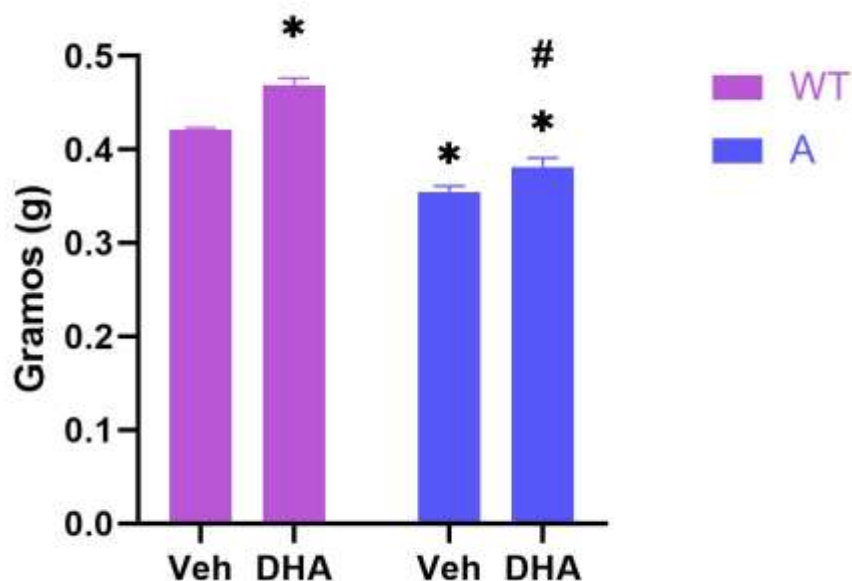


Figura 6. Efecto de la suplementación con DHA sobre el peso del cerebro de ratones C57BL/6 y C58/J entre 8 y 10 semanas de edad. Cepa silvestre (WT) y cepa con fenotipo autista (A). Peso del cerebro (g) de ratones machos WT y A con vehículo o suplementados con DHA. Los resultados se expresan como media \pm

EE, n=6. ANOVA de dos vías: Tratamiento ($F_{1,19}=28.77$, $p<0.05$); Fenotipo ($F_{1,19}=126.1$, $p<0.05$); * $p<0.05$ vs WT Veh; # $p<0.05$ vs A Veh.

Aunque no se registró el peso corporal de los ratones, para evaluar el promedio de éste en la cepa WT y A usando datos obtenidos de varios estudios recopilados a través de "Mouse Phenome Database" (MDB, RRID:SCR_003212) de *The Jackson Laboratory* (<https://www.phenome.jax.org/>). Se obtuvieron datos de 194 ratones adultos de entre 7 y 16 semanas de edad de la cepa C57BL/6 (n=144) y C58/J (n=50). Como podemos observar en la figura 7, Los ratones con fenotipo autista tienen un menor peso corporal en comparación con la cepa silvestre.

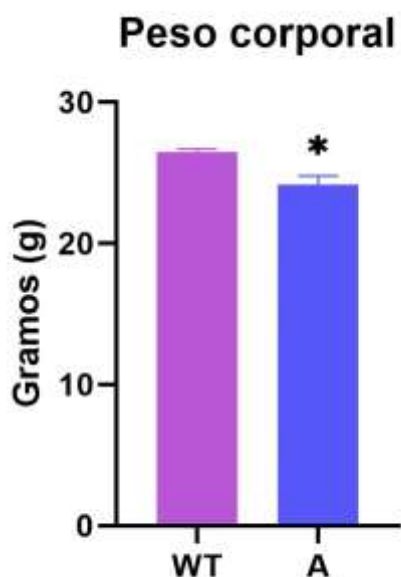


Figura 7. Peso corporal de ratones C57BL/6 y C58/J entre 7 y 16 semanas de edad. Cepa silvestre (WT) y cepa con fenotipo autista (A). Peso corporal (g) de ratones machos WT y A. Los resultados se expresan como media \pm EE, n=285. Prueba de t: * $p<0.05$ vs WT.

7.2 Expresión de las proteínas del citoesqueleto

Para estudiar si el tratamiento con DHA modifica la expresión de ABPs expresadas en las espinas dendríticas, se realizó un Western Blot (Fig. 8A).

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de cofilina (Fig. 8C) ni entre cepas ni con el tratamiento, aunque se observa una tendencia a incrementar cuando los ratones son suplementados con DHA. Al realizar un análisis de varianza de dos vías, se

encontró que la interacción de los factores cepa y tratamiento son significativamente relevantes para el nivel de expresión de p-cofilina ($F_{(1,8)}=11.59$, $p<0.05$). Aunque no se observan cambios entre la cepa con fenotipo autista y la cepa silvestre en la cantidad de cofilina fosforilada, sí se observa un incremento de ésta en los ratones C58/J con el tratamiento ($p<0.05$) (Fig. 8B) También se calculó el índice del contenido de cofilina con actividad despolimerizante determinando el radio p-Cof/Cof, sin embargo, no se observaron diferencias entre grupos (Fig. 8D).

Por su parte, se encontró que los ratones neurotóxicos tratados con DHA incrementan la expresión de SYNPO ($p<0.05$). No obstante, estos cambios no se observan en la cepa C58/J con fenotipo autista (Fig. 9).

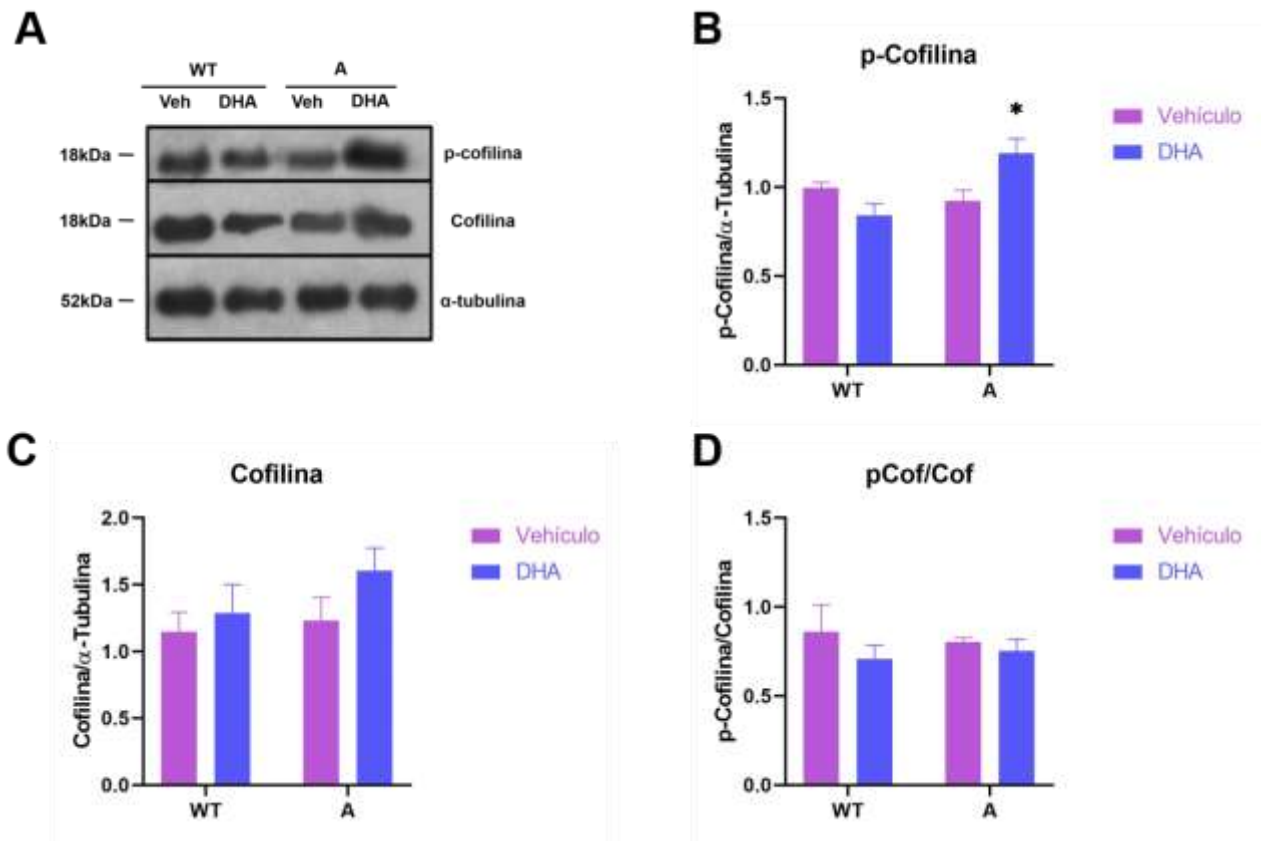


Figura 8. Expresión de cofilina y p-cofilina en la CPF de ratones suplementados y no suplementados con DHA en la CPF. Cepa silvestre (WT), cepa con fenotipo autista (A) con vehículo (lila) o suplementación con DHA (azul). A. Western Blot representativo. B. Expresión de p-cofilina. C. Expresión de cofilina. D. Relación de p-cofilina/cofilina. Los resultados se expresan como media \pm EE, n=5. NOVA de dos vías: p-Cofilina ($F_{(1,8)}=11.59$, $p<0.05$); * $p<0.05$ vs A-Veh.

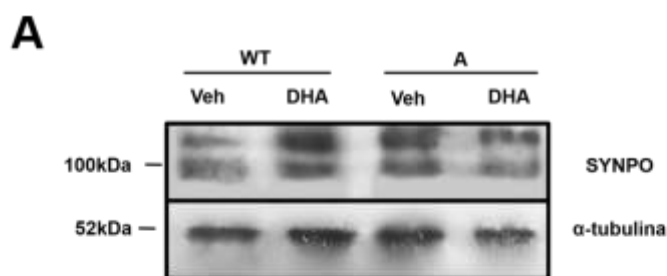
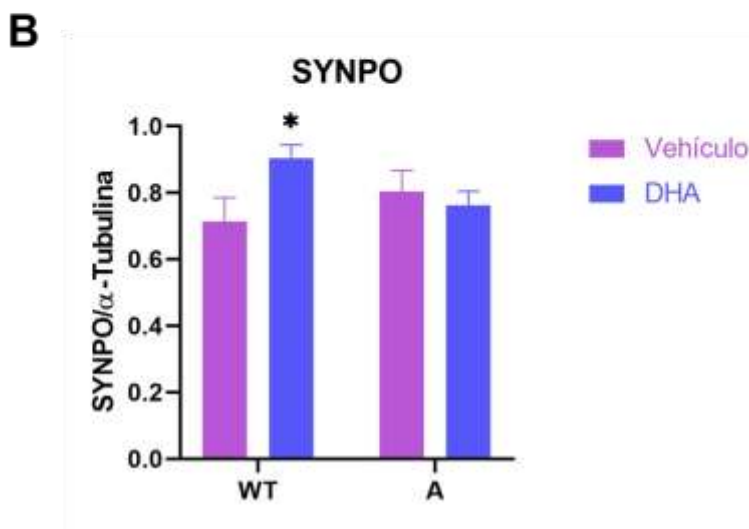


Figura 9. Expresión de sinaptopodina en la CPF de ratones suplementados y no suplementados con DHA en la CPF.

Cepa silvestre (WT), cepa con fenotipo autista (A) con vehículo (lila) o suplementación con DHA (azul). A. Western Blot representativo. B. Expresión de sinaptopodina. Los resultados se expresan como media \pm EE, n=8. ANOVA de dos vías: *p<0.05 VS WT-Veh.



7.3 Análisis *in silico* de factores de transcripción

Para evaluar si los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de ABPs podría estar relacionado con diferencias en la activación de vías de señalización activadas por DHA, se realizó un análisis *in silico* de posibles sitios de unión a promotores de los genes codificantes para cofilina y SYNPO para factores de transcripción activados por la vía de señalización de los GPRs 40 y 120, CREB y PPAR-RXR (Fig. 12).

Se encontró que tanto la subunidad α como la subunidad β de RXR tienen sitios de unión al promotor de cofilina en las regiones 395-403 y 398-407, con una similitud >90% >95%, respectivamente. Sin embargo, no se encontró similitud con ningún otro de los factores seleccionados (Fig. 10).

Por su parte el promotor para SYNPO tiene sitios de unión para CREB en la región 575-583 con un porcentaje de similitud >95%, así como sitios de unión para el complejo PPAR α -RXR α en la región 398-407 con una similitud >90% y PPAR γ -RXR α en la región 395-403 con una similitud >85% (Fig. 11).

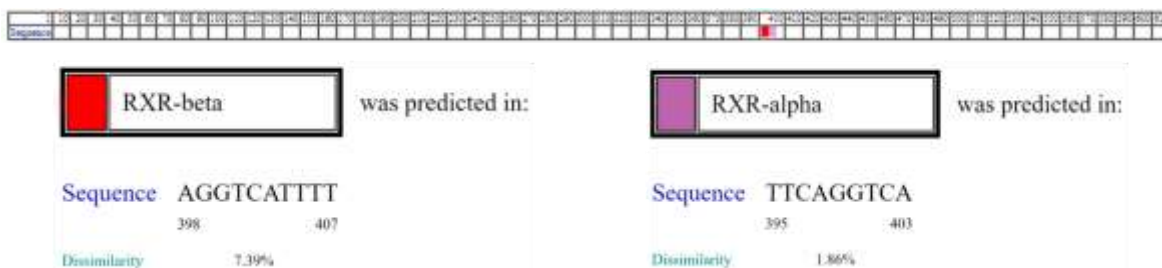


Figura 10. Sitios de unión de factores de transcripción al promotor del gen Cof. ■ RXR- β ■ (similaridad >90%), RXR- α (similaridad >95%).

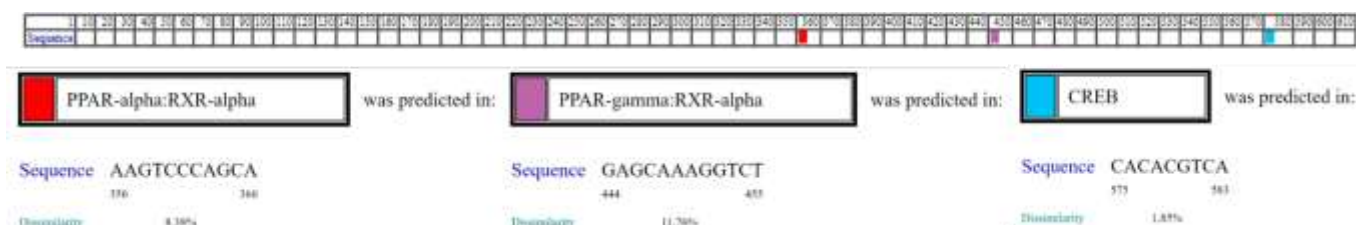


Figura 11. Sitios de unión de factores de transcripción al promotor del gen SYNPO. ■ PPAR- α :RXR- α ■ (similaridad>90%), ■ PPAR γ -RXR α (similaridad>85%), CREB (similaridad>95%).

7.4 Densidad de las espinas dendríticas

Al evaluar la densidad de espinas dendríticas en dendrita apicales y basales de neuronas piramidales de la capa II/III de la CPF de la cepa C57BL/6 y C58/J se encontró que existe una menor densidad apicales, pero no así en las neuronas piramidales de la capa II/III de la CPF los ratones con fenotipo autista en comparación con los ratones neurotípicos (Fig. 12A-C). Al realizar un análisis comparativo de la densidad de las espinas dendríticas con

base en la clasificación de dendritas y su distancia a partir del soma, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 12 D)

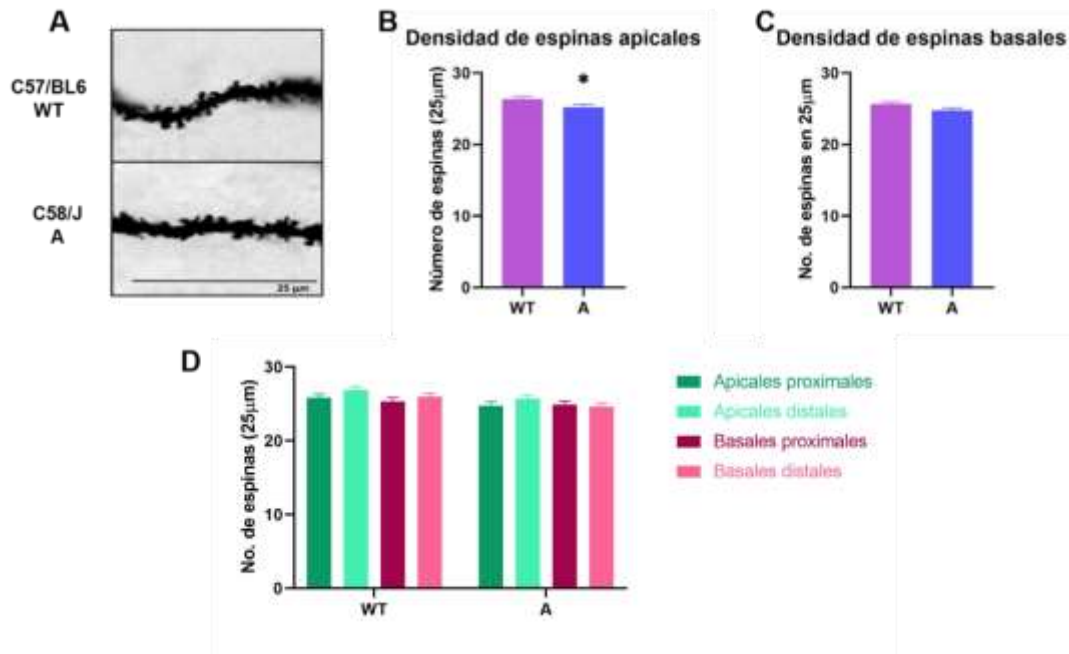


Figura 12. Densidad de las espinas dendríticas de neuronas piramidales de la capa II/III de la CPF. Cepa silvestre (WT), cepa con fenotipo autista (A). A. Imagen representativa de la densidad de espinas dendríticas. B. Densidad de las espinas dendríticas en las dendritas apicales. C. Densidad de las dendríticas en las dendritas basales. D. Densidad de las espinas dendríticas por tipo y distancia. Los resultados se expresan como media \pm EE, N=4, n=120. Prueba de t: * $p < 0.05$ vs WT.

8. Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos al analizar el peso del cerebro de ambas cepas con y sin tratamiento, se encontró un aumento en el peso de éste en ambas cepas al ser tratadas con DHA. Es importante resaltar que no existen diferencias significativas entre los grupos WT-Veh y A-DHA, por lo que se propone que el tratamiento con DHA podría tener efecto sobre el peso del cerebro de forma que este sea equiparable con el de los ratones silvestres. datos obtenidos en “The Mouse Phenome Database” (MPD, RRID:SCR_003212), el peso corporal de los ratones C58/J es menor en comparación con los ratones C57/BL6, lo que podría explicar la diferencia observada en el peso del cerebro de estas mismas cepas. Por otro lado, se observa un incremento en el peso del cerebro

cuando ambas cepas son tratadas con DHA. Aunque estos datos nos dan un primer acercamiento a la diferencia en el peso de corporal y cerebral de las cepas aquí comparadas, es necesario realizar un análisis del peso relativo del cerebro para poder descartar o asegurar que las diferencias observadas son debidas el peso total de los ratones y no exclusivos de la masa encefálica.

En nuestro grupo de investigación se ha encontrado que en cultivos primarios de hipocampo de ratones con fenotipo autista hay una menor expresión de receptores GPR40, mientras que los GPR120 no se modifica en relación con la cepa C57/BL6 (Guzmán-Vázquez, en preparación), también se observó que Akt aumenta su fosforilación después del tratamiento con DHA en la cepa C58J en relación con la cepa neurotípica C57BL6, sugiriendo diferencias en las vías de señalización iniciadas por estos receptores. La activación de estos receptores por DHA puede inducir vías de señalización como PI3K/AKT o la vía de las Rho GTPasas, que culminan en la fosforilación de ABPs y MAPs, promoviendo así el rearrreglo del citoesqueleto neuronal (Amano et al., 2010; Govek et al., 2005; Luo, 2000). Hasta ahora no sabemos cómo es la expresión de estos receptores en la corteza prefrontal ni cómo funcionan las cascadas de señalización que estos inducen. Por lo anterior, es posible que la suplementación con DHA en la cepa C58/J pueda activar cascadas de señalización en la CPF que promuevan la inactivación de la cofilina mediante su fosforilación. Por otro lado, aunque no se observan diferencias significativas en el contenido de cofilina total, se aprecia una tendencia incrementar, por lo que el aumento del contenido de p-cofilina podría deberse a un aumento de la proteína total. Para determinar si las diferencias de la cofilina total son significativas, se sugiere aumentar el número de sujetos. Es interesante notar que en los ratones neurotípicos no se observan diferencias incluso al ser suplementados con DHA. Esto es de suma relevancia pues, aunque no existan diferencias significativas en la relación p-cofilina/cofilina, el incremento en la cofilina total podría tener efectos sobre procesos como el crecimiento de neuritas (Flynn et al., 2012) y el establecimiento de la polaridad neuronal (Garvalov et al., 2007).

Aunque se observó que la suplementación con DHA incrementa el contenido de SYNPO en los ratones silvestres, este efecto no ocurrió en la cepa con fenotipo autista. Esto puede deberse a que existe una activación diferencial de AKT entre la cepa C57/BL6 y la cepa C58/J tras ser estimuladas con DHA que podría deberse al decremento en la expresión del receptor GPR40 en los ratones con fenotipo autista (Guzmán-Vázquez, en preparación).

Como se observa en la Fig.13, los cambios en la vía de señalización de los GPRs 40 y 120 podría conllevar a cambios en la transcripción de genes con promotores con sitios de unión a los factores de transcripción PPAR-RXR y CREB (Brown et al., 2005; Khan & Vanden Heuvel, 2003; Willson et al., 2000). La disfunción de PPAR α (D'Agostino et al., 2015) y γ (Ghaleiha et al., 2015) ha sido previamente relacionado con el TEA (Barone et al., 2019), además podría provocar alteraciones en diferentes procesos neuronales como la polaridad axonal (Quintanilla et al., 2013), el crecimiento de neuritas (Miglio et al., 2009) y la plasticidad neuronal (Kariharan et al., 2015). De acuerdo con los resultados de los análisis *in silico*, de las proteínas analizadas en el presente trabajo, únicamente se vería afectada la expresión de SYNPO y no así de cofilina pues su promotor no cuenta con sitios de unión para los factores de transcripción involucrados en esta vía.

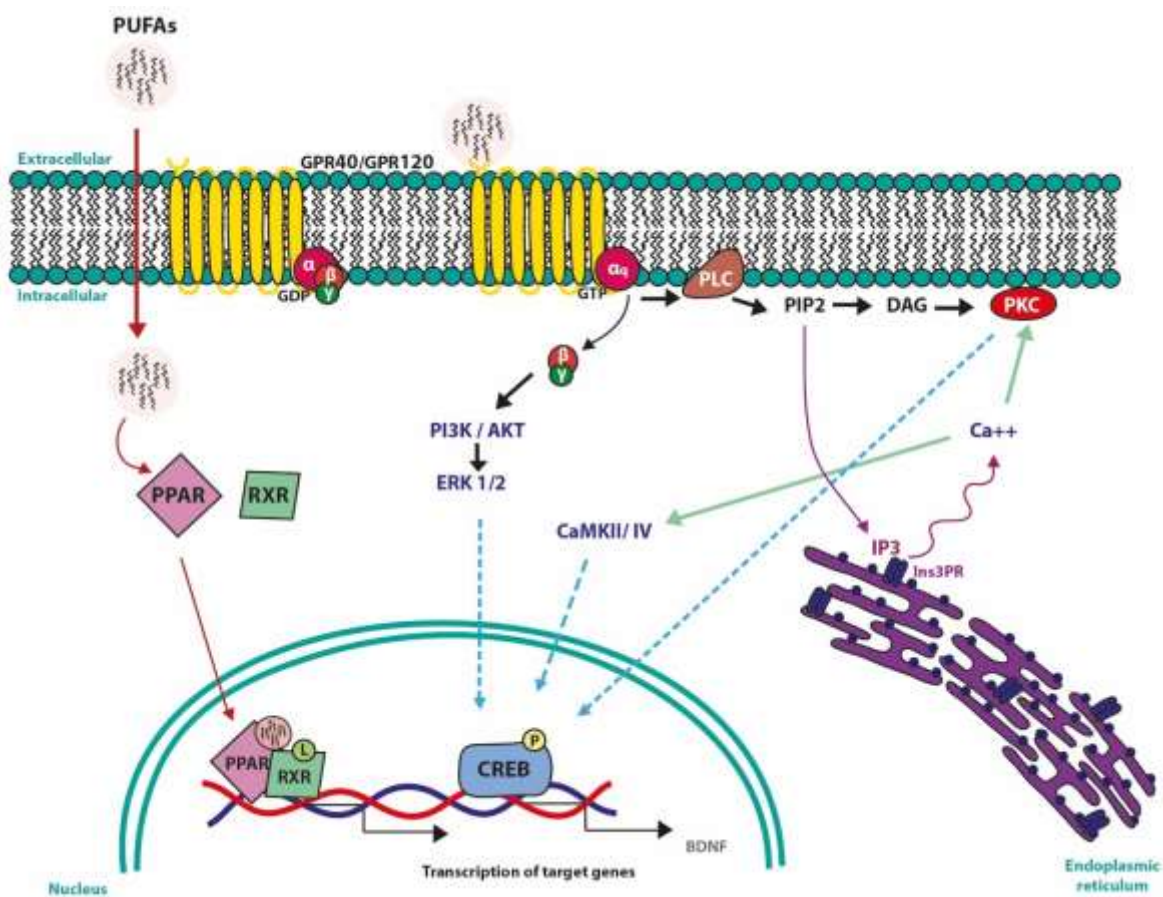


Figura 13. Vías de señalización de GPRs 40/120, activados por la estimulación con DHA. *Reproducida de Barón-Mendoza & González-Arenas, 2020.

Aunque no se encontraron diferencias por el tipo de dendritas ni la distancia a partir de soma, se observó que la cepa C58/J tiene una densidad de espinas dendríticas apicales menor que la cepa C57/BL6. Al ser el sitio primario de contacto sináptico, en conjunto con los cambios en la complejidad del árbol dendrítico observados en las neuronas piramidales de la capa II/III de la CPF de los ratones C58/J (Barón-Mendoza et al., 2019), se propone que podría existir un cambio en los patrones de conectividad de estos ratones. Sería necesario realizar experimentos de electrofisiología para comprobar o rechazar esta hipótesis. Se espera que, al evaluar ambas cepas suplementadas, esta diferencia ya no se observe o que ya no sea significativa. No obstante, debemos recordar que el incremento de la densidad de las espinas dendríticas no es único ni suficiente para asegurar la funcionalidad de las sinapsis, ya que ésta depende en gran medida de la morfología y, por lo tanto, de la maduración de ellas (Tashiro & Yuste, 2003; Yoshihara et al., 2009).

9. Conclusiones

- La suplementación con DHA incrementa el peso del cerebro de ratones C57/BL6 y C58/J.
- Los datos recopilados en MPD sugieren que el peso total de los ratones C57/BL6 es mayor que el de la cepa C58/J.
- El contenido de cofilina fosforilada incrementa en los ratones C58/J al ser suplementados con DHA.
- Aunque no se encontraron diferencias significativas, se aprecia que la cofilina total tiende a incrementar en los ratones con fenotipo autista al ser suplementados con DHA.
- El tratamiento con DHA incrementa el contenido de sinaptopodina en los ratones de la cepa C57/BL6, no así en la cepa C58/J.
- La densidad de espinas dendríticas de la cepa C58/J es menor en comparación con la cepa C57/BL6.

10. Perspectivas

- Realizar un registro del peso relativo del cerebro de las cepas C57/BL6 y C58/J para comprobar los resultados obtenidos en MDB.
- Realizar el conteo de las espinas dendríticas de ambos grupos suplementados con DHA.

11. Referencias

000669—C58/J. (s/f). Recuperado el 11 de mayo de 2020, de <https://www.jax.org/strain/000669>

A knowledgebase for the genetic evidence of autism spectrum disorder. (s/f). Recuperado el 11 de mayo de 2020, de http://db.cbi.pku.edu.cn/autismkb_v2/index.php

Adegbola, A., Gao, H., Sommer, S., & Browning, M. (2008). A novel mutation in JARID1C/SMCX in a patient with autism spectrum disorder (ASD). *American journal of medical genetics Part A*, 146(4), 505–511.

Ajram, L. A., Horder, J., Mendez, M. A., Galanopoulos, A., Brennan, L. P., Wichers, R. H., Robertson, D. M., Murphy, C. M., Zinkstok, J., Ivin, G., Heasman, M., Meek, D., Tricklebank, M. D., Barker, G. J., Lythgoe, D. J., Edden, R. A. E., Williams, S. C., Murphy, D. G. M., & McAlonan, G. M. (2017). Shifting brain inhibitory balance and connectivity of the prefrontal cortex of adults with autism spectrum disorder. *Translational Psychiatry*, 7(5), e1137. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.104>

Allen-Brady, K., Cannon, D., Robison, R., McMahon, W. M., & Coon, H. (2010). A unified theory of autism revisited: Linkage evidence points to chromosome X using a high-risk subset of AGRE families. *Autism Research*, 3(2), 47–52.

Alonso, J. R. (1994). *Los métodos de Golgi* (1. ed). Ediciones Universidad de Salamanca.

Amano, M., Nakayama, M., & Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*, 67(9), 545–554. <https://doi.org/10.1002/cm.20472>

Amaral, D. G., & Price, J. (1984). Amygdalo-cortical projections in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Journal of Comparative Neurology*, 230(4), 465–496.

Amaral, D. G., Schumann, C. M., & Nordahl, C. W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends in neurosciences*, 31(3), 137–145.

- American Psychiatric Association (Ed.). (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5* (5th ed). American Psychiatric Association.
- Amminger, G. P., Berger, G. E., Schäfer, M. R., Klier, C., Friedrich, M. H., & Feucht, M. (2007). Omega-3 Fatty Acids Supplementation in Children with Autism: A Double-blind Randomized, Placebo-controlled Pilot Study. *Biological Psychiatry*, *61*(4), 551–553. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.05.007>
- Arnold, A. P. (2009). Mouse models for evaluating sex chromosome effects that cause sex differences in non-gonadal tissues. *Journal of neuroendocrinology*, *21*(4), 377–386.
- Arnold, A. P., & Chen, X. (2009). What does the “four core genotypes” mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Frontiers in neuroendocrinology*, *30*(1), 1–9.
- Auguste, S., Fiset, A., Fernandes, M. F., Hryhorczuk, C., Poitout, V., Alquier, T., & Fulton, S. (2016). Central Agonism of GPR120 Acutely Inhibits Food Intake and Food Reward and Chronically Suppresses Anxiety-Like Behavior in Mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *19*(7), pyw014. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw014>
- Aziz, A., Harrop, S. P., & Bishop, N. E. (2011). DIA1R is an X-linked gene related to Deleted In Autism-1. *PLoS One*, *6*(1).
- Bachevalier, J., Meunier, M., Lu, M., & Ungerleider, L. G. (1997). Thalamic and temporal cortex input to medial prefrontal cortex in rhesus monkeys. *Experimental brain research*, *115*(3), 430–444.
- Bakos, J., Bacova, Z., Grant, S. G., Castejon, A. M., & Ostatnikova, D. (2015). Are Molecules Involved in Neuritogenesis and Axon Guidance Related to Autism Pathogenesis? *NeuroMolecular Medicine*, *17*(3), 297–304. <https://doi.org/10.1007/s12017-015-8357-7>
- Barbas, H., & De Olmos, J. (1990). Projections from the amygdala to basoventral and mediodorsal prefrontal regions in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*, *300*(4), 549–571.
- Barbas, Helen, & Mesulam, M. (1981). Organization of afferent input to subdivisions of area 8 in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*, *200*(3), 407–431.
- Barbas, Helen, Zikopoulos, B., & Timbie, C. (2011). Sensory pathways and emotional context for action in primate prefrontal cortex. *Biological psychiatry*, *69*(12), 1133–1139.
- Barnea-Goraly, N., Kwon, H., Menon, V., Eliez, S., Lotspeich, L., & Reiss, A. L. (2004). White matter structure in autism: Preliminary evidence from diffusion tensor imaging. *Biological Psychiatry*, *55*(3), 323–326. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.022>

- Barone, R., Rizzo, R., Tabbi, G., Malaguarnera, M., Frye, R. E., & Bastin, J. (2019). Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) as Therapeutic Targets of Resveratrol for Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1878. <https://doi.org/10.3390/ijms20081878>
- 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, 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, 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, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.004>
- Bauman, M. D., Crawley, J. N., & Berman, R. F. (2019). Autism: Animal Models. En *ELS* (pp. 1–22). American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022368.pub2>
- Benevento, L., & Fallon, J. H. (1975). The ascending projections of the superior colliculus in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Journal of Comparative Neurology*, 160(3), 339–361.
- Bent, S., Bertoglio, K., Ashwood, P., Bostrom, A., & Hendren, R. L. (2011). A Pilot Randomized Controlled Trial of Omega-3 Fatty Acids for Autism Spectrum Disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 41(5), 545–554. <https://doi.org/10.1007/s10803-010-1078-8>
- Bey, A. L., & Jiang, Y. (2014). Overview of Mouse Models of Autism Spectrum Disorders. *Current Protocols in Pharmacology*, 66(1), 5.66.1-5.66.26. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0566s66>
- Bishop, D. V., Jacobs, P. A., Lachlan, K., Wellesley, D., Barnicoat, A., Boyd, P. A., Fryer, A., Middlemiss, P., Smithson, S., & Metcalfe, K. (2011). Autism, language and communication in children with sex chromosome trisomies. *Archives of disease in childhood*, 96(10), 954–959.
- Bishop, D. V. M., Canning, E., Elgar, K., Morris, E., Jacobs, P. A., & Skuse, D. H. (2000). Distinctive patterns of memory function in subgroups of females with Turner syndrome: Evidence for imprinted loci on the X-chromosome affecting neurodevelopment. *Neuropsychologia*, 38(5), 712–721. [https://doi.org/10.1016/S0028-3932\(99\)00118-](https://doi.org/10.1016/S0028-3932(99)00118-9)

- 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>
- Boucher, O., Burden, M. J., Muckle, G., Saint-Amour, D., Ayotte, P., Dewailly, E., Nelson, C. A., Jacobson, S. W., & Jacobson, J. L. (2011). Neurophysiologic and neurobehavioral evidence of beneficial effects of prenatal omega-3 fatty acid intake on memory function at school age. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(5), 1025–1037. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000323>
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9), 551–563. <https://doi.org/10.1038/nrn3992>
- Bradbury, J. (2011). Docosahexaenoic Acid (DHA): An Ancient Nutrient for the Modern Human Brain. *Nutrients*, 3(5), 529–554. <https://doi.org/10.3390/nu3050529>
- Broek, J. A., Guest, P. C., Rahmoune, H., & Bahn, S. (2014). Proteomic analysis of post mortem brain tissue from autism patients: Evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins. *Molecular Autism*, 5(1), 41. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-41>
- Brown, A. J., Jupe, S., & Briscoe, C. P. (2005). A Family of Fatty Acid Binding Receptors. *DNA and Cell Biology*, 24(1), 54–61. <https://doi.org/10.1089/dna.2005.24.54>
- Brumback, A. C., Ellwood, I. T., Kjaerby, C., Iafrati, J., Robinson, S., Lee, A. T., Patel, T., Nagaraj, S., Davatolhagh, F., & Sohal, V. S. (2018). Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. *Molecular Psychiatry*, 23(10), 2078–2089. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.213>
- Carmichael, S., & Price, J. L. (1995). Sensory and premotor connections of the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. *Journal of Comparative Neurology*, 363(4), 642–664.
- Carper, R. A., & Courchesne, E. (2005). Localized enlargement of the frontal cortex in early autism. *Biological Psychiatry*, 57(2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.005>
- Casanova, M. F., van Kooten, I. A., Switala, A. E., van Engeland, H., Heinsen, H., Steinbusch, H. W., Hof, P. R., Trippe, J., Stone, J., & Schmitz, C. (2006). Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta neuropathologica*, 112(3), 287.
- Cavada, C., Compañy, T., Tejedor, J., Cruz-Rizzolo, R. J., & Reinoso-Suárez, F. (2000). The anatomical connections of the macaque monkey orbitofrontal cortex. A review. *Cerebral cortex*, 10(3), 220–242.

- Cavada, C., & Reinoso-Suárez, F. (1985). Topographical organization of the cortical afferent connections of the prefrontal cortex in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 242(3), 293–324.
- Chocholska, S., Rossier, E., Barbi, G., & Kehrer-Sawatzki, H. (2006). Molecular cytogenetic analysis of a familial interstitial deletion Xp22. 2-22.3 with a highly variable phenotype in female carriers. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 140(6), 604–610.
- Chung, R.-H., Ma, D., Wang, K., Hedges, D. J., Jaworski, J. M., Gilbert, J. R., Cuccaro, M. L., Wright, H. H., Abramson, R. K., & Konidari, I. (2011). An X chromosome-wide association study in autism families identifies TBL1X as a novel autism spectrum disorder candidate gene in males. *Molecular autism*, 2(1), 18.
- Cohen, I. L., Liu, X., Lewis, M., Chudley, A., Forster-Gibson, C., Gonzalez, M., Jenkins, E. C., Brown, W. T., & Holden, J. J. (2011). Autism severity is associated with child and maternal MAOA genotypes. *Clinical Genetics*, 79(4), 355–362.
- Correia, C., Coutinho, A., Sequeira, A., Sousa, I., Lourenco Venda, L., Almeida, J., Abreu, R., Lobo, C., Miguel, T., & Conroy, J. (2010). Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes, Brain and behavior*, 9(7), 841–848.
- Courchesne, E., Karns, C. M., Davis, H. R., Ziccardi, R., Carper, R. A., Tigue, Z. D., Chisum, H. J., Moses, P., Pierce, K., Lord, C., Lincoln, A. J., Pizzo, S., Schreibman, L., Haas, R. H., Akshoomoff, N. A., & Courchesne, R. Y. (2001). Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: An MRI study. *Neurology*, 57(2), 245–254. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.2.245>
- Courchesne, Eric, Mouton, P. R., Calhoun, M. E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M. J., Barnes, C. C., & Pierce, K. (2011). Neuron Number and Size in Prefrontal Cortex of Children With Autism. *JAMA*, 306(18), 2001–2010. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1638>
- Creswell, C. S., & Skuse, D. H. (1999). Autism in association with Turner syndrome: Genetic implications for male vulnerability to pervasive developmental disorders. *Neurocase*, 5(6), 511–518. <https://doi.org/10.1080/13554799908402746>
- D'Agostino, G., Cristiano, C., Lyons, D. J., Citraro, R., Russo, E., Avagliano, C., Russo, R., Raso, G. M., Meli, R., De Sarro, G., Heisler, L. K., & Calignano, A. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha plays a

- crucial role in behavioral repetition and cognitive flexibility in mice. *Molecular Metabolism*, 4(7), 528–536.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.04.005>
- De Vito, J. L., & Smith Jr, O. A. (1964). Subcortical projections of the prefrontal lobe of the monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 123(3), 413–423.
- Dean, M., Harwood, R., & Kasari, C. (2016). The art of camouflage: Gender differences in the social behaviors of girls and boys with autism spectrum disorder. *Autism*, 21(6), 678–689. <https://doi.org/10.1177/1362361316671845>
- Deller, T., Bas Orth, C., Del Turco, D., Vlachos, A., Burbach, G. J., Drakew, A., Chabanis, S., Korte, M., Schwegler, H., Haas, C. A., & Frotscher, M. (2007). A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 189(1), 5–16.
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2006.06.013>
- Deller, T., Korte, M., Chabanis, S., Drakew, A., Schwegler, H., Stefani, G. G., Zuniga, A., Schwarz, K., Bonhoeffer, T., Zeller, R., Frotscher, M., & Mundel, P. (2003). Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10494–10499.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1832384100>
- Deller, T., Mundel, P., & Frotscher, M. (2000). Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus*, 10(5), 569–581. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:5<569::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:5<569::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M)
- DiCicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Courchesne, E., Dager, S. R., Schmitz, C., Schultz, R. T., Crawley, J., & Young, L. J. (2006). The Developmental Neurobiology of Autism Spectrum Disorder. *Journal of Neuroscience*, 26(26), 6897–6906. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1712-06.2006>
- Eissa, N., Al-Houqani, M., Sadeq, A., Ojha, S. K., Sasse, A., & Sadek, B. (2018). Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 304.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00304>
- Ellegood, J., Anagnostou, E., Babineau, B. A., Crawley, J. N., Lin, L., Genestine, M., DiCicco-Bloom, E., Lai, J. K. Y., Foster, J. A., Peñagarikano, O., Geschwind, D. H., Pacey, L. K., Hampson, D. R., Laliberté, C. L., Mills, A. A., Tam, E., Osborne, L. R., Kouser, M., Espinosa-Becerra, F., ... 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>
- Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J. E., Roselló, L., Albà, M. M., & Messeguer, X. (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3651–3653.
- Fischer, M., Kaech, S., Wagner, U., Brinkhaus, H., & Matus, A. (2000). Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nature Neuroscience*, 3(9), 887–894. <https://doi.org/10.1038/78791>
- Flurkey, K. (Ed.). (2009). *The Jackson laboratory handbook of genetically standardized mice: Ask for the j* (6. ed., 1. printing). The Jackson Laboratory.
- Flynn, K. C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., Stern, S., Garvalov, B. K., Gurniak, C., Shaw, A. E., Meyn, L., Wedlich-Söldner, R., Bamberg, J. R., Small, J. V., Witke, W., & Bradke, F. (2012). ADF/Cofilin-Mediated Actin Retrograde Flow Directs Neurite Formation in the Developing Brain. *Neuron*, 76(6), 1091–1107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.038>
- Fombonne, E., Marcin, C., Manero, A. C., Bruno, R., Diaz, C., Villalobos, M., Ramsay, K., & Nealy, B. (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>
- Fuster, J. (2015). *The prefrontal cortex*. Academic Press.
- Garvalov, B. K., Flynn, K. C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamberg, J. R., & Bradke, F. (2007). Cdc42 Regulates Cofilin during the Establishment of Neuronal Polarity. *Journal of Neuroscience*, 27(48), 13117–13129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3322-07.2007>
- Geerts, M., Steyaert, J., & Fryns, J.-P. (2003). The XYY syndrome: A follow-up study on 38 boys. *Genetic counseling (Geneva, Switzerland)*, 14(3), 267–279.
- Geschwind, D. H. (2011). Genetics of autism spectrum disorders. *Trends in cognitive sciences*, 15(9), 409–416.
- Ghaleiha, A., Rasa, S. M., Nikoo, M., Farokhnia, M., Mohammadi, M.-R., & Akhondzadeh, S. (2015). A pilot double-blind placebo-controlled trial of pioglitazone as adjunctive treatment to risperidone: Effects on aberrant behavior in children with autism. *Psychiatry Research*, 229(1), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.07.043>

- Glaser, E. M., & Van der Loos, H. (1981). Analysis of thick brain sections by obverse—Reverse computer microscopy: Application of a new, high clarity Golgi—Nissl stain. *Journal of Neuroscience Methods*, 4(2), 117–125.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(81\)90045-5](https://doi.org/10.1016/0165-0270(81)90045-5)
- Govek, E.-E., Newey, S. E., & Aelst, L. V. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & Development*, 19(1), 1–49. <https://doi.org/10.1101/gad.1256405>
- Hertz-Picciotto, I., Croen, L. A., Hansen, R., Jones, C. R., Van de Water, J., & Pessah, I. N. (2006). The CHARGE study: An epidemiologic investigation of genetic and environmental factors contributing to autism. *Environmental health perspectives*, 114(7), 1119–1125.
- Hirsch, L. E., & Pringsheim, T. (2016). Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009043.pub3>
- Hrabovska, S. V., & Salyha, Yu. T. (2016). Animal Models of Autism Spectrum Disorders and Behavioral Techniques of their Examination. *Neurophysiology*, 48(5), 380–388. <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9613-2>
- Huerta, M. F., Krubitzer, L. A., & Kaas, J. H. (1987). Frontal eye field as defined by intracortical microstimulation in squirrel monkeys, owl monkeys, and macaque monkeys II. Cortical connections. *Journal of Comparative Neurology*, 265(3), 332–361.
- Hull, L., Petrides, K., & Mandy, W. (2020). The female autism phenotype and camouflaging: A narrative review. *Review Journal of Autism and Developmental Disorders*, 1–12.
- Hunt, S. E., McLaren, W., Gil, L., Thormann, A., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Parton, A., Armean, I. M., Trevanion, S. J., Flicek, P., & Cunningham, F. (2018). Ensembl variation resources. *Database*, 2018.
<https://doi.org/10.1093/database/bay119>
- Ilinsky, I., Jouandet, M., & Goldman-Rakic, P. (1985). Organization of the nigrothalamocortical system in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 236(3), 315–330.
- Infante, M., Sears, B., Rizzo, A. M., Mariani Cerati, D., Caprio, M., Ricordi, C., & Fabbri, A. (2020). Omega-3 PUFAs and vitamin D co-supplementation as a safe-effective therapeutic approach for core symptoms of autism spectrum disorder: Case report and literature review. *Nutritional Neuroscience*, 23(10), 779–790.
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1557385>

- Jacobson, S., Butters, N., & Tovsky, N. J. (1978). Afferent and efferent subcortical projections of behaviorally defined sectors of prefrontal granular cortex. *Brain Research*, 159(2), 279–296.
- Joensuu, M., Lanoue, V., & Hotulainen, P. (2018). Dendritic spine actin cytoskeleton in autism spectrum disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 84, 362–381.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.023>
- Johnson, T. N., Rosvold, H. E., & Mishkin, M. (1968). Projections from behaviorally-defined sectors of the prefrontal cortex to the basal ganglia, septum, and diencephalon of the monkey. *Experimental Neurology*, 21(1), 20–34.
- Jumah, F., Ghannam, M., Jaber, M., Adeeb, N., & Tubbs, R. S. (2016). Neuroanatomical variation in autism spectrum disorder: A comprehensive review: Neuroanatomical Variation in Autism Spectrum Disorder. *Clinical Anatomy*, 29(4), 454–465. <https://doi.org/10.1002/ca.22717>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of Neural Science* (5th Edition). McGraw-Hill.
- Kariharan, T., Nanayakkara, G., Parameshwaran, K., Bagasrawala, I., Ahuja, M., Abdel-Rahman, E., Amin, A. T., Dhanasekaran, M., Suppiramaniam, V., & Amin, R. H. (2015). Central activation of PPAR-gamma ameliorates diabetes induced cognitive dysfunction and improves BDNF expression. *Neurobiology of Aging*, 36(3), 1451–1461. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.028>
- Kelly, R. M., & Strick, P. L. (2004). Macro-architecture of basal ganglia loops with the cerebral cortex: Use of rabies virus to reveal multisynaptic circuits. En *Progress in brain research* (Vol. 143, pp. 447–459). Elsevier.
- Kemp, J. M., & Powell, T. P. S. (1971). The structure of the caudate nucleus of the cat: Light and electron microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 262(845), 383–401.
- Kentner, A. C., Bilbo, S. D., Brown, A. S., Hsiao, E. Y., McAllister, A. K., Meyer, U., Pearce, B. D., Pletnikov, M. V., Yolken, R. H., & Bauman, M. D. (2019). Maternal immune activation: Reporting guidelines to improve the rigor, reproducibility, and transparency of the model. *Neuropsychopharmacology*, 44(2), 245–258.
<https://doi.org/10.1038/s41386-018-0185-7>
- Kesler, S. R., Blasey, C. M., Brown, W. E., Yankowitz, J., Zeng, S. M., Bender, B. G., & Reiss, A. L. (2003). Effects of X-monosomy and X-linked imprinting on superior temporal gyrus morphology in Turner syndrome. *Biological Psychiatry*, 54(6), 636–646. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00289-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00289-0)

- Khan, S. A., & Vanden Heuvel, J. P. (2003). Reviews: Current topics role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(10), 554–567.
[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(03\)00098-6](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(03)00098-6)
- Kievit, J., & Kuypers, H. G. (1975). Subcortical afferents to the frontal lobe in the rhesus monkey studied by means of retrograde horseradish peroxidase transport. *Brain Research*, 85(2), 261–266.
- Kirby, A., Woodward, A., Jackson, S., Wang, Y., & Crawford, M. A. (2010a). A double-blind, placebo-controlled study investigating the effects of omega-3 supplementation in children aged 8–10 years from a mainstream school population. *Research in Developmental Disabilities*, 31(3), 718–730. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2010.01.014>
- Kirby, A., Woodward, A., Jackson, S., Wang, Y., & Crawford, M. A. (2010b). Childrens' learning and behaviour and the association with cheek cell polyunsaturated fatty acid levels. *Research in Developmental Disabilities*, 31(3), 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2010.01.015>
- Kitai, S., Kocsis, J., Preston, R., & Sugimori, M. (1976). Monosynaptic inputs to caudate neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain research*, 109(3), 601–606.
- Kuratko, C. N., Barrett, E. C., Nelson, E. B., & Salem, N. (2013). The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: A review. *Nutrients*, 5(7), 2777–2810.
<https://doi.org/10.3390/nu5072777>
- Lai, M.-C., Lombardo, M. V., & 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)
- Leonard, C. M. (1969). The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain research*, 12(2), 321–343.
- Llamas, A., Clasca, F., & Avendano, C. (1989). Amygdaloid innervation of the frontal cortex in cats. *Revista espanola de fisiologia*, 45, 139–149.
- Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. P. L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 56(6), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>
- Lotter, V. (1966). Epidemiology of autistic conditions in young children. *Social psychiatry*, 1(3), 124–135.

- Luo, L. (2000). RHO GTPASES in neuronal morphogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 173–180.
<https://doi.org/10.1038/35044547>
- Marcus, R. N., Owen, R., Kamen, L., Manos, G., McQuade, R. D., Carson, W. H., & Aman, M. G. (2009). A Placebo-Controlled, Fixed-Dose Study of Aripiprazole in Children and Adolescents With Irritability Associated With Autistic Disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 48(11), 1110–1119.
<https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e3181b76658>
- Martínez-Cerdeño, V., Maezawa, I., & Jin, L.-W. (2016). Dendrites in Autism Spectrum Disorders. En K. Emoto, R. Wong, E. Huang, & C. Hoogenraad (Eds.), *Dendrites* (pp. 525–543). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56050-0_20
- Matson, J. L., Sipes, M., Fodstad, J. C., & Fitzgerald, M. E. (2011). Issues in the Management of Challenging Behaviours of Adults with Autism Spectrum Disorder: *CNS Drugs*, 25(7), 597–606. <https://doi.org/10.2165/11591700-000000000-00000>
- Mazahery, H., Conlon, C. A., Beck, K. L., Mugridge, O., Kruger, M. C., Stonehouse, W., Camargo, C. A., Meyer, B. J., Tsang, B., Jones, B., & von Hurst, P. R. (2019). A Randomised-Controlled Trial of Vitamin D and Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in the Treatment of Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder in Children. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 49(5), 1778–1794. <https://doi.org/10.1007/s10803-018-3860-y>
- Mazahery, H., Stonehouse, W., Delshad, M., Kruger, M., Conlon, C., Beck, K., & von Hurst, P. (2017). Relationship between Long Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Autism Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control and Randomised Controlled Trials. *Nutrients*, 9(2), 155.
<https://doi.org/10.3390/nu9020155>
- McCracken, J. T., McGough, J., Shah, B., Cronin, P., Hong, D., Aman, M. G., Arnold, L. E., Lindsay, R., Nash, P., Hollway, J., McDougle, C. J., Posey, D., Swiezy, N., Kohn, A., Scahill, L., Martin, A., Koenig, K., Volkmar, F., Carroll, D., ... McMahon, D. (2002). Risperidone in Children with Autism and Serious Behavioral Problems. *New England Journal of Medicine*, 347(5), 314–321. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013171>
- McDonald, A. (1991). Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience*, 44(1), 1–14.

- McDougle, C. J., Holmes, J. P., Carlson, D. C., Pelton, G. H., Cohen, D. J., & Price, L. H. (1998). A Double-blind, Placebo-Controlled Study of Risperidone in Adults With Autistic Disorder and Other Pervasive Developmental Disorders. *Archives of General Psychiatry*, 55(7), 633. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.55.7.633>
- Meguid, N. A., Atta, H. M., Gouda, A. S., & Khalil, R. O. (2008). Role of polyunsaturated fatty acids in the management of Egyptian children with autism. *Clinical Biochemistry*, 41(13), 1044–1048. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.05.013>
- Meiri, G., Bichovsky, Y., & Belmaker, R. h. (2009). Omega 3 Fatty Acid Treatment in Autism. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 19(4), 449–451. <https://doi.org/10.1089/cap.2008.0123>
- Meltzer, A., & Van de Water, J. (2017). The role of the immune system in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 284–298.
- Messeguer, X., Escudero, R., Farre, D., Nunez, O., Martinez, J., & Alba, M. M. (2002). PROMO: Detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 18(2), 333–334. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.2.333>
- Micai, M., Caruso, A., Fatta, L. M., Fulceri, F., & Scattoni, M. L. (2019). Gender differences in high-functioning autism: Implications in everyday life and clinical settings. *Italian Journal of Gender-Specific Medicine*, 5(2), 90–97.
- Middleton, F. A., & Strick, P. L. (1994). Anatomical evidence for cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function. *Science*, 266(5184), 458–461.
- Miglio, G., Rattazzi, L., Rosa, A. C., & Fantozzi, R. (2009). PPAR γ stimulation promotes neurite outgrowth in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters*, 454(2), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.014>
- Monk, C. S., Peltier, S. J., Wiggins, J. L., Weng, S.-J., Carrasco, M., Risi, S., & Lord, C. (2009). Abnormalities of intrinsic functional connectivity in autism spectrum disorders. *NeuroImage*, 47(2), 764–772. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.04.069>
- Morecraft, R., Geula, C., & Mesulam, M. (1992). Cytoarchitecture and neural afferents of orbitofrontal cortex in the brain of the monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 323(3), 341–358.

- 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: Seminars in Medical Genetics*, 142C(1), 40–51. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30081>
- Mrzljak, L., Uylings, H. B., Van Eden, G. G., & Judáš, M. (1991). Neuronal development in human prefrontal cortex in prenatal and postnatal stages. En *Progress in brain research* (Vol. 85, pp. 185–222). Elsevier.
- Muehlmann, A. M., Edington, G., Mihalik, A. C., Buchwald, Z., Koppuzha, D., Korah, M., & Lewis, M. H. (2012). Further characterization of repetitive behavior in C58 mice: Developmental trajectory and effects of environmental enrichment. *Behavioural Brain Research*, 235(2), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.041>
- Mundel, P., Heid, H. W., Mundel, T. M., Krüger, M., Reiser, J., & Kriz, W. (1997). Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. *Journal of Cell Biology*, 139(1), 193–204. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.1.193>
- 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>
- Okubo-Suzuki, R., Okada, D., Sekiguchi, M., & Inokuchi, K. (2008). Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 38(2), 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.03.001>
- Öngür, D., & Price, J. (2000). The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral cortex*, 10(3), 206–219.
- Ooi, Y. P., Weng, S.-J., Jang, L. Y., Low, L., Seah, J., Teo, S., Ang, R. P., Lim, C. G., Liew, A., Fung, D. S., & Sung, M. (2015). Omega-3 fatty acids in the management of autism spectrum disorders: Findings from an open-label pilot study in Singapore. *European Journal of Clinical Nutrition*, 69(8), 969–971. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.28>
- Owen, R., Sikich, L., Marcus, R. N., Corey-Lisle, P., Manos, G., McQuade, R. D., Carson, W. H., & Findling, R. L. (2009). Aripiprazole in the Treatment of Irritability in Children and Adolescents With Autistic Disorder. *PEDIATRICS*, 124(6), 1533–1540. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-3782>
- Pandya, D. N., & Kuypers, H. G. (1969). Cortico-cortical connections in the rhesus monkey. *Brain research*, 13(1), 13–36.
- Pandya, D. N., & Yeterian, E. H. (1985). Architecture and connections of cortical association areas. En *Association and auditory cortices* (pp. 3–61). Springer.

- Parellada, M., Llorente, C., Calvo, R., Gutierrez, S., Lázaro, L., Graell, M., Guisasola, M., Dorado, M. L., Boada, L., Romo, J., Dulin, E., Sanz, I., Arango, C., & Moreno, C. (2017). Randomized trial of omega-3 for autism spectrum disorders: Effect on cell membrane composition and behavior. *European Neuropsychopharmacology*, 27(12), 1319–1330. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.08.426>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2013). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Persico, A. M., & Napolioni, V. (2013). Autism genetics. *Behavioural Brain Research*, 251, 95–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.012>
- Petrides, M., & Pandya, D. N. (1984). Projections to the frontal cortex from the posterior parietal region in the rhesus monkey. *Journal of Comparative neurology*, 228(1), 105–116.
- Pinel, J. P. J. (2012). *Biopsicología*. Pearson.
- Piton, A., Michaud, J. L., Peng, H., Aradhya, S., Gauthier, J., Mottron, L., Champagne, N., Lafreniere, R. G., Hamdan, F., & S2D team. (2008). Mutations in the calcium-related gene IL1RAPL1 are associated with autism. *Human molecular genetics*, 17(24), 3965–3974.
- Poliakov, G. (1961). Some results of research into the development of the neuronal structure of the cortical ends of the analyzers in man. *Journal of Comparative Neurology*, 117(2), 197–212.
- Porrino, L. J., & Goldman-Rakic, P. S. (1982). Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP. *Journal of Comparative Neurology*, 205(1), 63–76.
- Portellano, J. A. (2011). *Introducción a la neuropsicología*. McGraw-Hill España. <https://library.biblioboard.com/content/47272111-dd27-4e30-9b36-78cdb71d7d30>
- Purves, D. (Ed.). (2018). *Neuroscience* (Sixth edition). Oxford University Press.
- Quintanilla, R. A., Godoy, J. A., Alfaro, I., Cabezas, D., Bernhardt, R. von, Bronfman, M., & Inestrosa, N. C. (2013). Thiazolidinediones Promote Axonal Growth through the Activation of the JNK Pathway. *PLOS ONE*, 8(5), e65140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065140>
- Quintanilla, R. A., Utreras, E., & Cabezas-Opazo, F. A. (2014). Role of PPAR γ in the Differentiation and Function of Neurons. *PPAR Research*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/768594>

- Ramón-Moliner, E. (1970). The Golgi-Cox Technique. En W. J. H. Nauta & S. O. E. Ebesson (Eds.), *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy* (pp. 32–55). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85986-1_3
- Rempel-Clower, N., & Barbas, H. (1998). Topographic organization of connections between the hypothalamus and prefrontal cortex in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 398(3), 393–419.
- Richardson, A. J., Burton, J. R., Sewell, R. P., Spreckelsen, T. F., & Montgomery, P. (2012). Docosahexaenoic Acid for Reading, Cognition and Behavior in Children Aged 7–9 Years: A Randomized, Controlled Trial (The DOLAB Study). *PLOS ONE*, 7(9), e43909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043909>
- 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>
- Sakamoto, T., Cansev, M., & Wurtman, R. J. (2007). Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain Research*, 1182, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.089>
- Schaafsma, S. M., & Pfaff, D. W. (2014). Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 255–271. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.03.006>
- Schell, G. R., & Strick, P. L. (1984). The origin of thalamic inputs to the arcuate premotor and supplementary motor areas. *Journal of Neuroscience*, 4(2), 539–560.
- Schlüter, A., Del Turco, D., Deller, T., Gutzmann, A., Schultz, C., & Engelhardt, M. (2017). Structural Plasticity of Synaptopodin in the Axon Initial Segment during Visual Cortex Development. *Cerebral Cortex*, 27(9), 4662–4675. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx208>
- Segal, M., Vlachos, A., & Korkotian, E. (2010). The Spine Apparatus, Synaptopodin, and Dendritic Spine Plasticity. *The Neuroscientist*, 16(2), 125–131. <https://doi.org/10.1177/1073858409355829>
- SFARI Gene—Welcome. (s/f). SFARI Gene. Recuperado el 11 de mayo de 2020, de <https://gene.sfari.org/>
- Sheppard, K. W., Boone, K. M., Gracious, B., Klebanoff, M. A., Rogers, L. K., Rausch, J., Bartlett, C., Coury, D. L., & Keim, S. A. (2017). Effect of Omega-3 and -6 Supplementation on Language in Preterm Toddlers Exhibiting

- Autism Spectrum Disorder Symptoms. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 47(11), 3358–3369.
<https://doi.org/10.1007/s10803-017-3249-3>
- Shinawi, M., Patel, A., Panichkul, P., Zascavage, R., Peters, S. U., & Scaglia, F. (2009). The Xp contiguous deletion syndrome and autism. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 149(6), 1138–1148.
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(7), 490–502. <https://doi.org/10.1038/nrn2851>
- Singh, M. (2005). Essential fatty acids, DHA and human brain. *The Indian Journal of Pediatrics*, 72(3), 239–242.
<https://doi.org/10.1007/BF02859265>
- Smith, E. E., Kosslyn, S. M., Barsalou, L. W., & Ramos Platón, M. J. (2012). *Procesos cognitivos: Modelos y bases neuronales*. Pearson Prentice Hall.
- Snell, R. S., & Ovid Technologies, I. (2014). *Neuroanatomía clínica*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Stoner, R., Chow, M. L., Boyle, M. P., Sunkin, S. M., Mouton, P. R., Roy, S., Wynshaw-Boris, A., Colamarino, S. A., Lein, E. S., & Courchesne, E. (2014). Patches of Disorganization in the Neocortex of Children with Autism. *New England Journal of Medicine*, 370(13), 1209–1219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1307491>
- Tashiro, A., & Yuste, R. (2003). Structure and molecular organization of dendritic spines. *Histology and Histopathology*.
<https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/21436>
- Teng, B. L., Nonneman, R. J., Agster, K. L., Nikolova, V. D., Davis, T. T., Riddick, N. V., Baker, L. K., Pedersen, C. A., Jarstfer, M. B., & Moy, S. S. (2013). Prosocial effects of oxytocin in two mouse models of autism spectrum disorders. *Neuropharmacology*, 72, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.038>
- Tierney, S., Burns, J., & Kilbey, E. (2016). Looking behind the mask: Social coping strategies of girls on the autistic spectrum. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 23, 73–83.
- Uriarte, V. (2014). *Psicofarmacología*. Editorial Trillas.
- van Rijn, S., & Swaab, H. (2011). Vulnerability for psychopathology in Klinefelter syndrome: Age-specific and cognitive-specific risk profiles: Neurodevelopmental risk profiles in Klinefelter syndrome. *Acta Paediatrica*, 100(6), 908–916. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2011.02289.x>
- Vogt, B. A., & Pandya, D. N. (1987). Cingulate cortex of the rhesus monkey: II. Cortical afferents. *Journal of Comparative Neurology*, 262(2), 271–289.

- Webster, M. J., Bachevalier, J., & Ungerleider, L. G. (1994). Connections of inferior temporal areas TEO and TE with parietal and frontal cortex in macaque monkeys. *Cerebral cortex*, 4(5), 470–483.
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., Ma, S. Y., Chauhan, A., Chauhan, V., & Bobrowicz, T. W. (2010). The neuropathology of autism: Defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta neuropathologica*, 119(6), 755–770.
- Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D., & Henke, B. R. (2000). The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(4), 527–550. <https://doi.org/10.1021/jm990554g>
- World Health Organization. (2013). Autism spectrum disorders & other developmental disorders: From raising awareness to building capacity. Geneva: WHO Document Production Services.
- Xu, G., Strathearn, L., Liu, B., & Bao, W. (2018). Prevalence of autism spectrum disorder among US children and adolescents, 2014-2016. *Jama*, 319(1), 81–82.
- Yamashima, T. (2008). A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory. *Progress in Neurobiology*, 84(2), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.11.002>
- Yamashima, T. (2015). Dual effects of the non-esterified fatty acid receptor ‘GPR40’ for human health. *Progress in Lipid Research*, 58, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.01.002>
- Yeargin-Allsopp, M., Rice, C., Karapurkar, T., Doernberg, N., Boyle, C., & Murphy, C. (2003). Prevalence of Autism in a US Metropolitan Area. *JAMA*, 289(1), 49. <https://doi.org/10.1001/jama.289.1.49>
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., & Mostofsky, D. (2005). Essential fatty acids and the brain: From infancy to aging. *Neurobiology of aging*, 26(1), 98–102.
- Yoshida, T., Yasumura, M., Uemura, T., Lee, S.-J., Ra, M., Taguchi, R., Iwakura, Y., & Mishina, M. (2011). IL-1 receptor accessory protein-like 1 associated with mental retardation and autism mediates synapse formation by trans-synaptic interaction with protein tyrosine phosphatase δ . *Journal of Neuroscience*, 31(38), 13485–13499.
- Yoshihara, Y., De Roo, M., & Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion in Neurobiology*, 19(2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.05.013>
- Yui, K., Koshiba, M., Nakamura, S., & Kobayashi, Y. (2012). Effects of Large Doses of Arachidonic Acid Added to Docosahexaenoic Acid on Social Impairment in Individuals With Autism Spectrum Disorders: A Double-Blind,

Placebo-Controlled, Randomized Trial. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 32(2), 200–206.

<https://doi.org/10.1097/JCP.0b013e3182485791>