



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA
MICROGLÍA Y DEL CONTENIDO DE CITOCINAS EN
LA CORTEZA PREFRONTAL DE UN MODELO
MURINO DE AUTISMO (C58/J)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

CARLOS NOÉ VÁZQUEZ MORENO

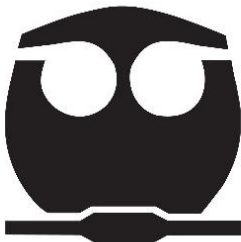
ASESORA:

DRA. MARISOL DE LA FUENTE GRANADA

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. JUAN FRANCISCO DUARTE CAMPOS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, MAYO 2023





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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
VOCAL:	Dr. Mario Adán Moreno Eutimio
SECRETARIO:	Dra. Marisol de la Fuente Granada
SUPLENTE 1:	Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez
SUPLENTE 2:	Dra. Aliesha Araceli González Arenas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 138, Edificio C, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Circuito Mario de La Cueva s/n, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Coyoacán, Ciudad de México, México, 04510.

ASESORA:

Dra. Marisol de la Fuente Granada.

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Juan Francisco Duarte Campos.

SUSTENTANTE:

Carlos Noé Vázquez Moreno.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Dra. Marisol de la Fuente Granada (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), mi tutora y mamá académica, por todo el apoyo brindado durante todo este tiempo, por sus consejos y conocimientos compartidos. Así como por toda la paciencia y confianza otorgada durante todo este tiempo.

Al M. en C. Juan Francisco Duarte Campos (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), mi supervisor técnico, por brindarme todo su apoyo, su asesoría técnica y teórica fundamentales para el desarrollo de este proyecto, por compartir conmigo su conocimiento y dedicación.

A la Dra. Aliesha Araceli González Arenas (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) miembro del jurado, por recibirme en su talentoso y armonioso equipo de trabajo, por su tiempo, observaciones y atención.

A la Q.F.B. Emely Maqueda Martínez (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por su guía y apoyo en la adquisición de imágenes de microscopia de epifluorescencia y en el manejo del software RStudio.

Al Dr. Daniel Garzón Cortés, a la M.V.Z. Mónica Martínez Marcial y al M.V.Z. Jorge Omar García Rebollar (Unidad de Modelos Biológicos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por su apoyo durante la crianza, cuidado y manejo de los animales utilizados en este proyecto.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez (Unidad de Microscopia del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por su disposición y apoyo en la adquisición de imágenes de microscopia de epifluorescencia.

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo (Facultad de Química, UNAM) miembro del jurado, por el apoyo brindado para la adquisición de imágenes de microscopia de epifluorescencia, por su tiempo y comentarios.

Al Dr. Mario Adán Moreno Eutimio (Facultad de Química, UNAM) y a la Dra. Lidia Sumiko Morimoto Martínez (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zuribán) miembros del jurado por su tiempo, comentarios y atención.

Al Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez (Facultad de Medicina, UNAM), por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

Y finalmente, a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser mi segundo hogar, por ayudarme en mi desarrollo profesional y personal.

Investigación realizada gracias a la beca otorgada Ayudante de Investigador SIN III (**EXP.INV.121616, EXP.AYTE.1199675, CVU 1199675**). Agradezco a CONACyT y al SNI la beca recibida.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre y padre, Francisca Irma Moreno Tesillo y Luis Javier Vázquez González, por su invaluable e incondicional apoyo, cariño y sostén. Porque han sido un gran complemento a lo largo de mi vida, brindándome las herramientas necesarias para llegar a ser lo que soy, ya que sin ustedes esto no hubiera sido posible. Les agradezco y les amo.

A mis hermanos Angel y Javier, por todo lo que hemos compartido, por su apoyo y compañía a lo largo de mi vida, por ser un gran equipo.

A mis amigos y amigas de la licenciatura Chifo, Gabriela, Fernando, Paul, Samara, Ximena, Alejandro, Mayra, Pitalúa, Diego Alejandro, Alma, Sebastián, Juan, Etson, Schull (Fer), Luis, Julio, Jesús, Zyanya, Richard, Berenice, Héctor, Hanny, Luz, Sandra, Diego, Dulce C, Karen, Camila, y todas aquellas amistades que me faltan por mencionar, que me acompañaron en todo este tiempo, por los buenos momentos y experiencias compartidas, porque me salvaron un poco la carrera y otro poco la vida.

A la chica del día 0, Tania, mi compañera en todo este proceso y a quien quiero tanto, porque tu ayuda ha sido fundamental, por darme la fuerza cuando no la tenía, gracias por todo.

A la familia que encontré en el C-138, a sus miembros pasados y presentes: Aliesha, Anahí, Ángel, Claudia, Denisse, Emely, Isabel, Ireri, Juan, Marisol, Montserrat, Sandra y Yesenia. Gracias por todos los momentos agradables, retroalimentación, apoyo y disposición desde que les conozco.

A María Elena, Harold Q.E.P.D., Mauricio, Alejandro, Arturo, Mitzi, Sintique, Fernanda, Malena, Said, Vero, Lalo y Oscar, por aceptarme en su hogar y brindarme su mano en los momentos indicados; con ustedes, la vida en otra ciudad fue más fácil.

A mis amigos de la infancia: Yair, Daniela, José, Hepsiba, Francisco, Amairani, Rodrigo, Samara y Ricardo; y a mis amigos de la preparatoria: Roberto, Antonio, Edson, Ximena, Gabo, Samantha, Nahúm, Elisa, Manuel, Lesly, Caleb, Sandra, César y Omar; por creer en mí y estar en momentos significativos de mi vida.

*“There is only one corner of the universe
you can be certain of improving,
and that’s your own self.”*

Aldous Huxley

A mi familia y amigos

CONTENIDO

I. LISTADO DE ABREVIATURAS	9
II. LISTADO DE FIGURAS	11
1. RESUMEN	12
2. INTRODUCCIÓN	13
3. ANTECEDENTES	14
3.1 TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA	14
3.1.1 DEFINICIÓN	15
3.1.2 DIAGNÓSTICO	15
3.1.3 EPIDEMIOLOGÍA	18
3.1.4 ETIOLOGÍA	20
3.1.4.1 FACTORES GENÉTICOS	20
3.1.4.2 FACTORES AMBIENTALES	21
3.2 NEUROINFLAMACIÓN	23
3.2.1 MICROGLÍA	25
3.2.2 TNF- α	29
3.2.3 IFN- γ	30
3.2.4 ALTERACIONES DE LA MICROGLÍA Y DEL CONTENIDO DE CITOCINAS ASOCIADAS AL TEA	31
3.3 CORTEZA CEREBRAL	33
3.3.1 CORTEZA PREFRONTAL	34
3.3.2 NEUROANATOMÍA DE LA CORTEZA PREFRONTAL	35
3.3.3 FUNCIÓN Y CONEXIONES DE LA CORTEZA PREFRONTAL	36
3.3.4 ALTERACIONES DE LA CORTEZA PREFRONTAL RELACIONADAS AL TEA	38
3.4 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL TEA	40
3.4.1 LA CEPA MURINA C58/J COMO MODELO DE ESTUDIO DEL TEA	41
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
5. HIPÓTESIS	43
6. OBJETIVOS	44
6.1 OBJETIVO GENERAL	44
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	44
7. METODOLOGÍA	44

7.1 ANIMALES	44
7.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IBA-1 Y TMEM119 EN LA CPF DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA	45
7.2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CORTEZA PREFRONTAL Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	45
7.2.2 ELECTROFORESIS EN GEL Y WESTERN BLOT	45
7.3 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA MICROGLÍA EN LA CORTEZA CEREBRAL DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA	46
7.3.1 PERFUSIÓN Y OBTENCIÓN DE CEREBROS	46
7.3.2 CORTES DE TEJIDO CEREBRAL Y TINCIÓN DE NISSL	47
7.3.3 INMUNOFLOURESCENCIAS	47
7.3.4 MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES. ANÁLISIS DE LA DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LA MICROGLIA	48
7.4 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE CITOCINAS EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA	50
7.4.1 ELISA: TNF- α e IFN- γ	50
7.5 COMPARACIÓN DE LOS GENES RELEVANTES PARA LA IDENTIDAD DE LA MICROGLÍA VS GENES ASOCIADOS AL RIESGO DE PRESENTAR TEA (SFARI).	51
7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
8. RESULTADOS	52
8.1 CONTENIDO DE PROTEÍNA IBA-1 Y TMEM119 EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA	52
8.2 DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA MICROGLÍA EN LA CORTEZA CEREBRAL DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA	54
8.3 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS	58
8.4 IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS AL RIESGO DE PRESENTAR TEA RELACIONADOS CON LA IDENTIDAD, PROCESOS INFLAMATORIOS Y DE FAGOCITOSIS DE LA MICROGLÍA	59
9. DISCUSIÓN	60
10. CONCLUSIONES	77
11. PERSPECTIVAS	78
12. REFERENCIAS	79
13. ANEXOS	97

I. LISTADO DE ABREVIATURAS

AVMA American Veterinary Medicine Association, *Asociación Americana de Medicina Veterinaria* por sus siglas en inglés

APA American Psychiatric Association, *Asociación Americana de Psiquiatría* por sus siglas en inglés

BA Brodmann Areas, *Áreas de Brodmann* por sus siglas en inglés

BAMs Brain Associated Macrophages, *Macrófagos Asociados al Cerebro* por sus siglas en inglés

B2ARs Beta-2 Adrenergic Receptor Agonists, *Agonistas del receptor adrenérgico beta-2* por sus siglas en inglés

CAMs CNS-Associated Macrophages, *Macrófagos asociados al SNC* por sus siglas en inglés

c.b.p. Cuanto baste para

CICUAL Comité Institucional del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio

CNV Copy Number Variation, *Variante en el Número de Copias* por sus siglas en inglés

CPF Corteza Prefrontal

DI Trastorno del Desarrollo Intelectual

DSM Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, *Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales* por sus siglas en inglés

E.E.M. Error Estándar de la Media

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, *Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas* por sus siglas en inglés

GABA Gamma-Aminobutyric Acid, *Ácido gamma amino butírico* por sus siglas en inglés

GAPDH Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GD Giro Dentado

GM-CSF Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, *Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos* por sus siglas en inglés

H₂SO₄ Ácido Sulfúrico

HLA Human Leukocyte Antigen, *Antígeno Leucocitario Humano* por sus siglas en inglés

HSI Hopkins Skellam Index, *Índice Hopkins-Skellam* por sus siglas en inglés

IMF Intensidad Media de Fluorescencia

ICD International Classification of Diseases, *Clasificación Internacional de Enfermedades* por sus siglas en inglés

IFN- γ Interferón-gamma

IL Interleucina

iNOS Inducible Nitric Oxide Synthase, *Óxido Nítrico Sintasa Inducible* por sus siglas en inglés

MCP-1/CCL2 Monocyte Chemoattractant protein 1, *Proteína Quimioatrayente de Monocitos* por sus siglas en inglés

MIA Maternal Immune Activation, *Activación Inmune materna* por sus siglas en inglés

NND Nearest Neighbor Distance, *Distancia más Cercana al Vecino* por sus siglas en inglés

n.s. Not significant, *No Significativo* por sus siglas en inglés

PBS Phosphate-Buffered Saline, *Amortiguador Salino de Fosfatos* por sus siglas en inglés

ROI Region of Interest, *Región de Interés* por sus siglas en inglés

ROS Reactive Oxygen Species, *Especies Reactivas de Oxígeno* por sus siglas en inglés

SNC Sistema Nervioso Central

SNP Single Nucleotide Polymorphism, *Polimorfismo de un Solo Nucleótido* por sus siglas en inglés

TDAH Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad

TEA Trastorno del Espectro Autista

TMB 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina

TND Trastorno del Neurodesarrollo

TGF- β Transforming Growth Factor β , *Factor de Crecimiento transformante β* por sus siglas en inglés

TNF- α Tumor Necrosis Factor-alpha, *Factor de Necrosis Tumoral-alfa* por sus siglas en inglés

UNAM Universidad Nacional Autónoma de México

II. LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones entre neuronas y células gliales en condiciones fisiológicas y patológicas.

Figura 2. Funciones homeostáticas de la microglía.

Figura 3. Organización de la corteza prefrontal.

Figura 4. Localización de la corteza prefrontal.

Figura 5. Análisis de NND y HSI.

Figura 6. Relación de la masa de la CPF con la masa cerebral total en ratones con fenotipo autista.

Figura 7. Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista no muestran cambios en el contenido de las proteínas de la microglía IBA-1 y TMEM119 en la CPF.

Figura 8. Imágenes representativas de la microglía en la CPF de ratones con fenotipo autista y neurotípicos.

Figura 9. Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista muestran un aumento en la densidad y una distancia más cercana al vecino (NND) menor entre células IBA-1⁺.

Figura 10. HSI y número de agrupamientos de la microglía de los ratones con fenotipo autista y neurotípicos.

Figura 11. Imágenes representativas de los agrupamientos de la microglía en la CPF de ratones con fenotipo autista y neurotípicos.

Figura 12. Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista muestran una reducción en el contenido de TNF- α en la CPF.

Figura 13. Genes asociados con el riesgo de presentar TEA en humanos enriquecidos en la microglía y en procesos inflamatorios y de fagocitosis relacionados.

1. RESUMEN

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) se refiere a un conjunto de alteraciones del neurodesarrollo, que se presentan en la infancia y persisten a lo largo de la vida. Los individuos con esta condición se caracterizan por déficits persistentes en la comunicación e interacción social, así como conductas repetitivas e intereses o actividades restringidas con distintos grados de severidad. Estudios sobre la neurobiología del TEA se han enfocado en entender las alteraciones y modificaciones neuronales. Sin embargo, debido a la importancia y variedad de funciones que desempeñan las células gliales para mantener la homeostasis cerebral; se ha propuesto que células como la microglía, células del SNC con capacidad fagocítica y de soporte asociado al sistema inmunológico, pueden estar involucradas en el origen y/o desarrollo del TEA. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar a la población de microglía en la corteza prefrontal de un modelo murino de autismo idiopático, la cepa murina C58/J. Esta región es importante debido a las funciones que alberga, como la memoria de trabajo, la toma de decisiones, la planificación, entre otras; algunas de las cuales se han reportado deterioradas en personas con TEA. En este trabajo, se identificó que adultos macho de la cepa murina C58/J en comparación con la cepa neurotípica C57BL/6J, presentan un aumento en la densidad de la microglía y una alteración en la distribución espacial de la misma en la corteza prefrontal, acompañada de una tendencia a incrementar el contenido de las proteínas microgliales IBA-1 y TMEM119. Adicionalmente, se encontró una disminución en el contenido de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ en la corteza prefrontal de estos ratones. Estos resultados sugieren que las alteraciones microgliales y los cambios en las citocinas inflamatorias podrían estar relacionados con los rasgos conductuales de tipo autista que presenta la cepa C58/J.

2. INTRODUCCIÓN

Los Trastornos del Neurodesarrollo (TND) pertenecen a un grupo heterogéneo de condiciones que se presentan y/o se diagnostican en el desarrollo temprano, comúnmente antes de que los infantes ingresen a la escuela, con déficits en la personalidad, funciones sociales, académicas u ocupacionales, y que persisten hasta la adultez (American Psychiatric Association, 2022). Los TND están asociados con la interrupción de eventos coordinados (diferenciación, migración, maduración y muerte celular, sinaptogénesis, entre otros) que conducen al neurodesarrollo.

Principalmente, los TND afectan al sistema nervioso central y se caracterizan por la incapacidad de los individuos de alcanzar los hitos del desarrollo motor, cognitivo y emocional (Ismail & Shapiro, 2019; Parenti et al., 2020). Estos trastornos pueden ser el resultado de la compleja interacción de factores ambientales (como la exposición a agentes tóxicos o diversas infecciones durante el embarazo) (Ismail & Shapiro, 2019) y factores genéticos (como CNV, SNP o mutaciones *de novo*) (Morris-Rosendahl & Crocq, 2020).

Dentro de los TND se encuentra el Trastorno del Espectro Autista (TEA), que se refiere a un conjunto de trastornos del neurodesarrollo, caracterizados por déficits en la comunicación e interacción social, así como por la presencia de conductas repetitivas e intereses restringidos (American Psychiatric Association, 2022). Sin embargo, es poco común que se presente un único TND en los individuos, pues las afecciones en casi todos los dominios del desarrollo llevan a un diagnóstico múltiple por comorbilidad homotípica (superposición entre diferentes trastornos) o por comorbilidad heterotípica (otras patologías psiquiátricas) (Francés et al., 2022; GBD 2019 Mental Disorders Collaborators, 2022; Ismail & Shapiro, 2019).

Adicionalmente, se han reportado algunas alteraciones en el SNC de individuos con TEA, como alteraciones en el contenido y secreción de citocinas y quimiocinas, así como respuestas de activación a inflamación y poblaciones celulares desreguladas (López-Cacho et al., 2016; Vargas et al., 2005), sugiriendo la presencia de eventos de neuroinflamación.

3. ANTECEDENTES

3.1 TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

La primera vez que se empleó el término autismo fue en 1911 por el psiquiatra alemán Eugen Bleuler al describir un caso severo de esquizofrenia, el cual se caracterizaba por deseos infantiles de evadir realidades insatisfactorias y reemplazarlas por fantasías y alucinaciones (Evans, 2013). Posteriormente, el concepto de autismo fue reformulado de acuerdo a las necesidades para comprender y describir diferentes y nuevos modelos de desarrollo infantil; así, en 1943, Leo Kanner de la Universidad Johns Hopkins en Baltimore, EE.UU., introdujo al campo de la psiquiatría y al mundo el término autismo infantil al describir los casos de 11 niños (3 niñas y 8 niños menores de 11 años) que presentaban una condición congénita del contacto afectivo (incapacidad innata de establecer contacto afectivo con otras personas), comportamientos monótonos, repetitivos y aislados, así como una resistencia al cambio inesperado; tiempo después, este conjunto de síntomas serían llamados síndrome de Kanner (Kanner, 1943).

Un año después, el pediatra Alemán Hans Asperger describió características similares en un grupo independiente de infantes; sin embargo, a diferencia de Kanner que enfatizó la condición de autismo como parte del desarrollo, Asperger describió la conducta como comportamientos asociados a un trastorno de la personalidad, y la llamó psicopatía autista (Rosen et al., 2021; Silberman, 2017). La condición observada fue reportada por Asperger como “pequeños adultos”, describiendo en los niños características como la falta de contacto afectivo, intensa uniformidad en rutinas, anormalidades del habla, altos niveles de habilidades visuoespaciales o de memoria, gran inteligencia y una fascinación por la manipulación de objetos, lo que más tarde se llamaría síndrome de Asperger (Pearce, 2005).

Con el paso del tiempo se definió al autismo como un concepto propio, diferente de la alteración del contacto social manifestado en la esquizofrenia (Rosen et al., 2021; Rutter, 1972). Lo anterior mejoró y replanteó la descripción de la condición autista al incluir habilidades sociales y de lenguaje retrasadas y desviadas, intereses restringidos y comportamientos repetitivos, además de hipo e hipersensibilidades sensoriales, así como la presencia de esta condición en la infancia (Rutter, 1972, 1978; Volkmar et al., 1986). Esto le permitió ganar validez diagnóstica al “autismo infantil” y fue incluido en la tercera edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos

Mentales (DSM) III de la Asociación Estadounidense de Psiquiatría en el año de 1980, como diagnóstico oficialmente reconocido y clasificado como un trastorno generalizado del desarrollo (Atbasoglu & Cem Atbasoglu, 2020; Rosen et al., 2021; Vivanti & Messinger, 2021).

3.1.1 DEFINICIÓN

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) se refiere a una condición heterogénea, que engloba a un conjunto de síndromes clínicos, genéticos y generalizados del neurodesarrollo (Tobe et al., 2012). Estos síndromes están caracterizados por deficiencias persistentes en la comunicación e interacción social, y por comportamientos sensoriomotores repetitivos que pueden variar en su grado de severidad (Iles, 2021; Lord et al., 2018); así como por la presencia de comportamientos, actividades y/o intereses restringidos, estereotipados e inflexibles de acuerdo al DSM-V-TR y a la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD) 11a edición (American Psychiatric Association, 2022; Lord et al., 2020; World Health Organization, 2019).

El término TEA consolida e incluye un conjunto de trastornos del neurodesarrollo, como el autismo infantil, autismo en la primera infancia, autismo de Kanner (síndrome de Kanner), autismo de alto funcionamiento, trastorno autista, trastorno generalizado del desarrollo no especificado, trastorno desintegrativo infantil (síndrome de Heller) y síndrome de Asperger (American Psychiatric Association, 2022; Hodges et al., 2020); afecciones heterogéneas en sus manifestaciones clínicas con características en común por lo que pertenecen al espectro autista.

3.1.2 DIAGNÓSTICO

La definición de los criterios necesarios para establecer un diagnóstico correcto de TEA ha sido controversial desde su inclusión en el DSM, ya que el TEA se considera como el resultado de un desarrollo cerebral temprano alterado y actualmente, no existen biomarcadores aceptados en consenso para su detección y diagnóstico (J. Y. Kim et al., 2019; Lord et al., 2018; Waligóra et al., 2019); por lo cual, las pautas de conducta exhibidas por sujetos con esta condición, evaluadas con el uso de entrevistas diagnósticas estructuradas y evaluaciones observacionales (Penner et al., 2018), permanecen como un indicador clave para su diagnóstico (Lord et al., 2018).

De acuerdo con la revisión de la quinta edición del DSM (American Psychiatric Association, 2022) el TEA se refiere a un grupo de trastornos del neurodesarrollo caracterizados por los criterios diagnósticos enlistados a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios diagnósticos para el TEA especificados por la Asociación Estadounidense de Psiquiatría en el DSM-V-TR.

CRITERIO	CARACTERÍSTICAS
<p>CRITERIO A: Deficiencias persistentes en la comunicación e interacción social en diversos contextos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Deficiencias en la reciprocidad socioemocional. ● Deficiencias en los comportamientos de comunicación no verbal utilizados para la interacción social. ● Deficiencias en el desarrollo, mantenimiento y comprensión de relaciones interpersonales.
<p>CRITERIO B: Exhibición de patrones repetitivos y restringidos de comportamiento, actividades o intereses.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Presencia de movimientos, uso de objetos o habla estereotipados o repetitivos. ● Insistencia en la monotonía, manifestado como una resistencia al cambio, apego inflexible a la rutina o patrones ritualizados de comportamiento verbal y no verbal. ● Intereses altamente restringidos usualmente anormales en intensidad o enfoque. ● Hiper o Hipo -reacción a estímulos sensoriales o interés inusual por aspectos sensoriales del ambiente.

<p>CRITERIO C: Los síntomas deben presentarse en etapas tempranas del desarrollo.</p>	<p>Los síntomas pueden no manifestarse por completo hasta que la demanda social supera las capacidades limitadas, o pueden estar enmascarados por estrategias aprendidas durante la vida.</p>
<p>CRITERIO D: Los síntomas causan un deterioro significativo socialmente, ocupacionalmente o en otras áreas funcionales importantes.</p>	
<p>CRITERIO E: Las alteraciones antes mencionadas no pueden ser explicadas por el Trastorno del Desarrollo Intelectual o por retraso en el desarrollo global.</p>	

Es importante mencionar que al evaluar los criterios A y B, es necesario determinar el nivel de apoyo o ayuda requerida para realizar actividades diarias, para lo cual se emplea una escala con distintos grados de acuerdo con la severidad del criterio: 1: necesita ayuda, 2: necesita ayuda notable; 3 necesita ayuda muy notable. Adicionalmente, con el fin de obtener una descripción clínica más detallada, se debe señalar si la persona presenta algún especificador o condición adicional, así como la severidad del mismo, como lo son la presencia o no de una deficiencia intelectual y de lenguaje; alguna condición médica genética o ambiental; la pérdida de habilidades previamente adquiridas; la presencia de otros problemas del neurodesarrollo, de comportamiento o mentales, o si el individuo presenta catatonía (American Psychiatric Association, 2022; World Health Organization, 2019).

La Asociación Estadounidense de Psiquiatría (APA, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han clasificado al TEA como una condición de síntomas centrales con

algunas diferencias para describir al espectro, donde el DSM-V-TR y el ICD-11 proporcionan especificadores para discernir entre el TEA y otras condiciones psiquiátricas (American Psychiatric Association, 2022; Rosen et al., 2021; World Health Organization, 2019; Zeldovich, 2018).

3.1.3 EPIDEMIOLOGÍA

De acuerdo con la OMS, se estima que 1 de cada 100 niños presenta TEA a nivel mundial (World Health Organization, 2022); sin embargo, esta estimación ha variado a lo largo del tiempo. El primer estudio realizado para conocer a la población con autismo se desarrolló en Inglaterra en el año de 1966; en este, se estimó una prevalencia de 4.5 casos de condiciones autistas por cada 10,000 niños, presentándose entre los 8 y 10 años de edad (Lotter, 1967).

Posteriormente, 33 años después se demostró que la prevalencia aumentó aproximadamente 5 veces (más de 20 casos por cada 10,000 niños) al realizar la evaluación poblacional utilizando el criterio de Rutter en E.U.A y Reino Unido, Dinamarca, Japón, Canadá o Suiza; lo que permitió considerar al autismo como una condición más frecuente de lo que se pensaba (Gillberg & Wing, 1999).

De acuerdo con estudios realizados en E.U.A., la prevalencia indica que la presencia de TEA es de 1 de cada 44 niños (CDC, 2022; Maenner et al., 2021); en países de Europa como España existe una prevalencia de 1 caso por cada 65 niños, en Japón existe un caso por cada 53 niños, mientras que en Australia se presenta la condición en 1 caso de cada 40 niños (Chiarotti & Venerosi, 2020; Fombonne et al., 2021; Zeidan et al., 2022).

En lo que respecta a México, el único estudio que se ha realizado acerca de la prevalencia del TEA fue publicado en 2016. Dicho estudio fue realizado en la ciudad de León, Guanajuato, por Fombonne y colaboradores, contando con una población de 12,116 niños de 8 años que acudían a una escuela primaria regular o de educación especial en el periodo 2011-2012. Este grupo de investigación, después de un análisis documental y confirmar el diagnóstico, estimó una prevalencia de 0.87%, es decir 1 caso por cada 115 niños (Fombonne et al., 2016).

A pesar de la heterogeneidad de los datos obtenidos en la prevalencia del TEA, se ha reportado que los individuos del sexo masculino son diagnosticados 4 veces más frecuentemente que aquellas del sexo femenino (GBD 2019 Mental Disorders Collaborators, 2022; Loomes et al., 2017; Maenner et al., 2021); esta diferencia podría deberse a sesgos en el diagnóstico, ya que se pueden presentar errores, carencia de diagnóstico en mujeres o diagnósticos tardíos (Loomes et al., 2017).

Como se mencionó anteriormente, los individuos con TEA pueden presentar comorbilidades con diversas condiciones como epilepsia, dificultades del sueño (problemas para conciliar el sueño, sueño de duración corta o interrumpida, alteraciones del ciclo circadiano) o problemas gastrointestinales (reflujo, diarrea crónica, constipación, dolor abdominal crónico) (Saghazadeh et al., 2019; Schiff & Asato, 2015). Además, el TEA se presenta en comorbilidad con otros trastornos, incluidos otros TND (TDAH, discapacidad intelectual [DI], trastornos relacionados a la ansiedad, desórdenes psicóticos, trastornos de la personalidad, entre otros) (Ståhlberg et al., 2015; Tick et al., 2016) presentando comorbilidad homotípica o heterotípica. Un ejemplo de esto es el aumento de la presencia de síntomas relacionados con TDAH cuando el individuo presenta TEA en un 62.7%, comparado con aquellos individuos que no presentan esta condición (Avni et al., 2018); además que se ha presentado una combinación muy común entre los TND, la cual incluye DI y TEA en países como India, Escocia, Noruega, España y Japón (Francés et al., 2022), estimando una comorbilidad en individuos con DI y TEA de hasta 30% (Thurm et al., 2019).

La prevalencia del TEA también muestra variabilidad de acuerdo con la región geográfica o grupo étnico que se estudie. Generalmente, la condición permanecía subdiagnosticada, diagnosticada tardíamente, mal diagnosticada o sin diagnóstico en diversos grupos sociales como mujeres, personas sin hogar y minorías étnicas, debido a factores como barreras biológicas, sociales, culturales o ambientales; en comparación con individuos caucásicos o provenientes de regiones donde las barreras para el diagnóstico no son un problema (Tromans et al., 2021). Estas brechas se han ido eliminando con el tiempo, gracias al avance en los métodos de identificación y diagnóstico; generando evidencia que sugiere que existe una mayor incidencia del TEA en los individuos residentes de zonas urbanas comparadas con aquellos de las zonas rurales (Maenner et al., 2021; Zeidan et al., 2022).

3.1.4 ETIOLOGÍA

La etiología del TEA es compleja, heterogénea y multifactorial, ya que resulta de la interacción de factores genéticos y factores ambientales, como las modificaciones epigenéticas, alteraciones fisiológicas y activación inmunológica (Iles, 2021; Lyall et al., 2017; Persico & Merelli, 2015; Rylaarsdam & Guemez-Gamboa, 2019; Yoon et al., 2020). La mayor parte de los estudios se han centrado en los factores genéticos para explicar la etiología del TEA; sin embargo, se ha sugerido que aproximadamente el 15% de los casos de TEA son secundarios, es decir, un trastorno con un patrón definido de anomalías y un fenotipo neuroconductual que puede incluir TEA, como trisomía 21, Síndrome de Cohen o Síndrome de X Frágil; mientras que en el 85% de los casos se trata de autismo idiopático, es decir, cuando no se conoce el origen del TEA (Casanova, Casanova, et al., 2020; Fernandez & Scherer, 2017).

3.1.4.1 FACTORES GENÉTICOS

Múltiples líneas de evidencia sugieren que la etiología del TEA comienza durante el desarrollo prenatal (Lyall et al., 2017) debido a una fuerte predisposición genética que se ve agravada por factores ambientales (Persico & Merelli, 2015); además, se caracteriza por una alta heredabilidad que va del 40% al 90% (Rylaarsdam & Guemez-Gamboa, 2019; Y. Zhang et al., 2021), pues se ha demostrado que hay una prevalencia del 20% cuando existe un caso positivo en la historia familiar, y aproximadamente 35% cuando de hermanos se trata, con una concordancia genética mayor en gemelos monocigotos del 70 al 90%, seguido de gemelos dicigotos y por último en hermanos de diferentes edades (Wiśniowiecka-Kowalnik & Nowakowska, 2019).

Actualmente, se ha reportado que existen más de 1000 genes asociados con el riesgo de presentar TEA, de los cuales 418 son considerados como genes candidatos fuertes por ser de alta confianza en el riesgo de TEA (Arpi & Simpson, 2022; SFARI <https://gene.sfari.org/>). Los genes asociados al riesgo de TEA pueden presentar mutaciones como las variantes del número de copias (CNV), polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o mutaciones *de novo* (Chaste & Devlin, 2015; Wang et al., 2021; Y. Zhang et al., 2021).

Estos genes están involucrados en diferentes procesos biológicos como remodelación del citoesqueleto, remodelación y desarrollo sináptico, regulación de procesos metabólicos e inmunológicos, procesos asociados al desarrollo cerebral, entre otros. Algunos ejemplos de genes involucrados en estos procesos son *CHD8* (involucrado en la adhesión celular dependiente de calcio), *CNTNAP2* (importante en la señalización neuronal) y *SCN2A* (clave para la capacidad celular de generar y transmitir señales eléctricas cerebrales) (Barón-Mendoza et al., 2021; Wang et al., 2021; Y. Zhang et al., 2021).

Sin embargo, es bien sabido que las mutaciones genéticas están asociadas a diversos trastornos o enfermedades al mismo tiempo (Rylaarsdam & Guemez-Gamboa, 2019); por lo que el uso de alteraciones genéticas como factores o marcadores predictores no es recomendable al 100% debido a la heterogeneidad genética y fenotípica del patrón de herencia (Iles, 2021), ya que proporciona desventajas para un diagnóstico claro y certero en el TEA idiopático (Casanova, Casanova, et al., 2020).

3.1.4.2 FACTORES AMBIENTALES

A pesar de que los factores genéticos conforman gran parte de la etiología del TEA, existen diversos factores ambientales que se han asociado al riesgo de presentar la condición. Estos factores tienden a afectar epigenéticamente a los factores genéticos, especialmente cuando hay un trasfondo genéticamente vulnerable y en periodos críticos del desarrollo. Estos periodos de tiempo son de gran susceptibilidad debido a los procesos del desarrollo cerebral que tienen lugar en ellos, como la proliferación neuronal, migración, diferenciación, maduración, sinaptogénesis, así como la remodelación dependiente de la actividad sináptica. Por lo tanto, los factores ambientales deberían ser considerados como una red compleja de factores que afecta la variabilidad fenotípica del TEA (Emberty Gialloreti et al., 2019; Persico & Merelli, 2015).

La medicación durante el embarazo puede elevar significativamente el riesgo de que el producto pueda presentar TEA. Tal es el caso del uso de antidepresivos, particularmente el uso de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina como Aripiprazol, Citalopram, Paroxentina o Sertralina (J. Y. Kim et al., 2019; Lord et al., 2018), antiepilépticos, como el ácido valproico (Bölte et al., 2019; Emberty Gialloreti et al., 2019; Lyall et al., 2017), o antihistamínicos B2ARs como el Salbutamol (Lyall et al., 2017). Adicionalmente, la evidencia ha sugerido una correlación positiva entre el

abuso de sustancias, principalmente el tabaco y alcohol, y el riesgo de desarrollar TEA (Bölte et al., 2019).

Recientemente, se ha propuesto que el incremento de la contaminación del aire y a la exposición a agentes químicos como pesticidas, repelentes y desinfectantes, así como, la exposición a metales pesados como el mercurio, níquel o plomo, son factores de riesgo para el TEA; sin embargo, aún es necesario indagar más para establecer la relación entre estos y el desarrollo del trastorno (Bölte et al., 2019; J. Y. Kim et al., 2019; Persico & Merelli, 2015).

Por otra parte, algunos de los factores que más se han investigado por su relación como factores de riesgo para el desarrollo de TEA, son aquellos asociados con los factores perinatales y maternos, como infecciones virales durante el embarazo (Emberti Gialloreti et al., 2019), la producción de autoanticuerpos (Abou-Donia et al., 2019; Ramirez-Celis et al., 2021), obesidad o diabetes por parte de la madre (Bölte et al., 2019), entre otros (J. Y. Kim et al., 2019).

Particularmente, las infecciones prenatales se han asociado con el aumento del riesgo de presentar TEA en la descendencia, ya que la infección materna durante el embarazo aumenta el riesgo de diagnosticar TEA en la descendencia hasta en un 79% y la evidencia sugiere que el riesgo incrementa de acuerdo con la gravedad de dicha infección; por lo que puede ser considerado como un elemento candidato etiológico del desarrollo de TEA (Bölte et al., 2019; Tioleco et al., 2021).

Aunado a esto, la presencia de otros trastornos psiquiátricos en la madre puede ser considerado un factor de riesgo (Al-Haddad et al., 2019) al promover la producción de citocinas proinflamatorias que pueden afectar al desarrollo del feto (Bölte et al., 2019; Brynge et al., 2022; Emberti Gialloreti et al., 2019). Además, diversos elementos como antecedentes familiares de autoinmunidad como hipotiroidismo, diabetes mellitus tipo 1 o artritis reumatoide (Lyall et al., 2015; Robinson-Agramonte et al., 2022); o bien, mutaciones en la región codificante para el antígeno leucocitario humano (Bennabi et al., 2018; Guerini et al., 2018, 2019); han sido considerados como factores etiológicos para el desarrollo del TEA.

Se ha reportado que la presencia de anticuerpos dirigidos contra elementos neuronales (Gładysz et al., 2018; Krakowiak et al., 2017); niveles alterados de la proteína C reactiva (Brynge et al., 2022), interferón (IFN) γ (Saghazadeh et al., 2019), interleucina (IL) -4, IL-5 y MCP-1 en suero (Gładysz et al., 2018; Robinson-Agramonte et al., 2022); o una activación glial crónica (Davoli-Ferreira et al., 2021; Gzielo & Nikiforuk, 2021) pueden ser considerados como factores de riesgo para el desarrollo del TEA. Por lo tanto, la evidencia mencionada sugiere que las alteraciones de la respuesta inmunológica durante el embarazo, podría desencadenar un evento de neuroinflamación en el producto, lo cual se encuentra asociado al desarrollo del TEA.

3.2 NEUROINFLAMACIÓN

Se le conoce como neuroinflamación a la respuesta inflamatoria que ocurre en el SNC, que involucra la activación de células del SNC como la microglía, los astrocitos, los pericitos y células endoteliales, así como de macrófagos asociados al cerebro (BAMs). Este proceso está caracterizado por la producción de mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas, además de la liberación de moléculas mensajeras de bajo peso molecular como óxido nítrico, especies reactivas del oxígeno (ROS), y prostaglandinas (Leng & Edison, 2020); y con una marcada infiltración de células periféricas del sistema inmunológico (macrófagos, linfocitos T y B) (Chaney et al., 2021; Martínez-Tapia et al., 2018; Milatovic et al., 2017).

En condiciones normales, los procesos inmunológicos en el cerebro están estrechamente regulados por las células de la glía (principalmente microglía y astrocitos, **Figura 1**), las cuales eliminan agentes patógenos o estímulos dañinos y reparan el tejido cerebral mediante mecanismos celulares como la fagocitosis, la producción de citocinas y de factores neurotróficos; por lo tanto, cualquier alteración en estos procesos puede dirigir a un estado de inflamación crónica con niveles elevados de citocinas proinflamatorias (Gzielo & Nikiforuk, 2021).

Generalmente, la neuroinflamación se asocia con una activación de estas células gliales (astrocitos y microglía) causando una desregulación de sus funciones homeostáticas, acompañado de una invasión de células del sistema inmunológico y la producción de citocinas y quimiocinas

proinflamatorias. Así, la producción de estas moléculas se ha asociado con el desarrollo de lesiones agudas, crónicas o una neurodegeneración del SNC (Chaney et al., 2021; Mapunda et al., 2022).

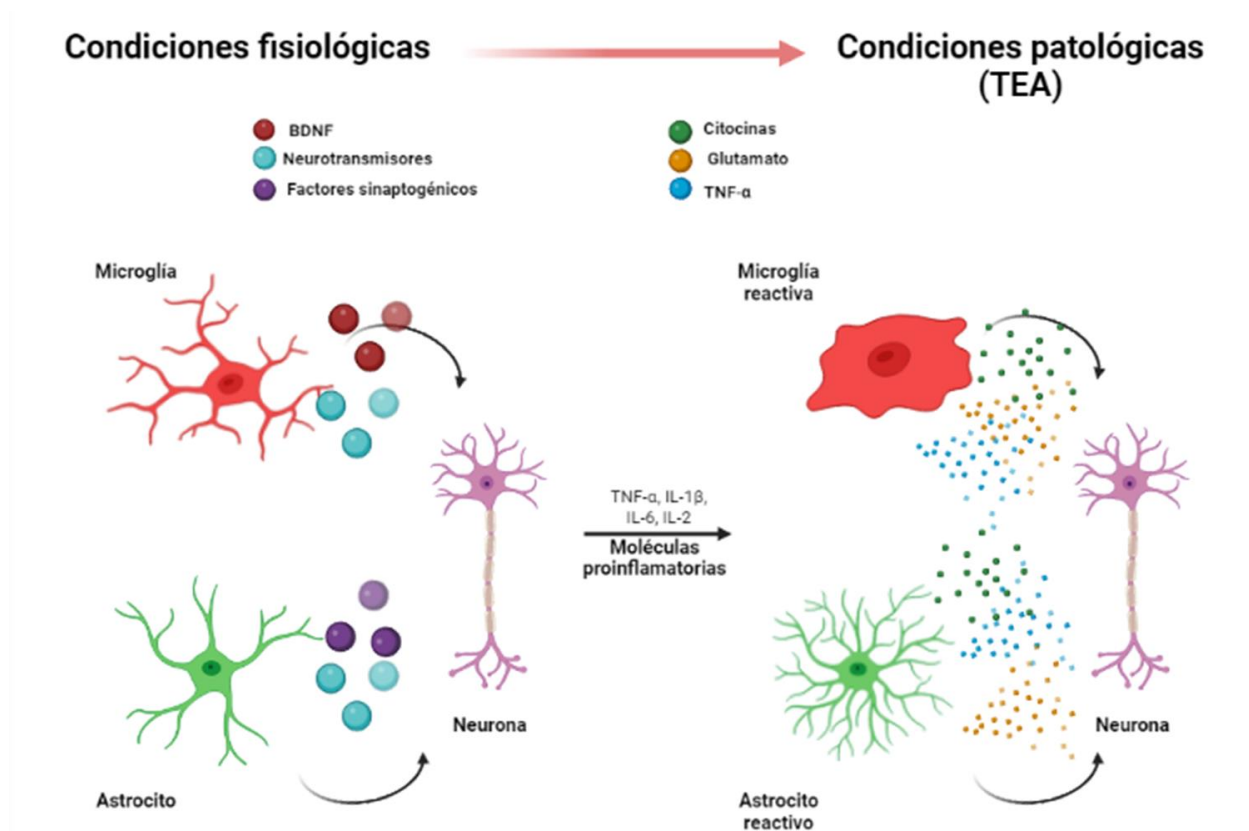


Figura 1. Interacciones entre neuronas y células gliales en condiciones fisiológicas y patológicas. Las células gliales (como la microglía) en condiciones fisiológicas, liberan moléculas como factores de crecimiento (BDNF), gliotransmisores y citocinas que pueden tener un efecto en la interacción celular, principalmente con neuronas; contribuyendo a la remodelación, poda sináptica y fagocitosis. Por otra parte, las células en condiciones patológicas se vuelven reactivas y liberan moléculas que provocan un estado de neuroinflamación crónica, exacerbando el fenómeno de inflamación aguda. La evidencia de diversos modelos sugiere que puede existir una relación entre el fenotipo autista y la presencia de un proceso neuroinflamatorio en estos sujetos. Modificado de (Petrelli et al., 2016).

Como se mencionó, existe un aumento en la expresión de proteínas como IBA-1, GFAP, CD68, CD86, CD14, CD11b, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), arginasa 1, además de citocinas como IL-1 β , IL-10, IL-6, TNF- α e IFN- γ en los procesos neuroinflamatorios, las cuales son producidas por células de la glía, principalmente la microglía (DiSabato et al., 2016; Prinz et al., 2019; Sousa et al., 2017). Lo anterior resalta la importancia de la microglía en la respuesta inmune, ya que al ser la fuente principal de enzimas y moléculas que modulan la respuesta inmune en el SNC, puede

tener funciones neuroinflamatorias mediante una activación clásica (similar a los macrófagos M1), o funciones neuroprotectoras mediante la activación alternativa (similar a los macrófagos M2) (DiSabato et al., 2016; Y. S. Kim & Joh, 2006; Prinz et al., 2019;).

La activación prolongada de la microglía conduce al daño oxidativo del tejido nervioso y conlleva a una degeneración de los circuitos neuronales, causando deterioro en las funciones neurológicas y cognitivas, lo cual se ha vinculado de manera íntima al desarrollo y progresión de enfermedades neurodegenerativas (como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington) y de trastornos del neurodesarrollo (como TDAH, TEA) (Dunn et al., 2019; Guzman-Martinez et al., 2019; Martínez-Tapia et al., 2018; Milatovic et al., 2017).

3.2.1 MICROGLÍA

La microglía es la población celular fagocítica mononuclear más abundante del SNC, representando aproximadamente el 10% del total de células en esta región (Prinz et al., 2021). Estas células son la población de células inmunológicas residentes del cerebro, que patrullan y sondan el microambiente del SNC de manera continua a través de sus procesos celulares (Eyo & Wu, 2019; Prinz et al., 2019). Las células de la microglía poseen una vida promedio de aproximadamente 4 años, y una tasa de renovación anual del 28% en humanos; mientras que, en ratones se renuevan aproximadamente cada 95 días, manteniendo así la proliferación homeostática de la microglía equilibrada con la apoptosis de estas células en condiciones fisiológicas (1.23% de la microglía residente muere al día) (Askew et al., 2017; Eyo & Wu, 2019).

Las células de la microglía tienen su origen en el saco vitelino, a partir de los progenitores eritromieloides (Eyo & Wu, 2019; Prinz et al., 2021); los cuales migran hacia el cerebro a través de los vasos sanguíneos para colonizar el tubo neural, donde permanecen toda la vida y mantienen una densidad constante gracias a tasas acopladas de división y de muerte celulares (Askew et al., 2017; Morimoto & Nakajima, 2019; Norris & Kipnis, 2019).

La microglía coloniza el SNC prácticamente al mismo tiempo que se desarrollan las neuronas y se produce la angiogénesis, antes de cualquier otra célula glial; estableciéndose en las meninges y los

ventrículos cerebrales, para posteriormente distribuirse por toda la corteza cerebral (Morimoto & Nakajima, 2019). Después de ingresar al SNC, las células de la microglía experimentan cambios fenotípicos hacia un estado de reposo en el que expresan constitutivamente las proteínas CD80, CD86, CD40, CD11b, CD58 y niveles bajos de MHC-II, las cuales son moléculas relacionadas con la presentación de antígenos y con la activación de la respuesta inmune (Cornell et al., 2022; Ousman & Kubes, 2012).

La morfología y reactividad de la microglía están asociadas con la respuesta a lesiones o alteraciones del microambiente cerebral, con la inflamación sistémica o con procesos neurodegenerativos. De hecho, la morfología de la microglía en el SNC embrionario y postnatal temprano, difiere de la microglía adulta; donde la primera se caracteriza por una forma ameboide redonda (similar a la microglía adulta en estado reactivo) con procesos celulares reducidos en número y en longitud; mientras que la microglía adulta en estado de reposo cuenta con una forma más estrellada con numerosos y ramificados procesos celulares (Eyo & Wu, 2019; Prinz et al., 2021).

En condiciones fisiológicas, la principal función de la microglía es mantener la homeostasis del SNC. Desde su establecimiento, la microglía contribuye regulando los procesos de angiogénesis en la eliminación y anastomosis de los vasos sanguíneos, así como en el control de la proliferación y de la supervivencia de precursores neurales (Morimoto & Nakajima, 2019; Norris & Kipnis, 2019; Prinz et al., 2021) (**Figura 2A**); un ejemplo de ello ocurre durante el desarrollo posnatal de la capa V de la corteza cerebral, donde la producción del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) por parte de la microglía es necesaria para mantener la supervivencia neuronal en esa zona (Ueno et al., 2013).

En condiciones fisiológicas, la microglía también actúa monitoreando el estado funcional de las sinapsis en el SNC al detectar moléculas fosforiladas (ATP, ADP, AMP), iones (K^+) y neurotransmisores (glutamato, GABA) (Prinz et al., 2019) (**Figura 2B**). La microglía expresa proteínas características como IBA-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), una proteína intracelular de unión a calcio expresada por poblaciones mieloides que se ha relacionado con la reorganización del citoesqueleto y los procesos de fagocitosis (Ito et al., 1998; 2001); y TMEM119,

una proteína transmembranal de tipo I usada como marcador microglial, ya que es expresada exclusivamente por esta población en el SNC (J. Satoh et al., 2016).

Hay evidencia creciente de que la microglía participa activamente en el establecimiento de la arquitectura neuronal del SNC. Por ejemplo, el sistema del complemento tiene un rol importante durante el neurodesarrollo, debido a la eliminación de las espinas dendríticas marcadas con las proteínas C1q (vía clásica del complemento) por parte de la microglía en un proceso conocido como poda sináptica (**Figura 2C**). Además, la microglía puede interactuar con células neuronales a través de moléculas de señalización como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual está involucrado en el establecimiento y mantenimiento de la estructura sináptica, la regulación de la neurotransmisión, el crecimiento axonal y dendrítico, entre otros procesos (Cornell et al., 2022; Norris & Kipnis, 2019; Prinz et al., 2019; Song et al., 2017). Asimismo, la microglía puede regular la migración y posicionamiento laminar de interneuronas corticales inhibitorias y dopaminérgicas, lo cual influye en el equilibrio correcto de inhibición-excitación neuronal (Morimoto & Nakajima, 2019; Prinz et al., 2021), además de que la microglía participa en la reorganización de las sinapsis de manera dependiente de la actividad en regiones como la corteza visual (Schafer et al., 2012) (**Figura 2D**).

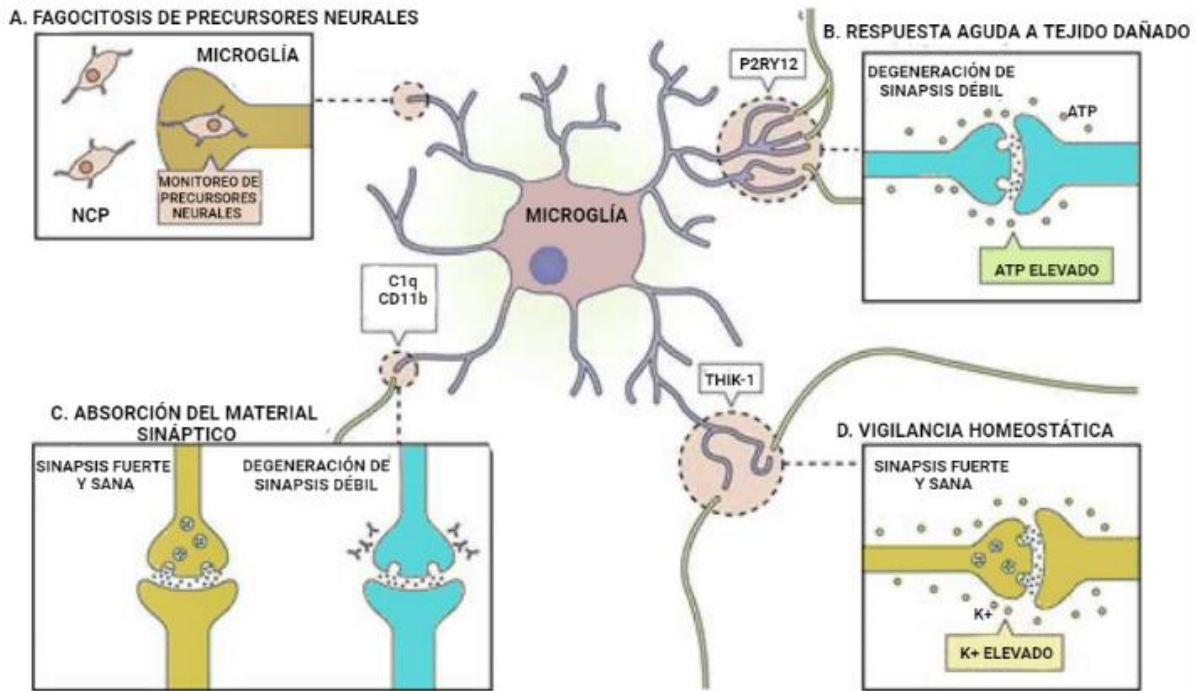


Figura 2. Funciones homeostáticas de la microglía. (A) Regulación de las neuronas y precursores neurales (NPC, por sus siglas en inglés *Neural Precursor Cells*) por fagocitosis. (B) Activación de la microglía por ATP liberado en daño. (C) Regulación por fagocitosis del material sináptico. (D) Vigilancia de la microglía regulada por el ión K^+ en condiciones homeostáticas. Modificado de (Norris & Kipnis, 2019).

Por otra parte, la reactividad de la microglía se vincula con la disminución de la plasticidad y función sináptica causando la progresión de déficits cognitivos en diversas condiciones, como el envejecimiento, los trastornos neurodegenerativos y los trastornos del neurodesarrollo (Bachiller et al., 2018; Cornell et al., 2022; Ransohoff & Brown, 2012).

Cuando la microglía se encuentra en un estado reactivo, sus funciones cambian notablemente comparado con el estado homeostático del SNC. En un estado reactivo, las células de la microglía adquieren una morfología más compacta, tipo macrófago o ameboide, con un núcleo hipertrófico y con un número reducido de sus prolongaciones o procesos celulares; experimentando un aumento en la expresión de moléculas y marcadores de superficie como CX3CR1 o CSF1R; en la producción de citocinas proinflamatorias y ROS; y un aumento de su capacidad fagocítica (Bennett & Viaene, 2021; Woodburn et al., 2021).

Generalmente, las citocinas de carácter proinflamatorio (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α) y anti-inflamatorio (IL-4, IL-10, TGF- β) son producidas por células del sistema inmunológico (Kany et al., 2019), en cambio, en el SNC estas citocinas son producidas principalmente por células de la glía, como microglía y astrocitos (Konsman, 2022; Sochocka et al., 2016), las cuales tienen la capacidad de regular y desencadenar una respuesta antiinflamatoria o una respuesta proinflamatoria según las citocinas que se produzcan (Petrelli et al., 2016; Tang & Le, 2016).

Las citocinas tienen efectos sobre la interacción y comunicación celular (Kany et al., 2019; J.-M. Zhang & An, 2007) promoviendo y regulando las reacciones de inflamación debido a la presencia de alguna lesión, infección o peligro potencial (Dinarello, 2000; Liu et al., 2021). Dos de las citocinas proinflamatorias relevantes para su estudio son TNF- α e IFN- γ , ya que son principalmente producidas por células del sistema inmunológico en condiciones de inflamación (Liu et al., 2021).

3.2.2 TNF- α

El factor de necrosis tumoral (TNF) - α es producido principalmente por macrófagos y monocitos, aunque puede ser producido por otras células como linfocitos y neutrófilos en pequeñas cantidades; ocasionando efectos sobre la activación y proliferación de diversas células (Holbrook et al., 2019). En el SNC es producido por neuronas, células gliales como microglía y algunos macrófagos residentes (CAMs) como macrófagos de los plexos coroideos, perivasculares y meníngeos. TNF- α , al ser una citocina expresada principalmente en respuesta a estímulos proinflamatorios, se ha asociado a procesos de neurotoxicidad y neuroprotección de acuerdo con el nivel de TNF- α presente en el organismo (DiSabato et al., 2016; Pozniak et al., 2013; Zhao et al., 2021).

TNF- α actúa sobre varias vías de señalización relacionadas con la apoptosis, la citotoxicidad y la inflamación (un ejemplo es la vía de señalización NF- κ B), al interactuar con sus receptores TNFR1 y TNFR2 (J.-M. Zhang & An, 2007). TNF- α se ha visto implicado de manera importante en la inflamación del SNC, ya que las células de la glía y neuronas expresan el receptor TNFR2, así como células inmunológicas y epiteliales (Holbrook et al., 2019).

3.2.3 IFN- γ

Por otra parte, el IFN- γ es secretado por células de origen linfoide del sistema inmunológico, como los linfocitos T (CD4+ y CD8+), células Natural Killer y células NKT (Kak et al., 2018). Sin embargo, a pesar de considerarse de producción restringida por este tipo de células, se ha reportado que células del prosencéfalo fetal, astrocitos y microglía pueden producir IFN- γ tras una estimulación con las citocinas IL-12 e IL-18 (Kawanokuchi, J. et al., 2006).

La principal función del IFN- γ se encuentra relacionada con la defensa del organismo por parte del sistema inmunológico (respuesta antitumoral, antiviral e inmunomodulación) y con la regulación autocrina (Kak et al., 2018). Esta citocina ejerce su acción a través del receptor IFNGR, el cual se encuentra expresado en todas las células nucleadas como un heterodímero formado por la asociación no covalente de dos subunidades polipeptídicas, la subunidad IFNGR-1 (cadena alfa) y la su unidad IFNGR-2 (cadena beta) (Castro et al., 2018; Young & Hodge, 2003).

Una vez secretado el IFN- γ , se une a la subunidad IFNGR-1, el cual actúa con la subunidad IFNGR-2 y a su vez, comienza con la activación de vías de señalización intracelulares (principalmente JAK-STAT) desencadenando una variedad de efectos en la célula (regulación autoinmune, apoptosis, regulación del ciclo celular, entre otros) (Castro et al., 2018; Elco & Sen, 2013)

En el SNC, INF- γ es una citocina proinflamatoria que permite llevar a la microglía a un estado sobreactivado capaz de responder a estímulos inmunológicos secundarios (*primed microglia*) durante la activación y proliferación de estas células; además, oscilaciones en esta citocina se han asociado con la expresión de iNOS y la producción de NO (óxido nítrico). Esta citocina también se ha visto involucrada con la poda y remodelación sináptica, así como en la proliferación de precursores neurales (Ta et al., 2019).

Las diversas citocinas y quimiocinas liberadas por la microglía del SNC, permiten la comunicación funcional entre el sistema inmunológico y el cerebro. Sin embargo, una consecuencia de la producción de las citocinas proinflamatorias es la inducción de la neuroinflamación, es decir, un estado patológico (DiSabato et al., 2016); ya que, la elevada producción de estas citocinas proinflamatorias ocasiona diversos efectos en el SNC como fiebre y otros síntomas, afectando la

plasticidad sináptica y muerte neuronal, ocasionando deterioros cognitivos como déficits de memoria (DiSabato et al., 2016; Kempuraj et al., 2017; Sochocka et al., 2016).

3.2.4 ALTERACIONES DE LA MICROGLÍA Y DEL CONTENIDO DE CITOCINAS ASOCIADAS AL TEA

Diversos estudios han reportado alteraciones en la sobreactivación, distribución y densidad poblacional de la microglía en diferentes regiones de cerebros de individuos con TEA como: corteza visual y corteza fronto insular (Tetreault et al., 2012), corteza temporal (Lee et al., 2017), cerebelo (Suzuki et al., 2013), amígdala (Morgan et al., 2014) y CPF (Edmonson et al., 2014; Morgan et al., 2012; Suzuki et al., 2013). Además, se han observado alteraciones genéticas en la CPF, afectando preferentemente a neuronas excitatorias y células de la microglía, al igual que los circuitos corticales y la interacción entre estas células en individuos con TEA (Astorkia et al., 2022; Martínez-Cerdeño, 2017; Velmeshev et al., 2019).

Mutaciones en el receptor CX3CR1 de la microglía se han asociado a alteraciones en la poda sináptica comportamiento social y conectividad neuronal; así como alteraciones en la funcionalidad de la fagocitosis se han reportado en individuos con TEA (Edmonson et al., 2014; Kalavai & Ikezu, 2021; Tay et al., 2018; Zhan et al., 2014). El enriquecimiento de los marcadores relacionados con la microglía activada (como IBA-1) y la expresión de genes asociados a la respuesta inmune (como *AIFI*) y procesos inflamatorios también se han observado en individuos con TEA (Davoli-Ferreira et al., 2021; Edmonson et al., 2014).

Así mismo, la evidencia indica que los individuos con trastornos del neurodesarrollo, como el TEA, muestran un perfil proinflamatorio de citocinas en el SNC; pues durante el desarrollo temprano, el cerebro es altamente vulnerable a insultos y alteraciones como las reacciones inflamatorias (Petrelli et al., 2016). Además, la evidencia indica que los individuos con TEA permanecen en un estado desregulado inmunológicamente y/o de neuroinflamación continuo en diferentes regiones del cerebro, lo que involucra la activación de las células gliales como astrocitos y microglía (Jyonouchi et al., 2014; Masi, Glozier, et al., 2017; Pardo et al., 2005; Rodriguez & Kern, 2011).

En el periodo posnatal también es importante la implicación del contenido de diversas citocinas en individuos con TEA, al aumentar los niveles de citocinas proinflamatorias en diversas regiones del cerebro, en el líquido cefalorraquídeo y en plasma (Gładysz et al., 2018; Masi, Glozier, et al., 2017; Saghazadeh et al., 2019; Zhao et al., 2021). Particularmente, se han encontrado niveles altos de citocinas antiinflamatorias como TGF- β e IL-10 en la circunvolución frontal media, cerebelo y la corteza del cíngulo anterior, mientras que diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, GM-CSF, MCP-1, MCP-3, MIG, IFN- γ , BLC y TNF α , reportan niveles altos en la corteza del cíngulo anterior, el líquido cefalorraquídeo y el cerebelo de individuos con TEA (Chez et al., 2007; El-Ansary & Al-Ayadhi, 2012; Pardo et al., 2005; Saghazadeh et al., 2019; Theoharides et al., 2013; Vargas et al., 2005; Wei et al., 2011; Zhao et al., 2021).

Estos hallazgos son de gran interés debido a que la producción de estas citocinas puede intervenir en respuestas celulares involucradas en la inflamación, neurogénesis, gliogénesis, crecimiento y proliferación celular, así como en la mielinización y desmielinización; provocando alteraciones anatómicas y fisiológicas asociadas a la patogenia de afecciones neurológicas como el TEA. Un ejemplo es el incremento de la quimiocina MCP-1 (CCL2 o proteína quimioatrayente de macrófagos 1), la cual se ha visto involucrada en la neuroinflamación mediante la activación de las células de la microglía, así como en el reclutamiento de microglía y macrófagos (Pardo et al., 2005; Wei et al., 2011).

Lo anterior indica que la respuesta inmunológica y la microglía pueden tener un rol importante en el desarrollo del TEA, ya que la evidencia apunta a que un ambiente desregulado de citocinas en el SNC tiene severas consecuencias en las funciones neuronales y cognitivas; esto lo convierte en un factor de riesgo significativo para enfermedades neurológicas y los trastornos del neurodesarrollo, como el TEA (Kimberley McAllister, 2017; Meltzer & Van de Water, 2017). Sin embargo, es necesario conocer a fondo el papel de cada una de las citocinas y así poder esclarecer la fisiopatología de la condición.

3.3 CORTEZA CEREBRAL

Evolutivamente, la corteza cerebral es la estructura externa dominante del cerebro de mamíferos, ya que dicta las conductas complejas que caracterizan a los humanos (Hofman, 1988; Tosches, 2021).

La corteza cerebral es una capa que constituye aproximadamente la mitad de la masa cerebral, midiendo aproximadamente 2200 centímetros cuadrados, con un grosor promedio de 2.6 milímetros en humanos, aunque varía dependiendo del área cortical (Escobar et al., 2019; Van Essen et al., 2018; Zilles, 2018). Esta estructura recubre cada hemisferio, y está asociada con diversos procesos cognitivos complejos o de orden superior como razonamiento, lenguaje, memoria, entre otros (Molnár et al., 2019; K. Rockland, 2017); compuesta por una asociación compleja de neuronas (materia gris), que se desarrolla desde la parte más anterior del cerebro en circunvoluciones, surcos y pliegues, distribuidos heterogéneamente sobre la capa exterior del cerebro (Jawabri & Sharma, 2022).

La corteza cerebral puede dividirse de acuerdo con los surcos y circunvoluciones más marcados, que delimitan a los diferentes lóbulos funcionales del cerebro (lóbulo frontal, lóbulo parietal, lóbulo occipital y lóbulo temporal) (Javed et al., 2021). En esta estructura se reciben múltiples fibras, las cuales se distribuyen a través de la neocorteza y en sus diferentes capas; estas fibras pueden ser de carácter ascendente de estructuras subcorticales; de carácter eferente, las cuales se proyectan hacia regiones subcorticales como el tallo cerebral y la médula espinal; o fibras que interconectan las diferentes capas (K. S. Rockland & DeFelipe, 2018; Shipp, 2007).

Dentro de la corteza cerebral existen regiones de importancia debido a su relación con funciones cognitivas superiores, como el área de Wernicke y el área de Broca, las cuales se vinculan mediante fibras nerviosas del fascículo arqueado para la comprensión del lenguaje. El área de Wernicke (BA 39 y 40), ubicada en la parte posterior del lóbulo temporal, participa fundamentalmente en la comprensión del lenguaje auditivamente y a través de la lectura. Por otra parte, el área de Broca es una región situada en la corteza prefrontal y en el área premotora, las cuales corresponden a BA 44 y 45; ésta es un área crítica para la producción del lenguaje, ya que ejecuta patrones motores necesarios para la expresión de las palabras o frases cortas (Hall J. E., 2020; Purves et al., 2018).

Funcionalmente, la corteza cerebral se ha dividido en 3 áreas principales de acuerdo a sus propiedades estructurales, siguiendo patrones de arborización dendrítica, patrones de conectividad, densidad de receptores; así como por su carácter funcional; estas son área sensorial, área motora y área asociativa (Escobar et al., 2019; Javed et al., 2021; Wagstyl et al., 2020). El área sensorial es una región donde se encuentran proyecciones aferentes del tálamo relacionadas con la sensibilidad; contiene áreas primarias que incluyen a la corteza visual primaria, la corteza auditiva primaria y la corteza sensorial, en las que se pueden encontrar aferentes de los núcleos del relevo del tálamo, con conexiones directas a los receptores sensoriales periféricos; y áreas secundarias que reciben información de los núcleos asociativos del tálamo, encéfalo y áreas primarias de la corteza, que participan en el análisis sensorial (Escobar et al., 2019; Nadgir & David M. Yousem MD, 2017). En el caso de las áreas motoras, ubicadas en la porción posterior del lóbulo frontal, se incluye a aquellas regiones de la corteza conectadas a centros motores de las áreas sensoriales, es decir, áreas cuya estimulación produce o induce los movimientos musculares, sin intervenir en procesos cognitivos o sensoriales (Escobar et al., 2019; Nadgir & David M. Yousem MD, 2017). Por último, las áreas de asociación son las más grandes del cerebro, ya que incluyen extensiones de los 4 lóbulos con las conexiones intracorticales de estructuras subcorticales. Estas áreas están relacionadas con procesos cognitivos como la memoria, el lenguaje, la personalidad y las emociones (Escobar et al., 2019; Nadgir & David M. Yousem MD, 2017).

3.3.1 CORTEZA PREFRONTAL

La corteza prefrontal (CPF) es la región más desarrollada y elaborada de la corteza cerebral, debido a la amplia gama de procesos neuronales que interconectan las diversas áreas neocorticales; es aquí donde se envían y reciben proyecciones a diversas estructuras subcorticales que definen los procesos mentales y cognitivos más complejos que caracterizan a los seres humanos. Es la región más extensa de la corteza cerebral, ya que ocupa aproximadamente una tercera parte de esta; además, es bien conocida por la diversidad y flexibilidad de funciones que alberga el área. Es una región neocortical anterior del lóbulo frontal, ubicada delante de las áreas motoras y premotora (contiene las áreas 8, 9, 10, 11, 44, 45, 46 y 47 de Brodmann); además, es una región bien caracterizada por su composición celular, conexiones aferentes e inervación dopaminérgica (Miller & Cohen, 2001; Purves et al., 2018).

La CPF comienza a desarrollarse antes del nacimiento, y se ha reportado que la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) tiene un papel muy importante en la especialización, desarrollo y expansión regional de la CFP. La expansión de la superficie cortical comienza con la diferenciación de la glía radial a neuronas durante la neurogénesis embrionaria, continuando en la infancia con el crecimiento del soma, complejidad dendrítica y reorientación espacial; y posteriormente, aproximadamente hasta la tercera década de vida con la diferenciación neuronal y el desarrollo de conexiones sinápticas, permitiendo desarrollar las habilidades cognitivas de orden superior que se evidencian en la fase adulta (Fuster, 2015; Kolk & Rakic, 2021).

3.3.2 NEUROANATOMÍA DE LA CORTEZA PREFRONTAL

Al formar parte de la neocorteza, la CPF es una estructura citoarquitectónica laminar de 6 capas (I - VI) constituida por millones de neuronas, de las cuales tres se consideran superficiales (I - III) y tres profundas (IV - VI) (Palomero-Gallagher & Zilles, 2019). Estas capas no tienen el mismo grosor (considerado un marcador cortical en estudios tanto *in vivo* como *ex vivo*) ni los mismos tipos celulares a lo largo de toda el área cortical; ya que las diversas capas de la neocorteza poseen características funcionales y anatómicas diferentes (Purves et al., 2018; Wagstyl et al., 2020).

Como se observa en la **Figura 3**, la capa I (capa molecular) es la capa plexiforme más externa, ya que posee la menor densidad neuronal (en su mayoría interneuronas y células horizontales de Cajal); así como numerosas dendritas y axones provenientes de las capas más profundas. La capa II (capa granular externa) se forma principalmente por células granulares, estrelladas y piramidales pequeñas muy compactadas; así como dendritas apicales de neuronas, cuyos somas se encuentran en las capas V y VI. La capa III (capa piramidal externa), presenta una variedad de células estrelladas pequeñas y células piramidales pequeñas y medianas, cuyas dendritas penetran en la capa I, mientras que los axones de estas se proyectan hacia la materia blanca como fibras de proyección, fibras de asociación o fibras comisurales. Además, estas células generalmente usan el neurotransmisor aspartato y glutamato, por lo que se consideran como células excitatorias (Escobar et al., 2019; Palomero-Gallagher & Zilles, 2019; Purves et al., 2018; K. Rockland, 2017).

Por otra parte, las capas profundas o internas corresponden a las capas IV, V y VI, y contienen una estructura similar. La capa granular interna (capa IV) contiene células en canasta, células candelabro y células estrelladas espinosas, neuronas de carácter inhibitorio, semejante a la capa II, aunque varía la densidad según el área sensorial en donde se encuentre. La capa piramidal interna (capa V) contiene neuronas piramidales de gran soma y las dendritas basales de las capas II y IV. Por último se encuentra la capa heterogénea de neuronas fusiformes, capa multiforme o capa de células polimorfas (capa VI), la cual presenta una gran variedad de células, con axones y dendritas perpendicularmente a la superficie de la corteza, reconocidas como fibras eferentes; así como dendritas de neuronas de capas superiores (II y III) (Escobar et al., 2019; Palomero-Gallagher & Zilles, 2019; Purves et al., 2018; K. Rockland, 2017).

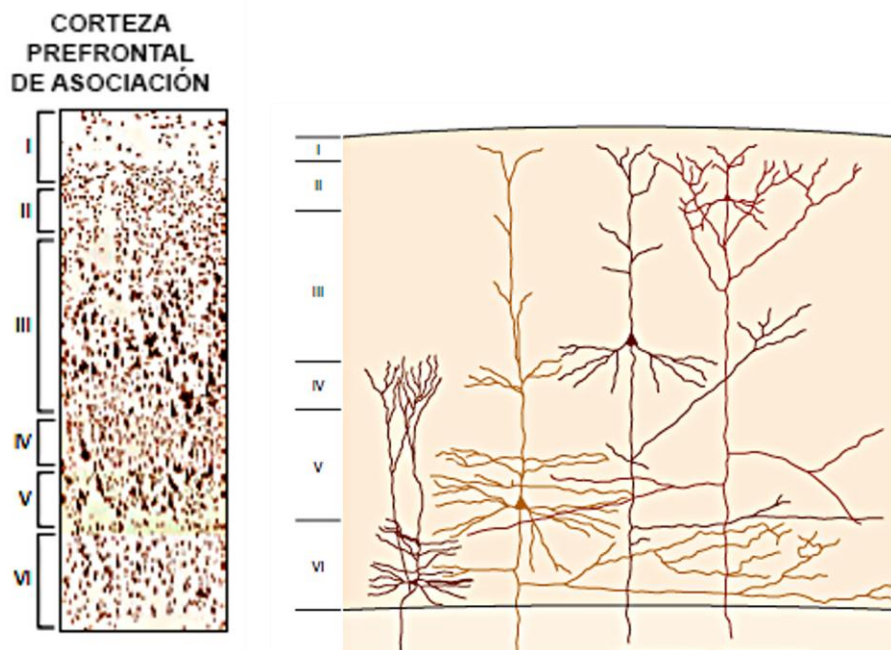


Figura 3. Organización de la corteza prefrontal. Distribución neocortical de las capas celulares en la CPF y sus proyecciones hacia diferentes partes del cerebro. Modificado de (Kandel et al., 2014).

3.3.3 FUNCIÓN Y CONEXIONES DE LA CORTEZA PREFRONTAL

La función principal de la CPF es la ejecución y representación de acciones que involucran procesos de orden cognitivo superior como evaluación, planificación, control de impulsos y toma de decisiones, denominadas funciones ejecutivas (Habib et al., 2019; Purves et al., 2018).

La región de la CPF contiene 3 regiones principales, denominadas orbitofrontal, medial y lateral; las cuales clasifican a la CPF de acuerdo con sus diferentes funciones y conexiones. La región medial tiene participación en procesos relacionados con la memoria espacial, coordinación, toma de decisiones, motivación y concentración, por lo que se le considera como un área que regula la creatividad (Miller & Cohen, 2001). La región lateral, por otra parte, proporciona la base para procesos cognitivos como el razonamiento, orientación y comportamiento; además, participa en la planeación de actividades y la organización. En cambio, la región orbital se asocia con estructuras límbicas temporales, críticas en la participación de procesos emocionales y cognición social debido a sus conexiones con la amígdala y el hipotálamo (Miller & Cohen, 2001).

Otra función ejecutiva que lleva a cabo la CPF y es importante mencionar, es el establecimiento de la memoria de trabajo. La memoria de trabajo hace referencia a la habilidad para mantener monitoreada la información de manera transitoria en la mente, suprimiendo información irrelevante; permitiendo así desarrollar las conductas dirigidas a metas u objetivos. Este tipo de conductas se caracterizan por depender de la capacidad de concentrarse en información relevante e ignorar distracciones mediante la atención selectiva, la supresión de interferencias, la evaluación de consecuencias, así como la flexibilidad de adaptarse rápidamente de acuerdo con el contexto y modificar la meta; llevando a cabo los procesos de comprensión, pensamiento, planeación y organización, con el fin de cumplir un objetivo en particular. Así, la CPF tiene una participación fundamental en la comprensión del lenguaje, aprendizaje a largo plazo y la resolución de problemas (Habib et al., 2019; Karayanidis & McKewen, 2021; Miller & Wallis, 2009).

La región de la CPF recibe fibras de carácter aferente, de carácter eferente, o fibras que interconectan las diferentes capas, proyectando casi a todas las estructuras de las que recibe información (K. S. Rockland & DeFelipe, 2018; Shipp, 2007). Las fibras ascendentes (aferentes) se relacionan con la transferencia de información sensorial. Estas fibras provienen de estructuras subcorticales (tálamo), otras áreas corticales del mismo hemisferio y de hemisferios opuestos (fibras asociativas y comisurales), así como el tallo cerebral. Las fibras penetran hasta las capas VI, IV y III; realizando sinapsis sobre diversos tipos celulares como células piramidales, estrelladas o asociativas (Escobar et al., 2019; Purves et al., 2018).

Entre las fibras aferentes y eferentes, existen circuitos intracorticales de la corteza, los cuales se consideran esenciales para los mecanismos de integración sensorial y percepción, entre otros. Por otra parte, las fibras eferentes están relacionadas con el eje encéfalo-medular y con el control sobre la actividad motora voluntaria. Las fibras eferentes corticocorticales ipsilaterales, o asociativas, y las fibras eferentes corticocorticales contralaterales, o comisurales, son los principales tractos que se pueden encontrar en la corteza. Su origen se presenta en las capas II, III, V y VI, así como en el tálamo; lo que establece un mecanismo de retroalimentación corticotalámico y talamocortical, relacionado con la regulación de fibras aferentes de la corteza y la discriminación de estímulos esenciales en la atención (Escobar et al., 2019; Purves et al., 2018).

3.3.4 ALTERACIONES DE LA CORTEZA PREFRONTAL RELACIONADAS AL TEA

Existe evidencia creciente que sugiere que en los TND se presentan alteraciones en la girificación cortical comparada con individuos neurotípicos. En la CPF de los individuos con TEA se ha encontrado una reducción de la girificación local (Gharehgzlou et al., 2022; Ha et al., 2015).

Otras alteraciones como variaciones en el volumen y grosor de diversas estructuras y regiones corticales en los individuos con TEA también se han reportado, presentando un aumento en el grosor cortical (y masa cerebral total) en los infantes y que va disminuyendo hacia la edad adulta; así como alteraciones en la asimetría izquierda-derecha del grosor cortical en la corteza frontal medial y orbitofrontal; esto se presenta como una menor aleatorización del hemisferio derecho en las funciones ejecutivas y una asimetría reducida hacia el hemisferio izquierdo en las regiones corticales relacionadas con el lenguaje, teniendo así una relación directa con la maduración cortical retrasada y la severidad de los síntomas presentes en el trastorno (Amaral et al., 2008; Khundrakpam et al., 2017; Sha et al., 2022; van Rooij et al., 2019).

Adicionalmente, se ha reportado una comorbilidad de los trastornos de migración neuronal en pacientes con TEA, siendo la displasia cortical focal (desorganización laminar cortical) una característica común en los cerebros con TEA; esto se evidencia principalmente en las capas IV y V de la neocorteza (Khundrakpam et al., 2017; Stoner et al., 2014; W. Zheng et al., 2021); mientras que en la capa III de la neocorteza se ha encontrado una reducción del ancho intercolumnar de la

minicolumnas (estructuras verticales de las capas III y V caracterizadas por empaquetamientos de los somas neuronales, asociadas a etapas tempranas del desarrollo cortical), así como un aumento en el número de estas minicolumnas, lo que puede estar relacionado a la conectividad cortical atípica en estos individuos (Amaral et al., 2008; Casanova & Opris, 2015).

Anomalías en la microestructura y volumen axonal de las neuronas de la CPF en los individuos con TEA también se han reportado y diversos factores en los cuales se encuentran el número, tamaño, densidad de empaquetamiento y orientación de los axones (Amaral et al., 2008); así como por un incremento aproximadamente del 67% de las neuronas en la CPF (79% más en la CPF dorsolateral y 29% más en la CPF medial) de los individuos con TEA (Courchesne et al., 2011).

Las alteraciones anteriormente mencionadas resaltan una serie de cambios anatómicos y moleculares (como el aumento de las fibras nerviosas y la conectividad axonal, causando conectividad poco funcional) que involucran estructuras de la corteza cerebral como la CPF y el lóbulo frontal (Solso et al., 2016), en la que se han encontrado cambios celulares relacionados con la complejidad del árbol dendrítico en individuos con TEA, los cuales presentan un incremento en la densidad de las espinas dendríticas de los cuerpos celulares presentes en las capas II, III y V, siendo mucho más evidente en la capa V en el lóbulo temporal y en la capa II en el resto de la región cortical (Hutsler & Zhang, 2010).

De igual forma, cambios en la arborización dendrítica de neuronas piramidales corticales se han reportado, indicando una disminución en la complejidad del árbol dendrítico en los individuos con TEA (Schaaf et al., 2022); lo que podría alterar la eficiencia de las conexiones cortico-corticales y cortico-subcorticales involucradas en diferentes funciones. Las alteraciones de la CPF y corteza cerebral relacionadas al TEA son variables según los estudios realizados; sin embargo, la relevancia de estos se encuentra al estar ampliamente relacionados con las deficiencias en los procesos cognitivos y conductuales característicos de las personas con este trastorno.

3.4 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL TEA

Una característica de un modelo ideal para el estudio de los trastornos humanos es la presencia de rasgos característicos de la condición, molecular y fenotípicamente, así como la eficacia de tratamientos o estrategias terapéuticas reproducibles en humanos. Debido a la heterogeneidad etiológica y clínica del TEA, diversos modelos animales se han propuesto para el estudio de procesos biológicos, celulares y moleculares en estos trastornos (Bauman et al., 2019; Ergaz et al., 2016).

Existen diferentes especies empleadas como modelos para el TEA, entre las que se encuentran primates no humanos, el pez cebra, ratas y ratones, siendo estos últimos particularmente adecuados para su estudio debido a sus aspectos conductuales bien caracterizados, fáciles de medir y más accesibles en cuanto al espacio y costo se refiere (Bauman et al., 2019; Erdoğan, 2017; Pensado-López et al., 2020).

Los modelos animales para el estudio del TEA con origen genético presentan mutaciones o variaciones en el número de copias de genes asociados al desarrollo del TEA, o en genes relacionados a síndromes comórbidos al TEA (Ergaz et al., 2016). Entre estos modelos se encuentran aquellos con alteraciones en los genes *Shank3*, *Mecp2*, *Fmr1*, *Nrxn*, *Pten*, la duplicación cromosómica en 17p11.2 y las deleciones en 15q11-q13; los cuales conservan las conductas autistas como déficits en la interacción social, problemas de comunicación, comportamientos repetitivos e intereses restringidos, lo cual permite evaluar la contribución de genes específicos a las manifestaciones fenotípicas del trastorno (Bauman et al., 2019; Bey & Jiang, 2014; Erdoğan, 2017; Varghese et al., 2017).

Los modelos inducidos forman parte de los modelos no genéticos. Estos modelos consisten en la manipulación y exposición a factores externos de daño (químicos o biológicos) que tienen un impacto en el neurodesarrollo; permitiendo realizar estudios de los factores no genéticos asociados al desarrollo del TEA. Entre estos modelos se encuentran aquellos expuestos prenatalmente al ácido valproico, la exposición a infecciones (víricas generalmente, como el virus de la enfermedad de Borna) o agentes como el lipopolisacárido que causan una activación inmune materna durante la

gestación, la cual tiene un impacto en la trayectoria del neurodesarrollo y en la conducta de las crías (Erdoğan, 2017; Ergaz et al., 2016; Varghese et al., 2017).

Los modelos endogámicos también forman parte de los modelos no genéticos para el estudio del TEA, ya que replican las características conductuales particulares de individuos con TEA (Ergaz et al., 2016; Varghese et al., 2017). Estos modelos manifiestan las conductas asociadas al TEA de manera espontánea, sin intervenciones genéticas específicas o inducidas por compuestos químicos, sino que se desarrollan a través de cruces endogámicos. Dentro de estos modelos se encuentran la cepa BTBR, en la que se han reportado anomalías estructurales y alteraciones neuronales; la cepa BALB/cByJ, con déficits sociales muy marcados; y la cepa C58/J, caracterizada por un fenotipo autista muy pronunciado y la presencia de SNPs en genes cuyos ortólogos en humanos se asocian a un riesgo elevado de presentar TEA (Barón Mendoza, 2022; Meyza & Blanchard, 2017; Moy et al., 2014; Varghese et al., 2017).

3.4.1 LA CEPA MURINA C58/J COMO MODELO DE ESTUDIO DEL TEA

La cepa C58/J fue desarrollada en 1921 por McDowell por el cruce endogámico consecutivo de las camadas 52 y 58 de la cepa C57BL/6 de la reserva Lathrop (Flurkey, 2009). El perfil conductual de esta cepa refleja los síntomas centrales de individuos con TEA, lo que incluye a los déficits sociales, déficits en la comunicación y la estereotipia motora (comportamientos restringidos y repetitivos) que aparecen en el desarrollo temprano (día postnatal 6) y persisten hasta la edad adulta (Moy et al., 2014; Ryan et al., 2010). Por ejemplo, esta cepa se caracteriza por la presencia de comportamientos repetitivos y restringidos como saltos verticales, volteretas hacia atrás, escalada en paredes y acicalamientos exacerbados (Blick et al., 2015; Moy et al., 2014; Ryan et al., 2010; Wilkes et al., 2019). Adicionalmente, la cepa ha mostrado perfiles de hiperactividad; preferencia por un mismo objeto; disminución en la transmisión de preferencia o rechazo (neofobia) a alimentos desconocidos; así como un bajo desempeño en la prueba de T, relacionado a déficits en procesos cognitivos de memoria y aprendizaje (Blick et al., 2015; Moy et al., 2008; Ryan et al., 2010).

Se ha reportado que los ratones de la cepa C58/J, al compararlos con ratones de la cepa C57BL/6J, muestran una disminución del volumen cerebral total; así como una disminución relativa del

volumen de estructuras de la corteza de asociación frontal como la corteza motora, corteza orbital, corteza cingulada, corteza somatosensorial, corteza entorrinal, hipotálamo y giro dentado (GD); y un aumento relativo de volumen en estructuras como hipocampo, cuerpo calloso, corteza cerebelosa y médula (Wilkes et al., 2019).

En cuanto al perfil genético de la cepa, datos reportados han mostrado que se caracteriza por la presencia de mutaciones en la cadena alfa del receptor a interleucina 3 (IL-3R) y en genes involucrados principalmente con funciones neuronales (como *Cntnap2*, *Disc1* y *Slc6a4*); y presencia de SNPs en 454 genes, al compararse con el genoma de la cepa murina C57BL7/6J. Al menos once de esos genes tienen genes ortólogos en humanos que se han asociado al desarrollo del TEA (*Nf1*, *Slc6a4*, *Map1a*, *Ntrk2*, *Myo9b*, *Cntnap2*, *Plcb1*, *Vill*, *Atp2b2*, *Lrp1*, *Esr2*), los cuales están involucrados en procesos de neurogénesis, diferenciación neuronal y en la respuesta a estímulos inmunológicos (Barón-Mendoza et al., 2021; Moy et al., 2014). En conjunto, estas alteraciones podrían repercutir en las deficiencias de las funciones cognitivas de orden superior y conductas tipo autista que los ratones presentan.

Adicionalmente, datos de nuestro laboratorio han reportado que los ratones adultos de la cepa C58/J con fenotipo autista presentan una menor complejidad del árbol dendrítico de neuronas piramidales en el hipocampo y la CPF (Barón-Mendoza et al., 2019). Adicionalmente, en nuestro grupo se ha reportado que estos ratones presentan una menor densidad de espinas dendríticas en la región de la CPF; así como un mayor número de espinas dendríticas inmaduras según su morfología en el hipocampo y una disminución en el contenido de la neurotrofina BDNF en la misma región, cuando se le compara con una cepa control (Barón-Mendoza et al., 2021).

También hemos observado alteraciones relacionadas a las células gliales en la cepa C58/J con fenotipo autista. Se encontró que existe una disminución en la densidad de astrocitos en la región CA1 del hipocampo y GD, y un aumento en la densidad de la microglía en las mismas subregiones; así como alteraciones en la distancia intercelular de astrocitos y microglía, implicando una desregulación de la distribución espacial de estas células en el hipocampo. El contenido de las proteínas GFAP, TSP-1 y MCP-1 también se encuentra desregulado en el hipocampo de los ratones de la cepa con fenotipo autista, comparados con una cepa control, además de que existen cambios

en la morfología de la microglía (Duarte-Campos, 2020), lo cual en conjunto sugiere que las poblaciones de células gliales en los ratones C58/J se encuentran desreguladas, sin embargo, estos cambios no han sido extensamente evaluados en otras regiones del SNC diferentes al hipocampo.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El TEA es un trastorno del neurodesarrollo, el cual se detecta durante los primeros años de vida y persiste hasta la adultez. Este trastorno presenta una etiología heterogénea, compleja y multifactorial, que permanece sin estar descrita en su totalidad. Las alteraciones inmunológicas así como la desregulación de la población de células de la microglía son características biológicas ampliamente descritas en los sujetos con TEA, sin embargo, su implicación etiológica es poco clara.

El uso de modelos animales, particularmente la cepa murina con fenotipo autista C58/J, puede contribuir al entendimiento de las características biológicas del TEA, y explorar la relación que estas guardan con la aparición de las conductas particulares del trastorno. En esta cepa de ratones existen alteraciones en las poblaciones gliales en hipocampo, donde se ha encontrado un aumento en la densidad de la microglía, así como en el contenido de la citocina proinflamatoria IFN- γ y de la quimiocina MCP-1. Sin embargo, es necesario evaluar la contribución de la microglía en otras regiones cerebrales debido a su importancia en la homeostasis cerebral. Así, la evaluación de la microglía y del contenido de citocinas en la CPF en esta cepa permitirá establecer paralelismos con los estudios en individuos con TEA, y evaluar a fondo la contribución de la microglía en el origen y desarrollo del TEA.

5. HIPÓTESIS

Los ratones de la cepa C58/J exhibirán un aumento en la densidad de la microglía en la corteza prefrontal; así como un aumento en el contenido de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ en esa misma región, en comparación con una cepa neurotípica.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de cambios en la densidad y distribución de la microglía, así como en el contenido de citocinas proinflamatorias en la corteza prefrontal de ratones de la cepa C58/J en comparación con ratones de una cepa neurotípica.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

En la CPF de ratones macho adultos de 10 semanas de edad de las cepas C58/J (fenotipo autista) y C57BL/6J (neurotípica), se realizará lo siguiente:

- Determinar el contenido de las proteínas IBA-1 y TMEM119.
- Analizar sistemáticamente la densidad y distribución de la microglía.
- Cuantificar las citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ .

7. METODOLOGÍA

7.1 ANIMALES

Las cepas de ratones C57BL/6J (silvestre o neurotípica, también llamada B6/J) y C58/J (fenotipo autista) fueron adquiridas en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, E.U.A.). Ambas cepas permanecieron en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su reproducción. Se mantuvieron bajo condiciones estándar (temperatura: $22 \pm 2^\circ\text{C}$; humedad relativa: $44 \pm 10\%$; ciclo luz:oscuridad 12:12) en cajas ventiladas individualmente, con cama de aserrín estéril (ENVIGO), dieta comercial peletizada y agua *ad libitum* hasta su uso en la décima semana de vida (adultez temprana).

En total, se usaron 6 ratones macho de 10 semanas de edad de cada cepa ($n = 6$) para la obtención de tejido cerebral fresco, determinación de masa y cuantificación de proteínas; y 3 ratones macho de 10 semanas de edad de cada cepa ($n = 3$) para la obtención de tejido perfundido, cortes y tinciones histológicas.

El mantenimiento, uso y manejo de los animales se realizó de acuerdo con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio); con la aprobación del Comité Institucional del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL, ID 189) de la UNAM.

7.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IBA-1 Y TMEM119 EN LA CPF DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA

7.2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CORTEZA PREFRONTAL Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se obtuvieron los cerebros y se disecaron las cortezas prefrontales de los ratones de ambas cepas ($n = 6$) tras haber sido anestesiados y sacrificados bajo los lineamientos especificados en las Normas AVMA (*Asociación Americana de Medicina Veterinaria* por sus siglas en inglés) para la Eutanasia en Animales (Steven Leary et al., 2020) y con las directrices del estándar oficial mexicano para la protección animal (NOM-067-ZOO-1999). Posteriormente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta ser procesadas.

Las estructuras se homogeneizaron en 300 μL de amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas (RIPA); las proteínas totales se obtuvieron por centrifugación a 14,000 rpm, a 4°C por 30 minutos y se cuantificaron por el método colorimétrico de Bradford en un espectrofotómetro EPOCH (a 595 nm) para microplacas (Thermo Fisher Scientific Inc., E.U.A.). Los homogeneizados proteicos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

7.2.2 ELECTROFORESIS EN GEL Y WESTERN BLOT

20 μg de los homogeneizados proteicos se mezclaron con amortiguador Laemmli y se incubaron a 100°C por 10 minutos. Las proteínas se separaron por electroforesis en SDS-PAGE en geles de 15%, a 80 mV. Se incluyó el marcador de peso molecular teñido Precision Plus Protein TM Dual Color Standards (Bio-Rad, California, E.U.A.) para la determinación del peso molecular. El contenido de cada uno de los geles se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en condiciones semisecas durante 2 horas a 0.06 A por membrana.

La membrana se sumergió en una solución de bloqueo con albúmina 2% y leche 3% en TBS 1X durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario IgG policlonal de conejo anti-IBA-1 (1:750; FUJIFILM Wako Chemicals, E.U.A.) o con el anticuerpo primario IgG monoclonal de conejo anti-TMEM119 (1:1000; Abcam, Cambridge) durante 24 horas a 4°C. Pasadas las 24 horas, se incubó con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo (1:15000; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), por 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate; Thermo Scientific, Massachusetts, E.U.A.) y las membranas se revelaron por autorradiografía.

Para validar el control de carga después de la detección de IBA-1 y TMEM119, los complejos antígeno-anticuerpo presentes en la membrana se disociaron al incubar la membrana con un amortiguador ácido de glicina (pH 2.5) por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó el bloqueo como se describió anteriormente; las membranas se incubaron con el anticuerpo primario IgG monoclonal de ratón anti-Tubulina alpha (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) o con el anticuerpo primario IgG monoclonal de ratón anti-GAPDH (1:200; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) por 24 horas a 4°C; y con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (1:30000; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) por 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación constante; seguido del revelado por autorradiografía.

Entre cada uno de los pasos del procedimiento se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno y en agitación constante, usando TBS-Tween 0.1% a temperatura ambiente.

7.3 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA MICROGLÍA EN LA CORTEZA CEREBRAL DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA

7.3.1 PERFUSIÓN Y OBTENCIÓN DE CEREBROS

A las 10 semanas de edad, los ratones de las cepas C57BL/6J y C58/J (n = 3) se anestesiaron y sacrificaron de acuerdo a los lineamientos especificados en las Normas AVMA (*Asociación*

Americana de Medicina Veterinaria por sus siglas en inglés) para la Eutanasia en Animales (Steven et al., 2020). Posteriormente, se perfundió a cada uno de los ratones con 60 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS) 1x y con 60 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Una vez perfundidos los animales, se decapitaron y se extrajeron los cerebros. Cada uno de los cerebros permanecieron en una solución de PFA al 4% por 24 horas a 4°C; posteriormente, se les sumergió en un gradiente de sacarosa (10%, 20% y 30% por 24 horas cada solución a 4°C) para deshidratarlos y almacenarlos a -70°C hasta su uso.

7.3.2 CORTES DE TEJIDO CEREBRAL Y TINCIÓN DE NISSL

Se realizaron cortes coronales del cerebro para obtener muestras de la región de la corteza prefrontal, de 20 µm de grosor a -22°C, haciendo uso de un criostato (Leica CM1850) y del medio FSC 22™ Surgipath® (Leica Microsystems) donde se incluyeron los cerebros. Posterior al corte, se montaron en un portaobjetos para microscopio y se mantuvieron a 4°C hasta su tinción.

Los cortes obtenidos se hidrataron en PBS 1X durante 3 minutos. Posteriormente, se sumergieron en colorante violeta de Cresilo 0.5% por 5 minutos más, seguido de 1 minuto sumergidos en agua ultra purificada Milli-Q®. En los 6 minutos siguientes, los cortes de tejido se sumergieron sucesivamente en etanol 70%, etanol 96%, etanol absoluto y xileno, 1.30 minutos en cada una de las soluciones. Por último, se colocó un cubreobjetos sobre los portaobjetos con los cortes de tejido utilizando el medio CytoSeal™ 60.

7.3.3 INMUNOFLUORESCENCIAS

Los cortes de cerebro montados en los portaobjetos se hidrataron en PBS 1X por 10 minutos; posteriormente, se sumergieron por 30 minutos en una solución 10 mM de citrato de sodio a 90°C y se dejaron enfriar a temperatura ambiente en la misma solución por 30 minutos más. Los cortes se permeabilizaron y bloquearon con suero de cabra al 5% por 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Después, se incubó 24 horas con el anticuerpo primario IgG policlonal de conejo anti-IBA-1 (1:750; FUJIFILM Wako Chemicals, E.U.A.) a 4°C; seguido de 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario IgG de cabra Alexa Fluor® 594 (AF594) anti-conejo (1:20; Life Technologies, Oregón, E.U.A.) a temperatura ambiente y en oscuridad; y 10 minutos de incubación

con Hoechst 33342 (1 $\mu\text{m}/\text{mL}$; Thermo Specifics; Massachusetts, E.U.A.) a temperatura ambiente y en oscuridad. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda; y se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno y en agitación constante para cada uno de los pasos de la inmunofluorescencia, usando PBS-Tween 0.1% a temperatura ambiente. Al finalizar las inmunofluorescencias, se fijaron las laminillas con medio de montaje no fluorescente Fluoromount-G[®] Mounting Medium (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, E.U.A.).

7.3.4 MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES. ANÁLISIS DE LA DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LA MICROGLIA

La visualización de las muestras se llevó a cabo usando un microscopio de epifluorescencia Olympus Bx43 (Pennsylvania, E.U.A.) acoplado a una cámara fotográfica Micro-Publisher 5.0 RTV (QImaging), y el microscopio de fluorescencia Olympus IX71 (Pennsylvania, E.U.A.) acoplado a una cámara fotográfica Evolution VF(MediaCybernetics); así como con el uso del software ImagePro Plus 7.0 (MediaCybernetics). Se capturaron imágenes de 6 campos por cada corte, 3 campos de cada uno de los hemisferios (derecho e izquierdo) de la corteza prefrontal (**Figura 4**), con un aumento de 20x (Olympus WHN10x-H22; Olympus 40 UPlanFLN 20x).

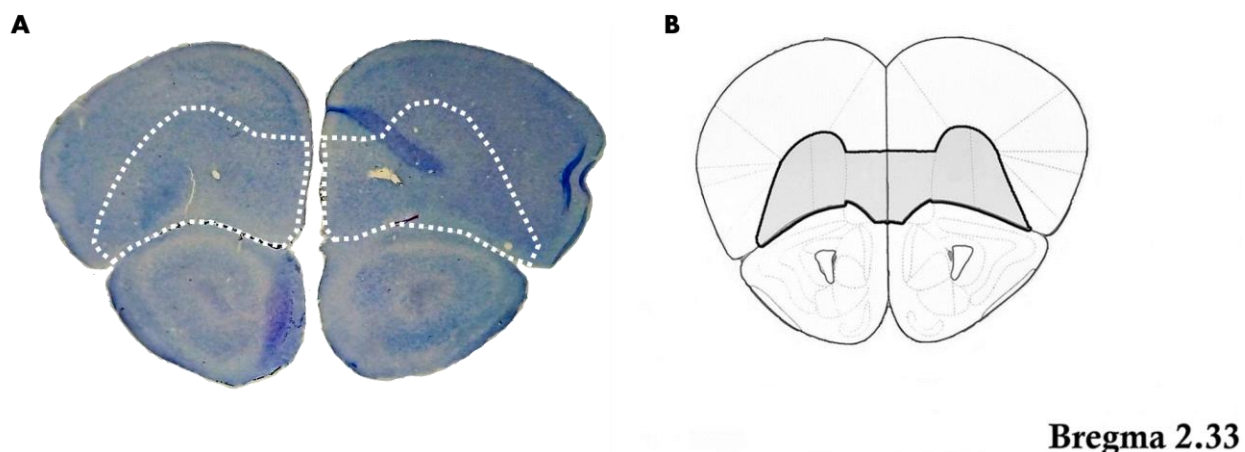


Figura 4. Localización de la corteza prefrontal. Imágenes representativas de la región de la corteza prefrontal de ratón que fue estudiada en el presente trabajo. Un corte teñido con la región de interés (A) y una imagen representativa relativa a bregma 2.33 mm (B). Modificado de Barón-Mendoza, et al., 2018.

Para analizar las imágenes obtenidas, se usaron los softwares Adobe® Photoshop® CS6 (v. 13.0 x32; Adobe Systems Incorporated) e ImageJ (v. 1.46r; National Institutes of Health, E.U.A), donde se realizó la determinación del número de células IBA-1⁺, el área y la distancia más cerca al vecino (Nearest Neighbor Distance, NND).

El análisis de distribución espacial se realizó evaluando la NND de las células IBA-1⁺ (ver anexo I) de acuerdo al protocolo descrito por González Ibañez y colaboradores (González Ibanez et al., 2019⁺). Se empleó el complemento del software ImageJ denominado de la misma forma (NDD) para calcular la NND de cada célula IBA-1⁺ en un sistema de múltiples partículas (**Figura 5A, 5B y 5C**).

Posteriormente, se realizó una aproximación (36 imágenes en total correspondientes a 6 cortes de la CPF; 3 por cada cepa de ratón) del cálculo del valor HSI para determinar la tendencia de distribución (formación de clústeres) de la microglía (Endo et al., 2021), empleando el software RStudio 1.3 con base en el código fuente *get_clust_tendency*. Se adaptó el Índice Hopkins Skellam (HSI) para analizar la distribución del soma de la microglía a partir de la siguiente ecuación:

$$HSI = \frac{\sum_{i=1}^N r_{1i}^2}{\sum_{i=1}^N r_{2i}^2}$$

Donde r_1 es la distancia de un punto al azar hasta la célula más cercana, r_2 es la distancia de una célula al azar hasta la célula más cercana, y N es el tamaño de muestra. Esto permite obtener un valor HSI en un rango de 0 a 1 (el rango del valor HSI varía de acuerdo al código fuente con el que es calculado el índice), donde un valor $HSI < 0.5$, cercano a 0 indica un patrón de distribución regular, un valor $HSI = 0.5$ indica un patrón de distribución aleatorio, o un patrón de distribución agregado cuando se obtiene un valor $HSI > 0.5$, cercano a 1 (**Figura 5D**).

Empleando el mismo software, se utilizó el algoritmo *K-means* para determinar el número de clústeres en la imagen, donde el centro de estos, el centroide, representa la media del grupo y cada grupo es adicionado a su centroide más cercano. El número óptimo de clústeres fue determinado por los métodos "kl", "ch", "hartigan", "ccc", "scott", "marriot", "trcovw", "tracew", "friedman", "rubin", "cindex", "db", "silhouette", "duda", "pseudot2", "beale", "ratkowsky", "ball", "ptbiserial",

"gap", "frey", "mcclain", "gamma", "gplus", "tau", "dunn", "hubert", "sdindex", "dindex" y "sdbw", excepto “Gamma”, “Gplus” y Tau”; y se tomó el mejor número por mayoría (regla de la mayoría).

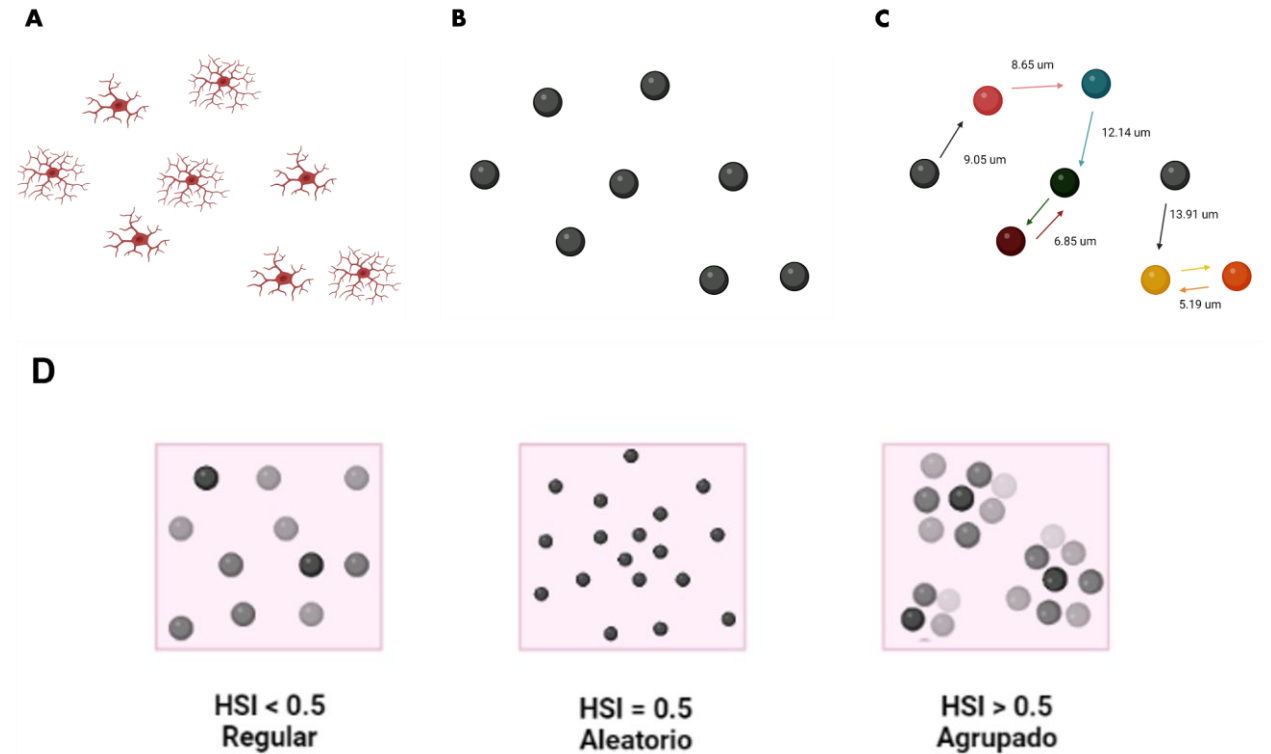


Figura 5. Análisis de NND y HSI. Se observan células de la microglía (A) como partículas (B). El complemento del software ImageJ calcula la distancia entre cada una de las partículas y su vecino más cercano, obteniendo una distancia conocida por cada una de las partículas o células que se encuentran en la imagen (C). El análisis de Hopkins-Skellam Index (HSI) se realiza al obtener un valor por imagen (D), este valor indica si existe una tendencia a formar agrupaciones (clústeres) en la distribución de los objetos en el espacio.

7.4 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE CITOCINAS EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA

7.4.1 ELISA: TNF- α e IFN- γ

Los niveles de las citocinas TNF- α e IFN- γ de la corteza prefrontal de los cerebros de los ratones ($n = 6$) de ambas cepas se determinaron mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Las muestras de tejido fresco obtenidas después de la eutanasia se procesaron individualmente al adicionar 300 μL de amortiguador de lisis con inhibidores de

proteasas (RIPA); seguido de centrifugación a 14000 rpm, a 4°C por 15 minutos, se recuperó el sobrenadante almacenaron los homogeneizados de proteína a -20°C hasta su uso.

Las muestras se incubaron en placas de 96 pozos sensibilizadas previamente con anticuerpo de captura para TNF- α e IFN- γ (DuoSet ELISA kit Mouse, R&D Systems, Minneapolis, E.U.A.) por 24 horas a 4°C. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo de detección por 2 horas a temperatura ambiente. Cada paso después de la adición del anticuerpo se realizaron tres lavados con la solución de lavado PBS-Tween 20® 0.05% usando 200 μ l por pozo.

Los complejos antígeno-anticuerpo adheridos a la placa se detectaron usando la solución de revelado 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB):H₂O₂ 1:1, así como H₂SO₄ 2N para detener la reacción. Se determinaron las densidades ópticas usando un espectrofotómetro EPOCH (BioTek; E.U.A.) a 450 nm y 570 nm, analizando por duplicado cada una de las muestras. La sensibilidad de detección usada fue de 15.62 pg/mL (dilución 1:2) para los analitos mencionados previamente. Los resultados obtenidos se reportaron con respecto al peso del tejido (pg de citocina / mg de tejido).

7.5 COMPARACIÓN DE LOS GENES RELEVANTES PARA LA IDENTIDAD DE LA MICROGLÍA VS GENES ASOCIADOS AL RIESGO DE PRESENTAR TEA (SFARI).

A partir de los chips de genes propuestos por Butovsky y colaboradores (Butovsky et al., 2014), y por Madore y colaboradores (Madore et al., 2020); los cuales contienen 400 genes relacionados con la identidad de la microglía (MG400) y 150 genes adicionales (MG550) relacionados con procesos inflamatorios y de fagocitosis en humanos y ratones; se seleccionaron aquellos genes que se presentan en ambos chips.

Posteriormente, se contrastaron con los genes reportados en la base de datos de Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI, <https://gene.sfari.org/>) donde se comparó cada uno de estos genes presentes en ambos chips, para obtener coincidencias sobre el riesgo asociado de cada gen con la presencia de alguna forma de TEA. Sólo se muestran aquellos genes con presencia en ambos chips (MG400 y MG550) que coinciden con la base de datos de SFARI.

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se evaluaron con el uso del software GraphPad Prism (v.7.04; GraphPad Software, Inc). Se aplicó una prueba de normalidad a todos los datos obtenidos, posteriormente se utilizó la prueba estadística paramétrica t de Student para muestras no pareadas, y la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras no pareadas para el análisis estadístico. Los resultados se presentan a continuación como la media \pm error estándar de la media (EEM); y los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

8. RESULTADOS

8.1 CONTENIDO DE PROTEÍNA IBA-1 Y TMEM119 EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA

Se determinó la masa cerebral total y de la CPF de los ratones C58/J y de la cepa neurotípica, para obtener una relación entre ambas masas; ya que se ha reportado que en algunos individuos con TEA se presenta un agrandamiento cerebral anormal durante el desarrollo postnatal temprano, caracterizado por una notable diferencia a los 2 años de edad comparado con aquellos individuos neurotípicos (Hazlett et al., 2017; Schumann et al., 2010). En esta relación masa CPF/masa cerebral total no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, se observó una tendencia de esta relación a aumentar en los ratones con fenotipo autista (B6/J: 0.085 ± 0.01356 ; C58/J: 0.121 ± 0.01203 ; $p = 0.0792$) (**Figura 6**).

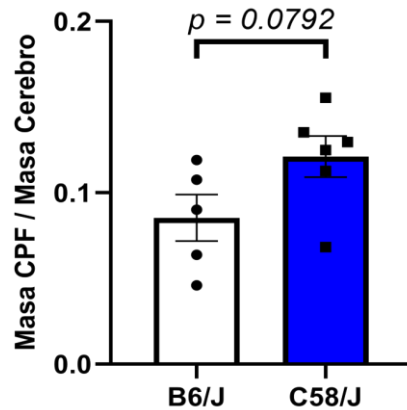


Figura 6. Relación de la masa de la CPF con la masa cerebral total en ratones con fenotipo autista. Se observa una tendencia al incremento de la relación en ratones con fenotipo autista (C58/J) en comparación con ratones neurotípicos (B6/J). Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; n= 5 B6/J, 6 C58/J. El análisis se realizó empleando la prueba paramétrica t de Student para muestras no pareadas. n.s.= no significativo.

Posteriormente, se estudió el contenido de las proteínas IBA-1 y TMEM119 (ambas expresadas por células de la microglía, y en el caso de TMEM119, de manera específica por esta población celular) para evaluar las posibles diferencias en la población de células de la microglía en la CPF de ratones con fenotipo autista (C58/J) con respecto a ratones neurotípicos.

No existen cambios en el contenido de la proteína IBA-1 en la CPF de los ratones con fenotipo autista en comparación con los ratones de la cepa C57BL/6J (B6/J: 1.000 ± 0.06164 ; C58/J: 1.431 ± 0.1961 ; $p = 0.1020$) (**Figura 7 A,B**).

En el caso de la proteína TMEM119; tampoco se observó una diferencia significativa (B6/J: 1.000 ± 0.1905 ; C58/J: 1.449 ± 0.1733 ; $p = 0.1564$) de la proteína en la CPF de los ratones con fenotipo autista en comparación con los ratones de la cepa C57BL/6J (**Figura 7 C,D**).

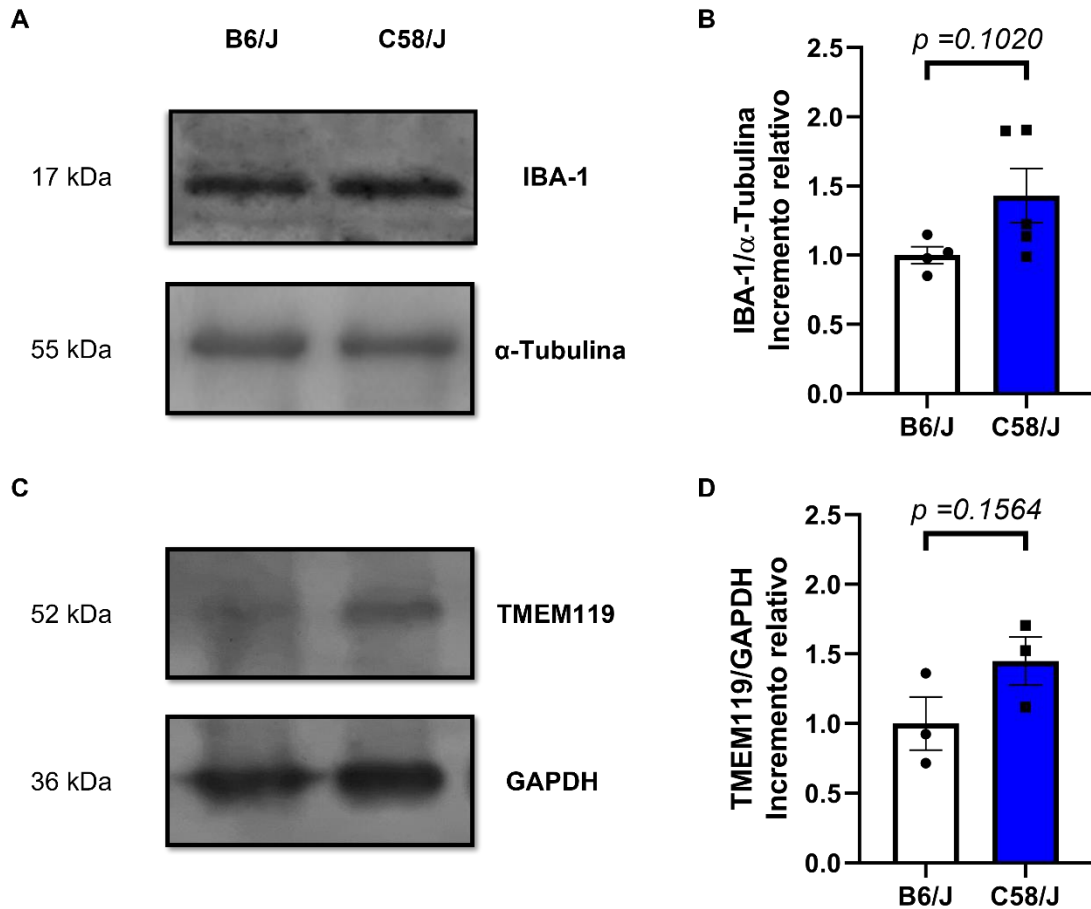


Figura 7. Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista no muestran cambios en el contenido de las proteínas de la microglía IBA-1 y TMEM119 en la CPF. A) Imagen representativa del *western blot* de la proteína IBA-1 en la corteza prefrontal de ratones con fenotipo autista (C58/J) y neurotípicos (B6/J). Se utilizó la proteína α -tubulina como control de carga. B) Análisis densitométrico del *western blot* de la proteína IBA-1. C) Imagen representativa del *western blot* de la proteína TMEM119 en la corteza prefrontal de ratones con fenotipo autista (C58/J) y neurotípicos (B/6J). Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. D) Análisis densitométrico del *western blot* de la proteína TMEM119. Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; n = 4 B6/J, 5 C58/J (IBA-1); 3 B6/J, 3 C58/J (TMEM119). El análisis estadístico se realizó empleando la prueba paramétrica t de Student de dos colas para muestras no pareadas.

8.2 DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA MICROGLÍA EN LA CORTEZA CEREBRAL DE RATONES CON FENOTIPO AUTISTA

A pesar de no encontrar cambios en el contenido de las proteínas TMEM119 e IBA-1 a través de *western blot* en la CPF, se decidió evaluar el número de células de la microglía en relación al área (densidad) en la corteza prefrontal de los ratones con fenotipo autista (C58/J) mediante inmunofluorescencia.

Reportes sobre la microglía indican que, en diferentes regiones del SNC se encuentra una heterogeneidad fenotípica y de distribución, específicamente la corteza es una de las regiones con mayor densidad de estas células en condiciones homeostáticas (Tan et al., 2019); además de presentar alto grado de homogeneidad de morfología y distribución entre capas, así como en la expresión de IBA-1 en el cerebro intacto de rata (Kongsui et al., 2014). En nuestros resultados observamos un aumento cualitativo de la señal positiva a IBA-1 en la CPF de los ratones C58/J, lo que podría relacionarse con un aumento de la densidad celular (**Figura 8**).

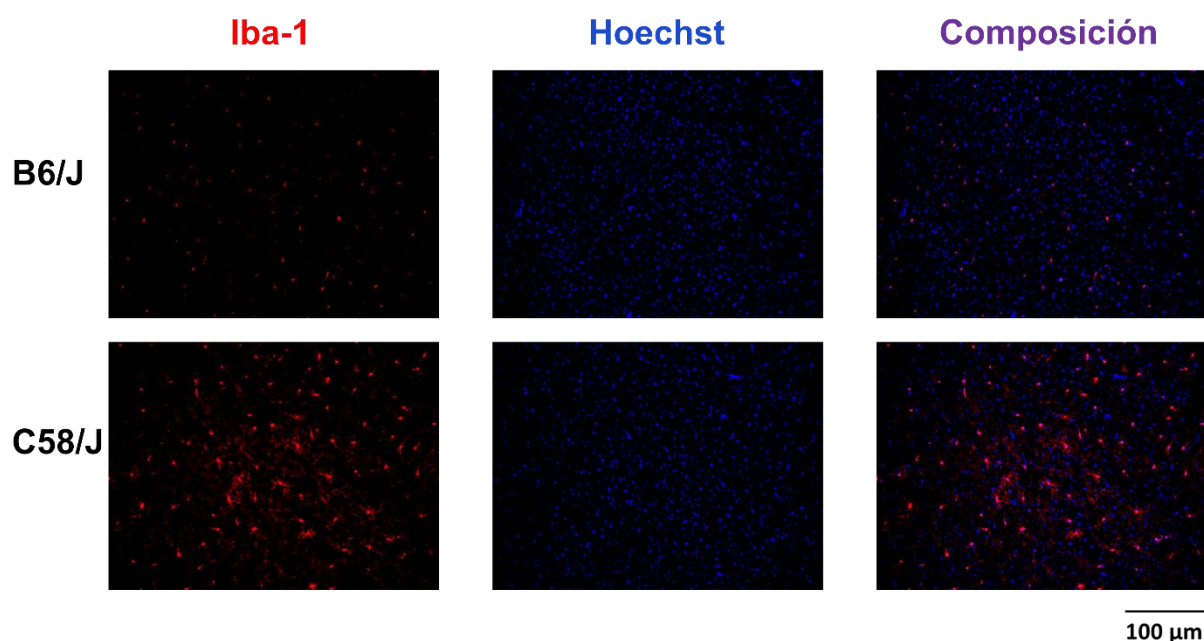


Figura 8. Imágenes representativas de la microglía en la CPF de ratones con fenotipo autista y neurotípicos. Se observan imágenes representativas de la región de la corteza prefrontal de ambas cepas. La microglía fue evaluada a través de la expresión de la proteína IBA-1 (AF594, rojo). Para la identificación de los núcleos se empleó Hoechst 33364 (azul). Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 20x.

Al cuantificar las células IBA-1⁺ (**Figura 8**) se confirmó la presencia de un aumento de la densidad celular en la CPF de los ratones con fenotipo autista en comparación con la cepa neurotípica, la cual muestra una diferencia significativa (B6/J: 649.248 ± 12.72 células IBA-1⁺/mm²; C58/J: 791.606 ± 14.42 células IBA-1⁺/mm²; $p < 0.0001$) (**Figura 9A**).

Adicionalmente, se ha reportado en la literatura que cuando existe una activación y densidad microglial alterada en los individuos con TEA, se exhibe un patrón de distribución alterado en diversas regiones del SNC (Morgan et al., 2012; Suzuki et al., 2013), el cual podría estar asociado a cambios en la migración y la proliferación de la microglía, así como una mayor producción de quimiocinas y citocinas por la diversas células como la microglía reactiva. Por lo anterior, decidimos evaluar la distribución espacial de la microglía en la CPF determinando la distancia más cercana al vecino (NND) que existe de cada una de las células IBA-1⁺, encontrando una disminución significativa de esta distancia (B6/J: $23.997 \pm 0.08428 \mu\text{m}$; C58/J: $21.9085 \pm 0.07118 \mu\text{m}$; $p < 0.0001$), es decir, las células IBA-1⁺ se encuentran más cerca una de otra, en los ratones de la cepa C58/J comparados con la cepa C57BL/6J (**Figura 9B**).

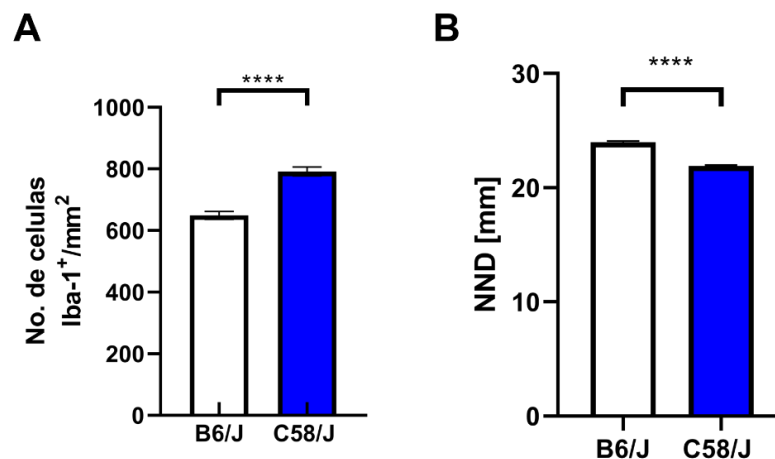


Figura 9. Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista muestran un aumento en la densidad y una distancia más cercana al vecino (NND) menor entre células IBA-1⁺. A) Número de células IBA-1⁺ por mm² y B) la NND en la corteza prefrontal de ratones con fenotipo autista (C58/J) y neurotípicos (B6/J). Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; $n = 3$ por grupo. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba no paramétrica Mann-Whitney para muestras no pareadas. **** $p < 0.0001$.

Se ha observado que cuando las células IBA-1⁺ tienen una distribución espacial alterada, particularmente las células de la microglía, puede existir una formación anómala de agrupamientos o clústeres en diferentes regiones del cerebro (Endo et al., 2021; Morgan et al., 2012). En nuestros resultados observamos que existe una diferencia en la NND de la microglía, por lo que para determinar si existen clústeres en la CPF, se obtuvo el índice HSI que indica la tendencia a la formación de clústeres, encontrando que no existen diferencias significativas entre los ratones con

fenotipo autista y los ratones de la cepa C57BL/6J (B6/J: 0.5752 ± 0.03659 ; C58/J: 0.5906 ± 0.03819) (**Figura 10A**).

Posteriormente, al no observar diferencias significativas en el índice HSI, se obtuvo el número óptimo de clústeres para determinar cuán grande es la diferencia en el índice HSI, es decir, cual es la diferencia en la tendencia a la formación de clústeres entre ambas cepas. En tal caso tampoco se observaron diferencias significativas (B6/J: 2.765 ± 0.8314 ; C58/J: 3.111 ± 1.079); sin embargo, la cepa con fenotipo autista muestra una tendencia a presentar más agrupamientos comparado con la cepa neurotípica (**Figura 10B**). Un ejemplo de estos agrupamientos se puede observar en la **figura 11**.

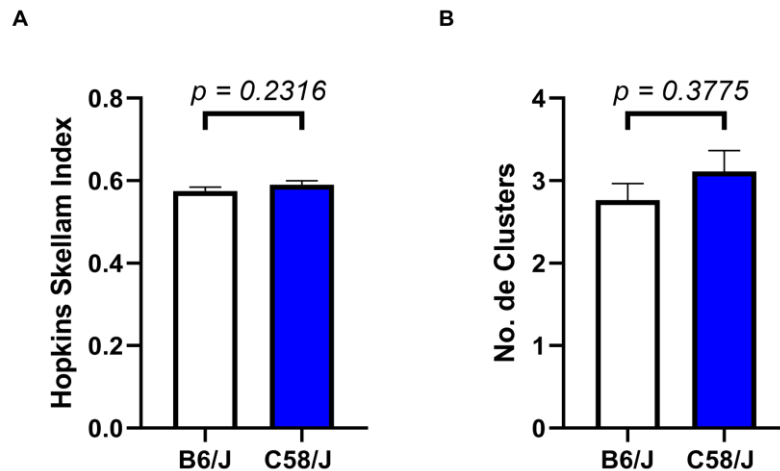


Figura 10. HSI y número de agrupamientos de la microglía de los ratones con fenotipo autista y neurotípicos. A) Índice HSI de células IBA-1+ y B) el número de agrupamientos (clústeres) en la corteza prefrontal de ratones con fenotipo autista (C58/J) y neurotípicos (B6/J). Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; $n = 3$ cortes de CPF por grupo. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba paramétrica t de Student de dos colas para muestras no pareadas y la prueba no paramétrica Mann-Whitney para muestras no pareadas.

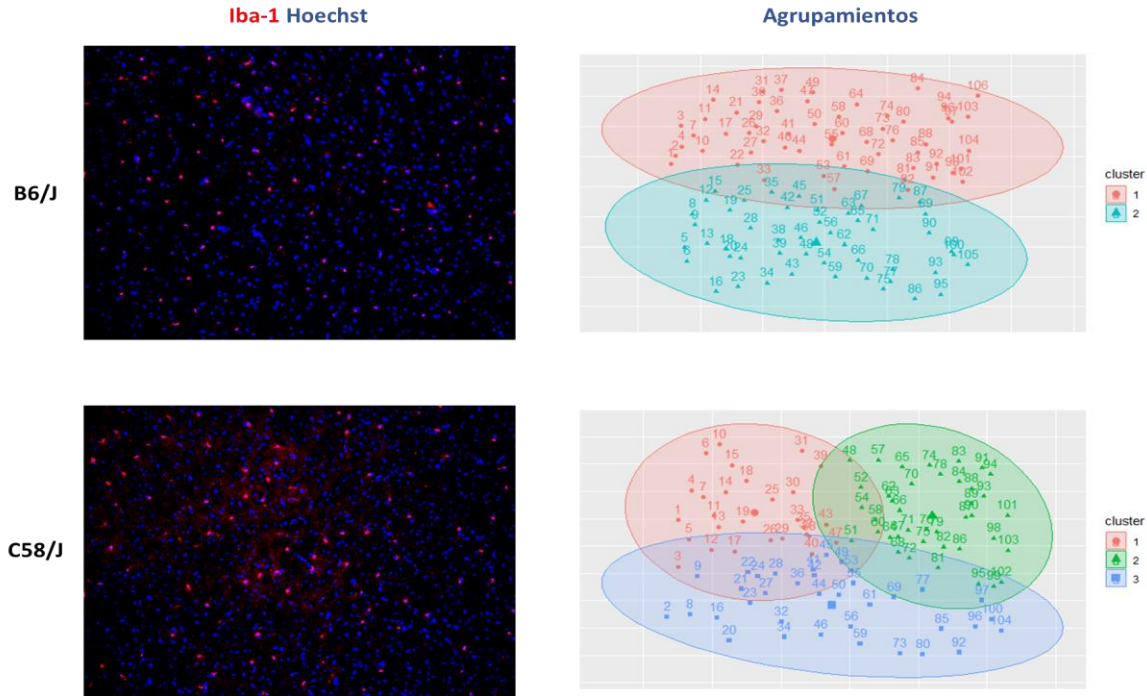


Figura 11. Imágenes representativas de los agrupamientos de la microglía en la CPF de ratones con fenotipo autista y neurotípicos. Se observan imágenes representativas de la CPF de ambas cepas, con la expresión de la proteína IBA-1 (AF594, rojo) para la microglía y de Hoechst 33364 (azul) para los núcleos. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 20x. El número óptimo de agrupamientos (clústeres) se observa del lado derecho para cada imagen de ambas cepas.

8.3 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS

Dado que se ha reportado que las células de la microglía son las principales células productoras de mediadores proinflamatorios en el SNC (Davoli-Ferreira et al., 2021), se decidió evaluar el contenido de dos citocinas proinflamatorias como una aproximación para conocer el estado inflamatorio en esta región cerebral de los ratones con fenotipo autista.

Contrario a lo esperado, se encontró que existe una disminución significativa en el contenido de TNF- α (B6/J: 1.527 ± 0.2105 pg/mg; C58/J: 0.9667 ± 0.08815 pg/mg; $p = 0.0340$) (**Figura 10A**), mientras que en el contenido de la citocina IFN- γ no se observaron diferencias en la CPF de los ratones C58/J comparados con la cepa neurotípica (B6/J: 0.400 ± 0.06919 ; C58/J: 0.2967 ± 0.04137 ; $p = 0.2288$) (**Figura 10B**).

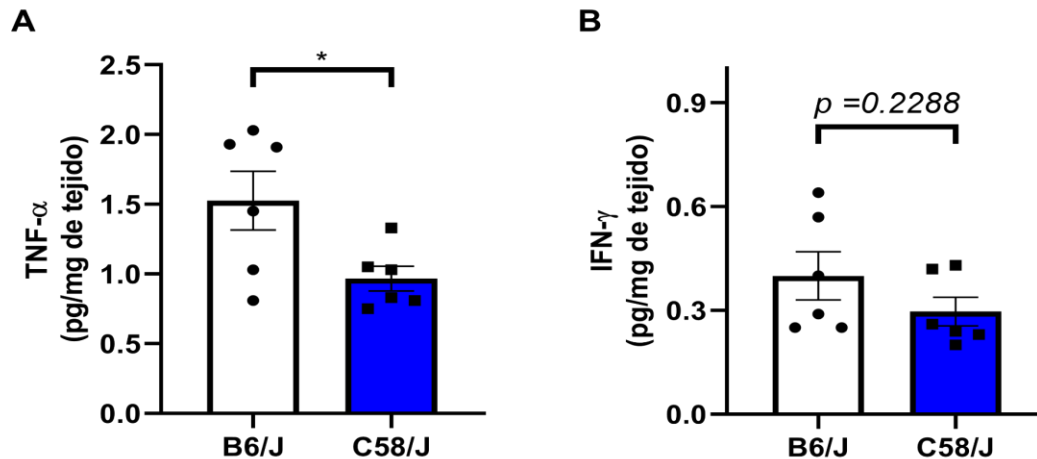


Figura 12. Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista muestran una reducción en el contenido de TNF- α en la CPF. Se observa el contenido de citocinas proinflamatorias TNF- α (A) e IFN- γ (B) en la corteza de ratones con fenotipo autista (C58/J) y neurotípicos (B6/J). Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; n= 6 por grupo. El análisis se realizó empleando la prueba paramétrica t de Student para muestras no pareadas. *p = 0.0340.

8.4 IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS AL RIESGO DE PRESENTAR TEA RELACIONADOS CON LA IDENTIDAD, PROCESOS INFLAMATORIOS Y DE FAGOCITOSIS DE LA MICROGLÍA

Para entender la relación de los resultados obtenidos de la microglía, las citocinas proinflamatorias, y su relación con el TEA, se compararon los genes relevantes para la microglía y la respuesta inflamatoria de los chips MG400 (Butovsky et al., 2014) y MG550 (Madore et al., 2020), con la base de datos SFARI (SFARI, <https://gene.sfari.org/>), que recopila información acerca de los genes relevantes para el desarrollo de TEA.

Al comparar los genes de los chips MG400 y MG550 con la base de datos de SFARI, se obtuvo una lista de 43 genes en común. Estos genes tienen una puntuación SFARI que refleja la evidencia existente de la implicación del gen en el desarrollo del TEA; este puntaje va del 1 al 3 según la evidencia, siendo 1 el puntaje asociado a aquellos genes con mayor evidencia y una alta confianza en el riesgo de presentar TEA, 2 para aquellos genes con evidencia suficiente para ser considerados candidato en el riesgo de presentar TEA, y 3 el puntaje asociado a genes con evidencia sugestiva o no replicada. Además, en la base de datos de SFARI se han identificado aquellos genes relacionados al TEA sintomático, los cuales se representan como S (SFARI, <https://gene.sfari.org/>).

Se encontraron 31 genes relevantes para la identidad de la microglía y 12 genes relacionados con procesos inflamatorios y de fagocitosis microgliales en la base de datos de SFARI, los cuales

presentan diferente puntuación con base en la evidencia para asociarse al desarrollo del TEA (Figura 13).

SIMBOLOGÍA		DEFINICIÓN
S F C A O R R I E	1	Con confianza alta en el riesgo de presentar TEA
	2	Candidato fuerte en el riesgo de presentar TEA, con pruebas de riesgo de efecto funcional
	3	Con evidencia sugestiva en el riesgo de presentar TEA, evidencia no replicada o mutaciones raras
	S	Sindrómico, con aumento sustancial del riesgo y características adicionales para el diagnóstico del TEA

S	1	<i>EBF3</i>	2	<i>CNTN6</i>	2	<i>LRP1</i>	2	<i>TSPAN4</i>	
S	1	<i>MECP2</i>	2	<i>CUX1</i>	2	<i>MSR1</i>	2	<i>TSPAN7</i>	
S	1	<i>MEF2C</i>	2	<i>CX3CR1</i>	2	<i>NAV2</i>	2	<i>TUBGCP5</i>	
	1	<i>NLGN3</i>	2	<i>DAGLA</i>	2	<i>NFIA</i>	S	2	<i>UNC13A</i>
S	1	<i>SLC6A1</i>	2	<i>DST</i>	2	<i>NRCAM</i>	3	<i>CSMD3</i>	
S	1	<i>TANC2</i>	2	<i>FABP5</i>	2	<i>NUAK1</i>	3	<i>IGF1</i>	
	1	<i>TM9SF4</i>	2	<i>FGFR1</i>	2	<i>OPHN1</i>	3	<i>MAPT</i>	
	1	<i>ZMYND8</i>	2	<i>GNAS</i>	2	<i>PLXNA4</i>	S	<i>CTNNA2</i>	
	2	<i>ARHGAP5</i>	2	<i>HMGN1</i>	2	<i>PRUNE2</i>	S	<i>PAK1</i>	
	2	<i>CADM1</i>	2	<i>JARID2</i>	2	<i>PTGS2</i>	S	<i>TFE3</i>	
	2	<i>CNTN3</i>	2	<i>KCNMA1</i>	2	<i>SYNJ1</i>			

Genes relacionados con la identidad de la microglía

Genes relacionados con procesos inflamatorios y/o fagocitosis microgliales

Figura 13. Genes asociados con el riesgo de presentar TEA en humanos enriquecidos en la microglía y en procesos inflamatorios y de fagocitosis relacionados. Los genes de los chips MG550 y MG400 diseñados para identificar a la microglía y procesos relacionados con la inflamación y fagocitosis (Butovsky et al., 2014; Madore et al., 2020) fueron comparados con la base de datos de SFARI. Solo aquellos que presentaron una puntuación SFARI fueron seleccionados (SFARI, <https://gene.sfari.org/>).

9. DISCUSIÓN

En trastornos del neurodesarrollo, como el TEA, se ha reportado ampliamente que las alteraciones ambientales inmunológicas (Suzuki et al., 2013; Vargas et al., 2005) y alteraciones del SNC están presentes (Morgan et al., 2014; Pardo et al., 2005; Stoner et al. 2014); por lo que se ha propuesto que la interacción entre estas alteraciones en los individuos puede ser parte fundamental de la etiología de un porcentaje de individuos con TEA idiopático.

Por lo tanto, este proyecto se enfocó en la evaluación de la densidad y distribución microglial, así como en la determinación del contenido de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ en la CPF de la cepa C58/J con fenotipo autista, ya que se ha propuesto una estrecha interacción entre el sistema inmunológico y el SNC.

La relación de masa CPF/masa cerebral total no presenta cambios en los ratones con fenotipo autista, comparados con la cepa neurotípica.

Como se mencionó, existe evidencia de la presencia de un agrandamiento cerebral anormal durante el desarrollo postnatal temprano en algunos individuos con TEA (Hazlett et al., 2017; Schumann et al., 2010). Sin embargo, existen algunos estudios que señalan alteraciones en el tamaño cerebral en la infancia, mostrando una disminución considerable en relación con individuos neurotípicos, mientras que en otros estudios se ha descrito que el tamaño cerebral aumenta en la adolescencia; lo que sugiere que el crecimiento anormal y excesivo permanece hasta la adultez y no se normaliza en aquellos individuos con esta condición (Courchesne et al., 2011; Prigge et al., 2021; Yankowitz et al., 2020). Esto se puede ver como un aumento del 5 al 10% en el tamaño del cerebro de individuos con TEA sin importar la edad, comparados con aquellos que no presentan TEA (Amaral et al., 2008; Vaccarino & Smith, 2009).

La evidencia indica que este crecimiento cerebral anormal del en la cepa C58/J también ocurre en ciertas regiones del SNC (un aumento del volumen en regiones como hipocampo y cuerpo caloso; mientras que una disminución en el volumen de la corteza motora, el giro dentado y ganglios basales, determinados por resonancia magnética nuclear) (Wilkes et al., 2019). Por otra parte, resultados de nuestro laboratorio respaldan este incremento, pues se destaca la existencia de un incremento de la masa cerebral total al día embrionario (E) E18 cuando se le compara con la cepa neurotípica B6/J; y posteriormente, una diferencia apreciada a las 10 semanas de edad, donde la masa hipocampal y la masa cerebral total son menores cuando se comparan con la cepa B6/J (Duarte-Campos, 2022).

Lo anterior, nos llevó a determinar la masa de la CPF con relación a la masa cerebral total; observando que no existen cambios significativos en los ratones con fenotipo autista, cuando se les

compara con los ratones neurotípicos. Sin embargo, se observa una tendencia que puede sugerir un posible sobrecrecimiento de esta estructura en estos ratones a las 10 semanas de edad (**Figura 6**). Es importante considerar que debido a la heterogeneidad de la condición se puede presentar una diversidad de alteraciones (aumento o disminución) en los resultados. El tamaño de la región analizada y el periodo o tiempo de análisis pueden producir variabilidad en los resultados, y por lo tanto este parámetro nos permite obtener una aproximación general. En nuestro caso, la tendencia en el aumento de la proporción de la masa de la CPF con la masa cerebral total puede ser indicio de un crecimiento anormal durante las primeras etapas de vida; sin embargo, es necesario e importante realizar más estudios para determinar si esta característica permanece u oscila a lo largo del desarrollo.

Existen estudios en modelos murinos de autismo, donde las vías de señalización podrían tener un impacto importante en el desarrollo de esta característica; por ejemplo, en la cepa de ratones BTBR se ha encontrado que la vía de señalización Mapk/Erk (una vía involucrada en el ciclo y proliferación celular) se encuentra incrementada y fluctúa durante el desarrollo, algo que podría relacionarse con el incremento de la masa cerebral observada en estos ratones (Faridar et al., 2014; Stephenson et al., 2011). Así mismo, una sobreactivación de la vía de señalización Wnt se ha encontrado en la CPF, cerebelo, hipocampo y amígdala de ratas con fenotipo autista inducido por VPA, la cual se encuentra involucrada en funciones neuronales como neurogénesis y migración celular (Kuo and Liu, 2018); hallazgos que podrían explicar el incremento de masa cerebral.

En los humanos, este crecimiento anormal de la masa cerebral se ve reflejado a lo largo de la vida y se ha asociado con uno de los factores de riesgo y características del trastorno. Estudios han reportado que este aumento en la masa cerebral de los individuos con TEA se debe a deficiencias en vías apoptóticas neuronales durante el refinamiento del desarrollo postnatal temprano, ocasionando un aumento en el número de neuronas (Courchesne et al., 2011). Esta hipótesis podría sustentarse con el aumento de la densidad neuronal en la placa cortical de individuos con TEA, una estructura esencial para la formación de las neuronas durante el neurodesarrollo (Avinio & Hutsler, 2021); además, un aumento en densidad neuronal también se ha reportado en las capas corticales en la región de la CPF de individuos con TEA (Falcone et al., 2021).

Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista presentan una tendencia al incremento en el contenido de las proteínas IBA-1 y TMEM119 en la corteza prefrontal.

IBA-1 es una proteína intracelular de unión a calcio, la cual tiene funciones relacionadas con la reorganización del citoesqueleto y los procesos de fagocitosis (Ito et al., 1998; 2001); esta proteína aumenta su expresión después de la estimulación en contextos no fisiológicos (por ejemplo, aumenta la expresión de IBA-1 tras la activación microglial por el exceso de proteína que forman las placas de β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer) (Jurga et al., 2020; Kenkhuis et al., 2022).

Por ello, se evaluó el contenido de la proteína IBA-1 por *western blot*, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en su contenido en la CPF de los ratones con fenotipo autista comparados con los ratones neurotípicos (**Figura 7 A,B**).

La CPF es la región más extensa de la corteza cerebral y forma parte del neocórtex, la cual contiene varias subregiones las cuales pueden mostrar diferencias en la población de la microglía (Purves et al., 2018). Además, existe una heterogeneidad marcada entre las células de la microglía en el SNC, relacionada a la región cerebral, en su morfología, expresión de genes, abundancia, así como la motilidad y movilidad (Bronzuoli et al., 2018; Tan et al., 2019; Xu et al., 2020). Es por esto que a pesar de no observar cambios significativos en el contenido de esta proteína en la CPF a través de la técnica de *western blot*, es necesario investigar posibles diferencias en esta población región específicas. Estudios previos en nuestro laboratorio han arrojado resultados, donde el contenido de la proteína IBA-1 en la región del hipocampo tampoco muestra diferencias significativas al evaluar la región completa, pero existe una tendencia al incremento en los ratones con fenotipo autista (Duarte-Campos, 2020); algo que se asemeja con los resultados obtenidos en la CPF.

Adicionalmente, se analizó el contenido de la proteína transmembranal de tipo I, TMEM119, usada como marcador microglial, ya que es expresada exclusivamente en la microglía dentro del SNC (J. Satoh et al., 2016). Así mismo, se ha reportado su presencia y aumento en afecciones neurodegenerativas y neuroinflamatorias, la cual se asocia a un estado reactivo de la microglía (Bohnert et al., 2019, 2020; Ruan & Elyaman, 2022). Ejemplos de ellos son la corteza frontal de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (J. Satoh et al., 2016) y de pacientes con la enfermedad

de Nasu-Hakola (J.-I. Satoh et al., 2019) donde se observa un aumento de la proteína TMEM119. En nuestro caso, los resultados obtenidos al evaluar el contenido de TMEM119 en la CPF de los ratones con fenotipo autista tampoco mostraron diferencia significativa comparado con los ratones neurotípicos (**Figura 7 C,D**). Notablemente, tanto en el contenido de IBA-1 como en el de TMEM119, se puede observar una tendencia a incrementar, sin embargo, esta diferencia no es significativa (por medio de la técnica de *western blot*) entre ratones neurotípicos y aquellos con fenotipo autista.

Se ha reportado que las células de la microglía pueden desarrollar un estado reactivo, caracterizado por un aumento en la expresión de TMEM119 en el SNC; Chen y colaboradores observaron este fenómeno en un modelo murino de MIA con isquemia hipóxica, acompañado de conductas de tipo autista, donde observan la expresión elevada de TMEM119 en la región CA3 del hipocampo y médula espinal (Chen et al., 2020). En otras regiones del SNC también se ha evaluado el contenido de la proteína TMEM119; Tartaglione y colaboradores, en un modelo murino de autismo inducido por MIA, reportaron un aumento significativo de la expresión de *Tmem119* en el cerebelo de los animales en el día postnatal 28, mientras que en el día postnatal 120 encuentran este aumento en el hipocampo y cerebelo de los ratones con fenotipo autista (Tartaglione et al., 2022).

De manera interesante, en un modelo de autismo inducido por VPA en rata, tampoco se han encontrado diferencias entre los niveles de expresión de la proteína IBA-1 en la CPF, específicamente en el día postnatal 90 (edad equivalente a la edad de los ratones con fenotipo autista empleados en este estudio), por lo que el no observar diferencias en la expresión de proteínas gliales en ratones considerados adultos jóvenes, se asemeja a los resultados en rata antes mencionados. Adicionalmente, en el mismo estudio se observó que en el día postnatal 35 (adolescencia de la rata) se muestra un claro incremento del contenido de la proteína IBA-1 en la región de la CPF; así mismo, otras regiones del SNC (hipocampo y cerebelo) fueron evaluadas, reportando una heterogeneidad acerca de la expresión de IBA-1 (Bronzuoli et al., 2018) tanto dependiente de la región como de la edad. Es por esto, que es necesario analizar el contenido de IBA-1 y/o TMEM119 a diferentes edades y en diferentes regiones en el modelo murino C58/J.

A pesar de no observar una diferencia significativa entre ratones neurotípicos y ratones con fenotipo autista, los resultados encontrados acerca de la expresión de las proteínas marcadoras para microglía en los ratones con fenotipo autista, puede ser un indicio de que la densidad celular se encuentra aumentada, o de la existencia de una activación microglial (estado reactivo) en la CPF, así como en ciertas regiones del SNC, debido a la alta heterogeneidad regional y funcional de estas células.

Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista presentan una mayor densidad y una distribución anormal en poblaciones IBA-1+ comparada con la observada en ratones neurotípicos.

Pocos estudios han contabilizado la densidad de células de microglía en cerebros *post mortem* de individuos con TEA. Esos estudios han reportado un aumento en la densidad de la microglía en regiones como la CPF dorsolateral (Morgan et al., 2010), así como en la amígdala (Morgan et al., 2014) de individuos con TEA. Otras regiones como la corteza visual y la corteza fronto-insular han sido evaluadas en muestras *postmortem* de individuos con TEA, mostrando igualmente un aumento en la densidad de la microglía comparada con sujetos neurotípicos (Tetreault et al., 2012). Así mismo, al evaluar la inmunorreactividad de la proteína HLA-DR, un marcador relacionado con la activación de células presentadoras de antígenos, se encontró un aumento de ésta en el cerebelo de individuos con TEA (Vargas et al., 2005).

En nuestro caso, al evaluar de forma específica la región de la CPF (**Figura 4**) de los ratones con fenotipo autista mediante inmunofluorescencia (**Figura 8 y 9A**), observamos un aumento en la densidad de las células IBA-1+, consideradas como células de la microglía por su localización en el parénquima cerebral.

De manera interesante, existen estudios que han reportado patrones anómalos de densidad y distribución de la microglía simultáneamente en diferentes regiones cerebrales de los individuos con TEA. Vargas y colaboradores analizaron la microglía en el cerebro de los individuos con TEA, observaron la presencia de cúmulos microgliales, algo que no se observa en los individuos neurotípicos (Vargas et al., 2005).

Estudios realizados por Morgan y colaboradores (Morgan et al., 2010, 2012), demostraron que la distribución de las células de la microglía en la CPF de individuos con TEA es diferente a los sujetos neurotípicos. Encontraron que las células de la microglía se encuentran más cercanas a las neuronas en la CPF dorsolateral, rodeando el soma neuronal; algunas de estas células microgliales mostraron distancias muy cortas (menores a los 25 μm ; en condiciones fisiológicas la distancia es de 50 μm aproximadamente) a la neurona, lo que podría indicar la presencia de contacto microglial a través de sus procesos, creando un cerco somal. Lo anterior sugiere que la distribución de la microglía puede encontrarse alterada en zonas aledañas a las neuronas de los individuos con TEA, y esto podría alterar funciones relacionadas con la conectividad neuronal, como la poda sináptica y la remoción de sinapsis; además de que se podría relacionar la promoción de procesos de reclutamiento en conjunto con un aumento de la densidad microglial.

Evidencia adicional acerca de una distribución espacial anómala se ha reportado, ya que se han descrito cúmulos o agrupamientos de microglía (denominadas lesiones reactivas), próximos a los microvasos de la materia gris y materia blanca en la corteza temporal de individuos con TEA, los cuales se encuentran con mucho menor frecuencia en individuos neurotípicos (Lee et al., 2017).

Por lo anterior, se decidió realizar la evaluación cuantitativa de la distribución espacial microglial dentro de la región de la CPF en ambas cepas murinas. Aquí, se determinó que existe una reducción de la NND en las células IBA-1⁺ de los ratones con fenotipo autista, comparados con los ratones neurotípicos (**Figura 9B**). Al comparar estos resultados con los obtenidos de densidad celular, se podría decir que existe una relación; ya que un incremento en la densidad celular de la microglía en los ratones con fenotipo autista indica que hay un mayor número de células, por lo tanto, la distancia entre ellas disminuye.

Estos cambios en la distribución espacial de la cepa C58/J, se pueden asociar a patrones de distribución anormal, lo cuales podrían alterar las funciones neurológicas por su proximidad con otras células del SNC (como se ha sugerido que ocurre en los individuos con TEA), así como las funciones migratorias de la microglía. Esto es interesante, ya que, en la cepa C58/J se han encontrado alteraciones gliales en la región CA1 y GD del hipocampo (Duarte-Campos, 2020), así

como alteraciones neuronales relacionadas con proteínas involucradas en la remodelación del citoesqueleto, es decir, una disminución de las proteínas MAP2A, Cofilina y Tau en la CPF (Barón-Mendoza et al., 2018); un menor número de espinas dendríticas primarias y secundarias, una menor longitud de las dendritas primarias, así como una reducción en la complejidad del árbol dendrítico en la CPF (Barón-Mendoza et al., 2019); además de presentar neuronas con un soma de menor área y circularidad, y una menor densidad de espinas dendríticas en las dendritas de la CPF (Barón-Mendoza et al., 2021). Sin embargo, es necesario realizar análisis posteriores que permitan determinar la distancia entre las células de la microglía en relación con las neuronas, particularmente con los somas de dichas células.

Cuando la microglía reconoce algún estímulo inflamatorio, pueden estimular la quimiotaxis por medio de moléculas como ATP, CX3CL1 o MCP-1 (Prinz et al., 2021; van Horssen et al., 2012). Las alteraciones en la distribución espacial de la microglía se han asociado con la formación de clústeres en diferentes regiones del SNC, principalmente por la sobreactivación celular e interacción con somas neuronales (Endo et al., 2021; Morgan et al., 2012); incluso en el contexto neurodegenerativo, como en la enfermedad de Alzheimer se han encontrado clústeres de microglía asociados a las placas de proteína β -amiloide (Hansen et al., 2018; Paasila et al., 2020).

En nuestro caso, al evaluar la tendencia al agrupamiento o formación de clústeres, el índice HSI de ambas cepas determinó que las células IBA-1+ presentan una distribución espacial aleatoria, sin mostrar tendencias a una distribución regular o a la formación de clústeres, ni diferencias significativas entre ratones neurotípicos y con fenotipo autista (**Figura 10A**). Sin embargo, el número HSI es diferente entre cada una de las cepas, por lo que al determinar el número óptimo de clústeres se encontró que los ratones C58/J presentan más clústeres, pero sin mostrar una diferencia significativa comparado con la cepa neurotípica (**Figura 10B, 11**). Debido a que se realizó un primer acercamiento en este análisis, serán necesarios estudios posteriores para mejorar el análisis de distribución espacial de la microglía en la CPF de ratones neurotípicos y con fenotipo autista.

En otros modelos con fenotipo autista también se ha reportado un aumento de la densidad de la microglía. En ratones *Pten*^{+/-}, *Fmr1* KO y otros modelos murinos inducidos por la elevada expresión de *Eif4e* (R26^{Eif4e}), un factor de iniciación de la traducción, los cuales presentan

conductas tipo autista, se presenta en la CPF medial a las 2 y 6 semanas de edad un aumento de la densidad microglial, así como alteraciones sinápticas estructurales y funcionales en la misma región (Xu et al., 2020). En un modelo autista de rata inducido por ácido valproico, se observa un aumento de la densidad microglial en la CPF medial y en el hipocampo, además de que sugieren un estado reactivo de la microglía en las ratas con la conducta autista (Codagnone et al., 2015). Por otra parte, se ha observado un incremento de la densidad microglial en el modelo murino de autismo con la mutación R451C en el gen *Nlgn3* (ratones NL3^{R451C}) que codifica neuroligina-3, una proteína involucrada en la formación y remodelación de sinapsis, que a pesar de evaluar la región del GD en el hipocampo, se mantiene el efecto en los ratones con conductas autistas (Matta et al., 2020).

Las alteraciones microgliales y neuronales presentes en la CPF de los ratones C58/J con fenotipo autista tienen relevancia, ya que podrían mostrar similitudes con aquellos procesos celulares que subyacen a la biología del TEA debido a las interacciones neurona-microglía y las funciones fisiológicas que desempeñan, como la formación y remoción de sinapsis o el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Prinz et al., 2019, 2021). El aumento de esta interacción se podría reflejar en la extensión del soporte trófico, la eliminación de neuronas o espinas dendríticas, la pérdida de función y remodelación patológica, ya que podría llegar a ser perjudicial en un estado de interacción excesiva o crónica (Bronzuoli et al., 2018; Tay et al., 2018; Vásquez & del Sol, 2021)

Las interacciones entre neuronas y microglía y las funciones fisiológicas que desempeñan (formación y remoción de sinapsis, entre otras) se ha demostrado que están alterados en diversas afecciones neurológicas, incluido el TEA, y que cuando esto ocurre, podría existir un funcionamiento anormal en la respuesta de soporte neuronal, como una conexión neuronal alterada debido a procesos perjudiciales, protectores o correctivos de la microglía desencadenando que las funciones cognitivas difieran ampliamente a sujetos que no presentan dicha condición (Prinz et al., 2019, 2021; Tay et al., 2018; Xu et al., 2020; Zhan et al., 2014).

Los hallazgos mencionados anteriormente sugieren que durante el TEA, existe un aumento en la densidad celular y una alteración en los patrones de distribución de la microglía, lo que indica la presencia de posibles procesos de proliferación o migración y reclutamiento de la microglía,

llevándose a cabo debido a un estímulo activador (daño, patógenos, fagocitosis, restos celulares); además, es bien sabido que los cambios en la densidad, en la distribución y de morfología, así como en la expresión de proteínas y producción de citocinas proinflamatorias, son un indicativo de un cambio de la microglía hacia un estado reactivo (Edmonson et al., 2014; Prinz et al., 2021; Woodburn et al., 2021).

En el caso de la cepa C58/J, los resultados sugieren que podría estarse llevando a cabo un fenómeno de reactividad microglial, ya que los patrones de distribución espacial y densidad se encuentran alterados en la CPF, así como en el hipocampo. Sin embargo, es necesario evaluar la morfología y firma molecular de la microglía, para definir el estado de la misma.

Por lo tanto, a pesar de que estos resultados muestran anomalías de distribución y densidad observadas en la CPF de la cepa murina C58/J con fenotipo autista, que se conservan y parecen tener una semejanza con aquellos resultados obtenidos en individuos con TEA y en otros modelos; existe la hipótesis de que las alteraciones microgliales como reactividad y desregulación poblacional en el cerebro de los individuos con TEA puede influir en la interacción con las neuronas y los circuitos neuronales, teniendo una relación con la presencia de rasgos tipo autistas y afectando el desempeño de las funciones cognitivas que generalmente se han asociado con el TEA.

Las diferencias significativas observadas entre el análisis realizado por las técnicas de *western blot* e inmunofluorescencia refleja algunas limitaciones del estudio dentro de las que podemos encontrar el tamaño de muestra o la sensibilidad que tiene cada una de las técnicas. Los resultados obtenidos en la técnica de *western blot* podrían deberse a que el método de disección de la CPF podría tener una mayor o menor región, que incluya otras regiones y a su vez otras células, las que podrían aportar cantidad de proteína al análisis. En el caso de la inmunofluorescencia, la selección de esta región se realiza de una mejor manera; sin embargo, la heterogeneidad de la microglía a lo largo de las capas de la neocorteza podría contribuir directamente a los resultados. Por lo que la disección estereotáxica, así como la observación del tejido con inmunofluorescencia por microscopia confocal podría mejorar los resultados obtenidos. En consecuencia, serán necesarios más estudios

para establecer una estrecha relación de causa y consecuencia entre los diversos eventos ya mencionados.

El contenido de la citocina proinflamatoria TNF- α es menor en la corteza prefrontal de ratones con fenotipo autista, mientras que el contenido de INF- γ no presenta cambios.

Estudios relacionados con la producción de citocinas en los individuos con TEA, han reportado un incremento en el contenido de diversas citocinas proinflamatorias. Estas anomalías inmunológicas se han propuesto desde hace algunos años como mecanismos que ocurren en el desarrollo de diversas afecciones neurológicas, como los trastornos del neurodesarrollo, donde se ha reportado un aumento de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6 y MCP-1 en sangre periférica de individuos con TEA (Jyonouchi et al., 2001; Masi, Glozier, et al., 2017; Zhao et al., 2021); así mismo, se ha reportado un incremento del contenido de IL-6, IL-10, MCP-1, MCP-3, MIG, BLC, IFN- γ y VEGF en la corteza cingulada anterior y en el líquido cefalorraquídeo de individuos con TEA (Vargas et al., 2005).

Masi y colaboradores, reportaron un perfil desregulado de citocinas (como TGF- β 1, IFN- γ , IL-1 β , IL-8, IL-6 y MCP-1) en individuos con TEA en sangre periférica, plasma y suero, (Masi et al., 2014; Masi, Glozier, et al., 2017); además, han asociado los niveles de citocinas (IL-1 β , IL-8, MIP-1 β y VEGF) con la severidad de los síntomas en hombres y mujeres con TEA, y la fluctuación durante el desarrollo (Masi, Breen, et al., 2017). Otros estudios han encontrado un incremento en el contenido de citocinas antiinflamatorias como IL-10 en el plasma de individuos no verbales con TEA comparado con individuos verbales que también presentan el trastorno; así como un mayor contenido de la IL-6 en plasma de niños con TEA que presentan problemas gastrointestinales (Napolioni et al., 2013). Adicionalmente, un estudio realizado por Careaga y colaboradores reportó el contenido elevado de citocinas en suero como IL-10, IL-13, IL-6 y MCP-1 en niños con TEA que presentan mayores impedimentos en áreas sociales, así como más alteraciones relacionadas con el sueño y episodios de agresión. Estos hallazgos sugieren la presencia de un perfil proinflamatorio prevalente en individuos con TEA, o al menos de un grupo dentro de los individuos que presentan el trastorno (Careaga et al., 2017).

Alteraciones en los perfiles gestacionales de citocinas también se han reportado en las madres de niños con TEA, presentando niveles alterados de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, GM-CSF, TNF- α e IFN- γ en circulación (Carter et al., 2021; Jones et al., 2017). Además, el contenido de TNF- α e IFN- γ , dos de las principales citocinas producidas por el sistema inmunológico (Liu et al., 2021), y por células gliales (astrocitos y microglía), neuronas y CAMs en el SNC (Kawanokuchi et al., 2006; Pozniak et al., 2013) en condiciones de inflamación, se han reportado aumentadas en el líquido cefalorraquídeo y la corteza frontal de individuos con TEA (Chez et al., 2007; Li et al., 2009). En general, una desregulación del perfil de citocinas se ha observado en individuos con TEA, es decir la presencia de un contenido elevado de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-8, IL-17) y antiinflamatorias (IL-1RA, IL-5, IL-12(p70), IL-13) en individuos con TEA (Suzuki et al., 2011).

La producción y presencia de estas citocinas en el cerebro desencadena una variedad de respuestas; estas tienen un impacto en condiciones fisiológicas (homeostáticas), teniendo un papel en la reparación neuronal y la eliminación de estímulos (presencia de moléculas asociadas a daño, presencia de patógenos, entre otros); así mismo, las citocinas pueden llevar a un estado de neuroinflamación (desregulación homeostática), con repercusiones inmunológicas, fisiológicas, bioquímicas y psicológicas (Martínez-Tapia et al., 2018; Petrelli et al., 2016).

Por lo mencionado anteriormente, se decidió evaluar el contenido de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ en la región de la CPF de los ratones de la cepa C58/J. Se encontró una disminución en el contenido de TNF- α en la CPF de los ratones con fenotipo autista comparado con los ratones neurotípicos (**Figura 12A**). Por otra parte, se observa una ligera disminución en el contenido de IFN- γ en la CPF de los ratones con fenotipo autista, comparado con la cepa neurotípica, sin embargo, dicho cambio no es estadísticamente significativo (**Figura 12B**); contrastando con nuestra hipótesis.

Ambas citocinas, TNF- α e IFN- γ , en el SNC desempeñan un papel muy importante para su correcto funcionamiento. Por ejemplo, se ha observado que TNF- α participa en la regulación de la vía de señalización NF- κ B, potenciado la activación microglial en un mecanismo de retroalimentación positiva (Raffaele et al., 2020; Taylor et al 2005); también participa en la liberación de glutamato

al activar a astrocitos mediante el receptor TNFR1 (Raffaele et al., 2020); actividad relacionada con la apoptosis también se ha observado, ya que puede activar caspasas y liberar FasL de células gliales y macrófagos al estimular los receptores mGluR2 en neuronas (Raffaele et al., 2020); o potenciar un ambiente proinflamatorio, así como la producción de citocinas como IL-6 e IL-1 β (Y. S. Kim & Joh, 2006). Por su parte, INF- γ se ha asociado con la regulación de la transmisión sináptica, ya que se han encontrado receptores para esta citocina en células piramidales de la capa V de la neocorteza, ocasionando una inhibición o activación de estas neuronas en la presencia de esta citocina (Janach et al., 2020). Esto enfatiza una conexión entre el sistema inmunológico y el SNC.

El contenido de IFN- γ y TNF- α también se ha visto reducido, particularmente se ha observado esto en el suero de individuos con TEA comparado con individuos neurotípicos; donde la citocina TNF- α disminuye cuando la IL-6 se encuentra disminuida (Tsilioni et al., 2015). Sin embargo, se han observado diferencias al evaluar diferentes regiones o tejidos de los individuos con TEA comparado con los individuos que no presentan esta condición; se ha encontrado una disminución de TNF- α en plasma, mientras que en suero se ha visto aumentada (El-Ansary y Al-Ayadhi, 2014, Ricci et al., 2013); inclusive, se ha reportado que no se presentan diferencias entre individuos en el contenido de TNF- α en plasma (Tonhajzerova et al., 2015). Por otra parte, los niveles de IFN- γ e IL-6 también se han observado elevarse o disminuir en conjunto (Majerczyk et al., 2022); además de que alteraciones en los niveles de IFN- γ se han asociado con la expresión alterada de genes (como *FOXPI*, *ATXN7*, *TSNARE1*) relacionados con el TEA (Warre-Cornish et al., 2020), por lo que podrían ser citocinas cruciales para determinar la severidad y el fenotipo de la condición. Esta diversidad de resultados en el contenido de citocinas en diversas regiones, podría deberse a la heterogeneidad de los individuos con TEA, así como a la contribución de los factores genéticos y ambientales, resultando en una expresión o producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, con un impacto sobre diferentes procesos neurológicos que regulan el balance de transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria de los sujetos con TEA, algo que podría ocasionar déficits en funciones cognitivas.

La expresión y producción de las citocinas IFN- γ y TNF- α en la CPF podría estar regulada por la expresión de otras proteínas involucradas en un rol antiinflamatorio, como las citocinas

antiinflamatorias IL-10, IL-4 o proteínas como arginasa; por lo tanto, estudiar el contenido de diversas citocinas proinflamatorias como el rol antiinflamatorio en diferentes edades del desarrollo es de relevancia para el contexto del TEA.

En modelos animales con un fenotipo autista, también se ha reportado una desregulación del contenido de citocinas proinflamatorias. (Deckmann et al., 2018; Gąssowska-Dobrowolska et al., 2020; Wei et al., 2012). En modelos de rata y ratón con fenotipo autista inducido por la exposición prenatal a ácido valproico, se ha reportado un contenido elevado de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 en diferentes regiones del SNC como hipocampo, cerebelo, corteza cerebral y en cerebro completo (Deckmann et al., 2018; Gąssowska-Dobrowolska et al., 2020); así como un incremento de la citocina antiinflamatoria TGF- β 1 en la corteza cerebral de ratas (Gąssowska-Dobrowolska et al., 2020). Esto es relevante, ya que otro estudio reportó que la presencia de IL-6 en ratones (ratones KO para IL-6), es importante para el desarrollo de una conducta tipo autista y desbalances en los circuitos neuronales comparada con una cepa neurotípica (Wei et al., 2012).

Adicionalmente a los hallazgos en los niveles de IFN- γ y TNF- α en la CPF de la cepa murina C58/J con fenotipo autista, estudios de nuestro laboratorio han encontrado un aumento en la quimiocina MCP-1 y de la citocina IFN- γ , mientras que en el caso de la citocina TNF- α se observa una tendencia a incrementar su contenido en la región del hipocampo (Duarte-Campos, 2022), la cual se ha relacionado con la migración (quimioatracción) de la microglía en una respuesta a estímulos inmunológicos. Aportando evidencia a la idea de una heterogeneidad de la respuesta microglial entre diversas regiones del SNC La desregulación de estas citocinas, ya sea un incremento de citocinas proinflamatorias o de citocinas antiinflamatorias, se ha reportado que tiene diversos efectos sobre las funciones cognitivas que desempeñan las diversas regiones del SNC como la CPF; la densidad celular de la microglía, astrocitos y neuronas podrían repercutir en la producción y efecto de citocinas proinflamatorias con diversos efectos entre regiones; e incluso podrían existir más de un solo fenotipo celular (proinflamatorio o antiinflamatorio) en astrocitos y microglía que regulen el ambiente neuronal.

Por lo tanto, las limitaciones de este estudio se pueden relacionar con la complejidad de las muestras, ya que, la corteza cerebral y en especial la CPF son regiones muy heterogéneas que se

expanden en el cerebro a diferentes profundidades. Además, debido a la heterogeneidad del Trastorno del Espectro Autista, podrían existir organismos en los que se encuentren los niveles de citocinas desregulados comparado con individuos neurotípicos, con fluctuaciones de las citocinas en el desarrollo e incluso podría haber diferencias entre ratones hembra y macho de la cepa con fenotipo autista.

Estudios futuros acerca del contenido de estas citocinas proinflamatorias, así como la cuantificación de diferentes citocinas involucradas en un perfil proinflamatorio, citocinas pertenecientes a un perfil anti-inflamatorio, y estudios a diferentes tiempos del desarrollo, serán requeridos para establecer una relación con los datos obtenidos en la CPF de la cepa murina con fenotipo autista, y determinar si nuestros estudios en esta región cerebral son replicables.

La cepa C58/J presenta SNPs en genes relacionados con la microglía y asociados al riesgo de presentar TEA.

Previamente, nuestro grupo de investigación ha descrito la presencia de SNPs en 454 genes de la cepa C58/J relacionados con procesos como la plasticidad sináptica, el neurodesarrollo y la dinámica del citoesqueleto (Barón-Mendoza et al., 2021); así mismo, se ha identificado la presencia de 11 genes relevantes para la microglía y 9 genes que participan en la respuesta inmune con SNPs en la cepa C58/J (Duarte-Campos, 2022).

En este trabajo se utilizaron los chips MG400 y MG550 (Butovsky et al., 2014; Madore et al., 2020) que agrupan genes relacionados con la identidad de la microglía y con procesos inflamatorios y de fagocitosis microgliales; así como la base de datos SFARI que reúne genes que se han reportado asociados al TEA, asignándoles un puntaje de acuerdo con la evidencia reportada sobre su implicación en el trastorno (SFARI, <https://gene.sfari.org/>).

De manera interesante, al comparar ambos chips con la base de datos SFARI, se encontraron 43 genes en común, de los cuales 31 genes son relevantes para la identidad de la microglía y 12 genes se relacionan con procesos inflamatorios y de fagocitosis microgliales (**Figura 13**). Entre los genes en común se encuentran algunos con puntaje de 1 como *MECP2* (Methyl CpG binding protein 2)

que está involucrado en la poda sináptica (D'Mello S. R. III, 2021), así como en la formación, mantenimiento y remodelación de sinapsis (Schafer et al., 2016); *MEF2C* (Myocyte enhancer factor 2c) que codifica a proteínas que participan en la diferenciación, miogénesis y desarrollo de tejido vascular y nervioso (Chaudhary et al., 2021), así como en la eliminación de sinapsis glutamatérgicas y actúa como factor represor de la respuesta inflamatoria de IFN tipo I (Hassan et al., 2022); *EBF3* (Early B cell factor 3) involucrado en procesos de neurogénesis y diferenciación celular (Chao et al., 2017); *NLGN3* (Neuroigin 3) que codifica moléculas de adhesión involucradas en la sinapsis (Quartier et al., 2019) y en la gliosis microglial (Matta et al., 2020); y *SLC6A1* (Solute carrier family 6, member 1) que codifica al transportador de GABA tipo I (GAT1) de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía, participando en la transmisión GABAérgica (Fattorini et al., 2020; Goodspeed et al., 2020).

La mayor cantidad de genes se encontraron considerados como candidatos fuertes en el riesgo de presentar TEA, es decir con una puntuación SFARI 2. Aquí se pueden encontrar genes como *CNTN3* (Contactin 3) involucrado en la formación y mantenimiento de procesos neuronales y microgliales (Mohebiany et al., 2014); *CX3CRI* (CX3C motif chemokine receptor 1) que participa en la respuesta migratoria de células mieloides, por ejemplo de la microglía (Pawelec et al., 2020; Zhan et al., 2014); *FGFR1* (Fibroblast growth factor receptor 1) que codifica a una proteína receptora que participa en la migración, supervivencia celular e induce un ambiente proinflamatorio al unirse con su ligando (Astorkia et al 2022; Parthasarathy et al., 2023); *NRCAM* (Neuronal cell adhesion molecule) que codifica a moléculas de adhesión involucradas en procesos de diferenciación, proliferación y adhesión (Moore et al., 2022); *PLXNA4* (PlexinA4) que está involucrado en la activación microglial, promoción de un ambiente proinflamatorio, así como en el desarrollo y crecimiento de neuritas y proceso microgliales (Cho et al., 2022; Ito et al., 2014); *SYNJI* (Synaptojanin1) que está involucrado en el tráfico de membranas y la transmisión sináptica (Choudhry et al., 2021); o *TSPAN4* (Tetraspanin 4) que está involucrado en múltiples procesos celulares y en la transducción de señales (Becic et al., 2020).

Otros genes con evidencia sugestiva (puntaje SFARI 3) o sindrómicos (puntaje SFARI S) también se obtuvieron, dentro de los que se pueden encontrar *CSMD3* (CUB and Sushi multiple domains 3) que se han visto involucrados en el desarrollo y ramificación de las dendritas, así como en el

control del complemento (Song et al., 2022); *IGF1* (Insulin like growth factor 1) que participa en el desarrollo y crecimiento celular (Wrigley et al., 2017); *MAPT* (Microtubule associated protein Tau) involucrado en la dinámico y estabilización del citoesqueleto neuronal (Strang et al., 2019); *CTNNA2* (Catenin alpha 2) que participa en la adherencia celular y regulación del citoesqueleto (Schaffer et al., 2018) y *PAK1* (p21 activated kinase 1) que también está involucrado en la dinámica del citoesqueleto neuronal (Harms et al., 2018).

Como se mencionó anteriormente, se ha descrito la presencia de SNPs en diversos genes de la cepa C58/J relacionados con la plasticidad sináptica, el neurodesarrollo y la dinámica del citoesqueleto (Barón-Mendoza et al., 2021) así como en genes relevantes para la microglía y para la respuesta inmune; específicamente en los genes *Tm9sf4* y *Lrp1*, dos de los genes relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmune (Duarte-Campos, 2022); y los ortólogos en humanos (*TM9SF4* y *LRP1*) están asociados al TEA de acuerdo a la base de datos SFARI (SFARI, <https://gene.sfari.org/>) como se puede ver en la **Figura 13**. El gen *TM9SF4* codifica a la proteína 4 de la superfamilia 9 de dominios transmembranales, se asocia con proteínas que albergan dominios transmembranales ricos en glicina, tráfico vesicular y exocitosis (Perrín et al., 2015). Se ha descrito su participación en procesos inflamatorios y de autofagia intestinales (Sun et al., 2018; Xie et al., 2022); sin embargo, a pesar de tener una puntuación SFARI de 1 (gen con evidencia suficiente para ser considerado de alta confianza) por la presencia de mutaciones en este gen en los individuos con TEA, aún falta por describir su actividad en el SNC.

Por otra parte, el gen *LRP1* codifica a una proteína transmembranal receptora de lipoproteína de baja densidad, que regula la endocitosis y metabolismo de diversos ligandos (<30), incluidos la apolipoproteína E (APOE) y β -amiloide (Chen et al., 2022). Adicionalmente, se ha relacionado a *LRP1* con un rol importante en la respuesta inmunológica de células mieloides, como la microglía, donde puede incrementar la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β (Chuang et al., 2016; Yang et al., 2016).

Aquellos genes involucrados en el desarrollo del TEA y que están asociados a la microglía y procesos de la respuesta inmune y de fagocitosis, podrían aportar al entendimiento de las alteraciones relacionadas a la activación de la microglía, alteraciones sinápticas y la

neuroinflamación halladas en la cepa C58/J; que de igual forma, se presentan en individuos con TEA. Además, las alteraciones en los genes *Tm9sf4* y *Lrp1* podrían ser significativas para la cepa C58/J y las características del fenotipo autista, ya que sus ortólogos presentan puntajes altos en la base de datos de SFARI, siendo relevantes para el desarrollo de esta condición. Sin embargo, es necesario evaluar la importancia funcional de estos SNPs, para esclarecer su contribución en el fenotipo observado.

En conjunto, los resultados anteriores sugieren la presencia de microglía con un fenotipo reactivo, además que las determinaciones del contenido de ambas citocinas suman a la diversidad de resultados que se reportan para los modelos de estudio del TEA. Sin embargo, se requiere de futuros estudios que puedan esclarecer el perfil de citocinas, así como la morfología y fenotipo de la microglía de esta cepa murina con fenotipo autista a diferentes tiempos del neurodesarrollo, para poder realizar así paralelismos que permitan detallar la fisiopatología del trastorno a partir de este modelo.

10. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN GENERAL

Los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista exhiben cambios en la densidad y distribución de células de la microglía, así como un desbalance en el contenido de la citocina proinflamatoria TNF- α en la CPF, en comparación con una cepa neurotípica.

CONCLUSIONES PARTICULARES

- La masa de la CPF de la cepa murina C58/J con fenotipo autista en relación con la masa cerebral total no presenta cambios significativos en comparación con la cepa murina neurotípica C57BL/6J.
- La cepa murina C58/J con fenotipo autista, no presentan diferencias significativas en el contenido de la proteína IBA-1, así como en el contenido de la proteína TMEM119 en la CPF, en comparación con la cepa murina neurotípica C57BL/6J.

- La cepa murina C58/J con fenotipo autista, exhibe un aumento en la densidad de la microglía; así como una disminución en la distancia más cercana al vecino en la CPF, en comparación con la cepa murina neurotípica C57BL/6J.
- La CPF de la cepa murina C58/J con fenotipo autista, presenta una reducción en el contenido de la citocina proinflamatoria TNF- α ; en cambio, el contenido de la citocina proinflamatoria IFN- γ no exhibe cambios, en comparación con la cepa murina neurotípica C57BL/6J.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar de forma comparativa la morfología y el fenotipo de las células de la microglía de la CPF en la cepa murina C58/J.
- Determinar si existen diferencias en el contenido de proteínas relacionadas con una activación celular (astrogliosis o microglía reactiva) en la CPF y otras regiones del SNC de la cepa murina C58/J.
- Evaluar otras poblaciones gliales como astrocitos en la CPF de la cepa murina C58/J.
- Evaluar de forma comparativa a diferentes tiempos del desarrollo, las distintas poblaciones gliales (microglía y astrocitos) en diferentes regiones del SNC como la CPF de la cepa murina C58/J.
- Evaluar otras citocinas proinflamatorias, así como moléculas y enzimas relacionadas con un perfil proinflamatorio en la CPF, en diferentes regiones del SNC y a diferentes tiempos del desarrollo de la cepa murina C58/J.
- Determinar el contenido de citocinas anti-inflamatorias en la CPF, así como en diferentes regiones del SNC y a diferentes tiempos del desarrollo de la cepa murina C58/J.
- Determinar a partir de un análisis *in silico*, el efecto de los SNPs en la función de las proteínas codificadas por *Tm9sf4* y *Lrp1*.

12. REFERENCIAS

- Abou-Donia, M. B., Suliman, H. B., Siniscalco, D., Antonucci, N., ElKafrawy, P., & Brahmajothi, M. V. (2019). De novo blood biomarkers in autism: Autoantibodies against neuronal and glial proteins. *Behavioral Sciences*, 9(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/bs9050047>
- Al-Haddad, B. J. S., Jacobsson, B., Chabra, S., Modzelewska, D., Olson, E. M., Bernier, R., Enquobahrie, D. A., Hagberg, H., Östling, S., Rajagopal, L., Adams Waldorf, K. M., & Sengpiel, V. (2019). Long-term Risk of Neuropsychiatric Disease After Exposure to Infection In Utero. *JAMA Psychiatry*, 76(6), 594–602.
- Amaral, D. G., Schumann, C. M., & Nordahl, C. W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends in Neurosciences*, 31(3), 137–145.
- American Psychiatric Association. (2022). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5-TR*.
- Arpi, M. N. T., & Simpson, T. I. (2022). SFARI genes and where to find them; modelling Autism Spectrum Disorder specific gene expression dysregulation with RNA-seq data. *Scientific Reports*, 12(1), 1–15.
- Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., Tipton, T., Chapman, M. A., Riecken, K., Beccari, S., Sierra, A., Molnár, Z., Cragg, M. S., Garaschuk, O., Hugh Perry, V., & Gomez-Nicola, D. (2017). Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Reports*, 18(2), 391–405.
- Astorkia, M., Lachman, H. M., & Zheng, D. (2022). Characterization of cell-cell communication in autistic brains with single-cell transcriptomes. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 14(1), 29.
- Atbasoglu, E. C., & Cem Atbasoglu, E. (2020). Autism Spectrum Disorder as an Initial Diagnosis in Adults. In *Archives of Neuropsychiatry*. <https://doi.org/10.29399/npa.25050>
- Avino, T., & Hutsler, J. J. (2021). Supernumerary neurons within the cerebral cortical subplate in autism spectrum disorders. *Brain Research*, 1760, 147350.
- Avni, E., Ben-Itzhak, E., & Zachor, D. A. (2018). The Presence of Comorbid ADHD and Anxiety Symptoms in Autism Spectrum Disorder: Clinical Presentation and Predictors. *Frontiers in Psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 9, 717.
- Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., & Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 0. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>
- Barón Mendoza, I. C. (2022). *Caracterización de la citoarquitectura neuronal de la cepa murina con fenotipo autista C58/J* (A. A. González Arenas (ed.)) [Doctora en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2022/abril/0824605/Index.html>
- 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. In *Neuroscience Letters* (Vol. 703, pp. 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.
- Barón-Mendoza, I., Maqueda-Martínez, E., Martínez-Marcial, M., De la Fuente-Granada, M., Gómez-Chavarín, M., & González-Arenas, A. (2021). Changes in the Number and

- Morphology of Dendritic Spines in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of the C58/J Mouse Model of Autism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 726501.
- Bauman, M. D., Crawley, J. N., & Berman, R. F. (2019). Autism: Animal Models. In *eLS* (pp. 1–22). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022368.pub2>
- Becic A., Leifeld J., Shaukat J., Hollmann M. (2020). Tetraspanins as Potential Modulators of Glutamatergic Synaptic Function. *Front Mol Neurosci*, 14: 801882. DOI: 10.3389/fnmol.2021.801882.
- Bennabi, M., Gaman, A., Delorme, R., Boukouaci, W., Manier, C., Scheid, I., Si Mohammed, N., Bengoufa, D., Charron, D., Krishnamoorthy, R., Leboyer, M., & Tamouza, R. (2018). HLA-class II haplotypes and Autism Spectrum Disorders. *Scientific Reports*, 8(1), 1–8.
- Bennett, M. L., & Viaene, A. N. (2021). What are activated and reactive glia and what is their role in neurodegeneration? *Neurobiology of Disease*, 148, 105172.
- Bey, A. L., & Jiang, Y.-H. (2014). Overview of mouse models of autism spectrum disorders. *Current Protocols in Pharmacology / Editorial Board, S.J. Enna ... [et Al.]*, 66, 5.66.1–26.
- 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.
- Bohnert, S., Ondruschka, B., Bohnert, M., Schuhmann, M. K., & Monoranu, C. M. (2019). Post-mortem cerebrospinal fluid diagnostics: cytology and immunocytochemistry method suitable for routine use to interpret pathological processes in the central nervous system. *International Journal of Legal Medicine*, 133(4). <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02050-z>
- Bölte, S., Girdler, S., & Marschik, P. B. (2019). The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 7, pp. 1275–1297). <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2988-4>
- Bronzuoli, M. R., Facchinetti, R., Ingrassia, D., Sarvadio, M., Schiavi, S., Steardo, L., Verkhatsky, A., Trezza, V., & Scuderi, C. (2018). Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Molecular Autism*, 9, 66.
- Brynge, M., Gardner, R., Sjöqvist, H., Karlsson, H., & Dalman, C. (2022). Maternal levels of acute phase proteins in early pregnancy and risk of autism spectrum disorders in offspring. *Translational Psychiatry*, 12(1), 148.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglspenger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P., & Weiner, H. L. (2014). Identification of a Unique TGF- β Dependent Molecular and Functional Signature in Microglia. *Nature Neuroscience*, 17(1), 131.
- Careaga, M., Rogers, S., Hansen, R. L., Amaral, D. G., Van de Water, J., & Ashwood, P. (2017). Immune Endophenotypes in Children With Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*, 81(5), 434–441.
- Carter, M., Casey, S., O’Keeffe, G. W., Gibson, L., & Murray, D. M. (2021). Mid-gestation cytokine profiles in mothers of children affected by autism spectrum disorder: a case–control study. *Scientific Reports*, 11(1), 1–17.
- Casanova, M. F., Casanova, E. L., Frye, R. E., Baeza-Velasco, C., LaSalle, J. M., Hagerman, R. J., Scherer, S. W., & Natowicz, M. R. (2020). Editorial: Secondary vs. Idiopathic Autism. *Frontiers in Psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 0. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00297>
- Casanova, M. F., Frye, R. E., Gillberg, C., & Casanova, E. L. (2020). Editorial: Comorbidity and Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 11,

- 617395.
- Casanova, M. F., & Opris, I. (2015). The Minicolumnopathy of Autism. In M. F. Casanova & I. Opris (Eds.), *Recent Advances on the Modular Organization of the Cortex* (pp. 225–238). Springer.
- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in Immunology, 0*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
- CDC. (2022, March 4). *Data & Statistics on Autism Spectrum Disorder*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>
- Chaney, A. M., Deal, E. M., Jackson, I. M., & James, M. L. (2021). PET Imaging of Neuroinflammation. In *Molecular Imaging* (pp. 1335–1371). Academic Press.
- Chao H. T., Davids M., Burke E., Pappas J. G., Rosenfeld J. A., McCarty A. J., Davis T., Wolfe L., Toro C., Tiffit C., Xia F81odellong N., Johnson T. K., Warr C. G. (2017). A Syndromic Neurodevelopmental Disorder Caused by De Novo Variants in EBF3. *The American Journal of Human Genetics*. Volume 100, Issue 1 (pp. 128-137). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.11.018>.
- Chaste, P., & Devlin, B. (2015). Architecture of the Genetic Risk for Autism. In *Autism Spectrum Disorders* (pp. 80–96). <https://doi.org/10.1159/000363590>
- Chaudhary R, Agarwal V, Kaushik AS, Rehman M. (2021). Involvement of myocyte enhancer factor 2c in the pathogenesis of autism spectrum disorder. *Heliyon 7*(4): e06854. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.
- Chen, H.-R., Chen, C.-W., Mandhani, N., Short-Miller, J. C., Smucker, M. R., Sun, Y.-Y., & Kuan, C.-Y. (2020). Monocytic Infiltrates Contribute to Autistic-like Behaviors in a Two-Hit Model of Neurodevelopmental Defects. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 40*(49), 9386–9400.
- Chen K., Martens Y. A., Meneses A., Ryu D. H., Lu W., Raulin A. C., Li F., Zhao J., Chen Y., Jin Y., Linares C., Goodwin M., Li Y., Liu C. C., Kanekiyo T., Holtzman D. M., Golde T. E., Bu G., Zhao N. (2022). LRP1 is a neuronal receptor for α -synuclein uptake and spread. *Mol Neurodegener, 17*(1): 57. doi: 10.1186/s13024-022-00560-w.
- Chez, M. G., Dowling, T., Patel, P. B., Khanna, P., & Kominsky, M. (2007). Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatric Neurology, 36*(6). <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.01.012>
- Chiarotti, F., & Venerosi, A. (2020). Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates Since 2014. In *Brain Sciences* (Vol. 10, Issue 5, p. 274). <https://doi.org/10.3390/brainsci10050274>
- Cho H., Park H. J., Seo Y. K. (2022). Induction of PLXNA4 Gene during Neural Differentiation in Human Umbilical-Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells by Low-Intensity Sub-Sonic Vibration. *Int J Mol Sci, 23*(3): 1522. DOI: 10.3390/ijms23031522.
- Choudhry H., Aggarwal M., Pan P. Y. (2021). Mini-review: Synaptojanin 1 and its implications in membrane trafficking. *Neurosci Lett, 765*: 136288. DOI: 10.1016/j.neulet.2021.136288.
- Chuang T. Y., Guo Y., Seki S. M., Rosen A. M., Johanson D. M., Mandell J. W., Lucchinetti C. F., Gaultier A. (2016). LRP1 expression in microglia is protective during CNS autoimmunity. *Acta Neuropathol Commun, 4*(1): 68. doi: 10.1186/s40478-016-0343-2.
- Codagnone, M. G., Podestá, M. F., Uccelli, N. A., & Reinés, A. (2015). Differential Local Connectivity and Neuroinflammation Profiles in the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Valproic Acid Rat Model of Autism. *Developmental Neuroscience, 37*(3), 215–231.

- Cornell, J., Salinas, S., Huang, H.-Y., & Zhou, M. (2022). Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory. *Neural Regeneration Research*, *17*(4), 705–716.
- Courchesne, E., 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: The Journal of the American Medical Association*, *306*(18). <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1638>
- Davoli-Ferreira, M., Thomson, C. A., & McCoy, K. D. (2021). Microbiota and Microglia Interactions in ASD. *Frontiers in Immunology*, *0*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.676255>
- Deckmann, I., Schwingel, G. B., Fontes-Dutra, M., Bambini-Junior, V., & Gottfried, C. (2018). Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Nimbus*, *25*(5-6), 285–299.
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, *118*(2). <https://doi.org/10.1378/chest.118.2.503>
- DiSabato, D., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: The Devil is in the Details. *Journal of Neurochemistry*, *139*(Suppl 2), 136.
- D'Mello S. R. III. (2021). MECP2 and the biology of MECP2 duplication syndrome. *J Neurochem* *159*(1): 29-60.
- Duarte Campos, J. F. (2020). *Evaluación de astrocitos y microglia en el hipocampo de ratones con fenotipo autista (cepa C58/J)* (M. de la Fuente Granada (ed.)) [Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2020/octubre/0804598/Index.html>
- Duarte-Campos, J. F. (2022). *Determinación del contenido cerebral y sérico de proteínas proinflamatorias en una cepa murina con fenotipo autista durante el desarrollo*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2022/noviembre/0833081/Index.html>
- Dunn, G. A., Nigg, J. T., & Sullivan, E. L. (2019). Neuroinflammation as a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. doi:10.1016/j.pbb.2019.05.005
- Edmonson, C., Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2014). Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Molecular Autism*, *5*, 3.
- El-Ansary, A., & Al-Ayadhi, L. (2012). Neuroinflammation in autism spectrum disorders. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 1–9.
- El-Ansary, A., & Al-Ayadhi, L. (2014). GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(1), 1–9.
- Elco, C. P., & Sen, G. C. (2013). Interferon Receptors. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 619–623.
- Emberti Gialloreti, L., Mazzone, L., Benvenuto, A., Fasano, A., Alcon, A. G., Kraneveld, A., Moavero, R., Raz, R., Riccio, M. P., Siracusano, M., Zachor, D. A., Marini, M., & Curatolo, P. (2019). Risk and Protective Environmental Factors Associated with Autism Spectrum Disorder: Evidence-Based Principles and Recommendations. *Journal of Clinical Medicine Research*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/jcm8020217>
- Endo, Y., Asanuma, D., Namiki, S., Sugihara, K., Hirose, K., Uemura, A., Kubota Y., Miura, T. (2021). Quantitative modelling of regular retinal microglia distribution. *Sci Rep* *11*, 22671. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01820-3>
- Erdoğan, H. (2017). Animal Models of Autism Spectrum Disorder. In *Journal of Neurology & Stroke* (Vol. 6, Issue 4). <https://doi.org/10.15406/jnsk.2017.06.00209>
- Ergaz, Z., Weinstein-Fudim, L., & Ornoy, A. (2016). Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*, *64*, 116–140.

- Escobar, M. I., Pimienta, H. J., & Umbarila, J. (2019). *CORTEZA CEREBRAL* (pp. 99–118).
- Evans, B. (2013). How autism became autism. In *History of the Human Sciences* (Vol. 26, Issue 3, pp. 3–31). <https://doi.org/10.1177/0952695113484320>
- Eyo, U. B., & Wu, L.-J. (2019). Microglia: Lifelong patrolling immune cells of the brain. *Progress in Neurobiology*, *179*, 101614.
- Falcone, C., Mevises, N.-Y., Hong, T., Dufour, B., Chen, X., Noctor, S. C., & Cerdeño, V. M. (2021). Neuronal and glial cell number is altered in a cortical layer-specific manner in autism. In *Autism* (Vol. 25, Issue 8, pp. 2238–2253). <https://doi.org/10.1177/13623613211014408>
- Faridar, A., Jones-Davis, D., Rider, E., Li., Gobius I., Morcom L., Richards L. J., Sen S., Sherr E. H. (2014). Mapk/Erk activation in an animal model of social deficits shows a possible link to autism. *Molecular Autism*, *5*: 57 <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-57>
- Fattorini G, Catalano M, Melone M, Serpe C, Bassi S, Limatola C, Conti F. (2020). Microglial expression of GAT-1 in the cerebral cortex. *Glia* *68*(3): 646-655. doi: 10.1002/glia.23745.
- Flurkey, K. (Ed.). (2009). *The Jackson laboratory handbook of genetically standardized mice: ask for the j* (6. ed.). The Jackson Laboratory.
- Fombonne, E., MacFarlane, H., & Salem, A. C. (2021). Epidemiological surveys of ASD: advances and remaining challenges. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *51*(12), 4271–4290.
- 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.
- Francés, L., Quintero, J., Fernández, A., Ruiz, A., Caules, J., Fillon, G., Hervás, A., & Virgínia Soler, C. (2022). Current state of knowledge on the prevalence of neurodevelopmental disorders in childhood according to the DSM-5: a systematic review in accordance with the PRISMA criteria. In *Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health* (Vol. 16, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13034-022-00462-1>
- Fuster, J. M. (2015). Anatomy of the Prefrontal Cortex. In *The Prefrontal Cortex* (pp. 9–62). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407815-4.00002-7>
- Gąssowska-Dobrowolska, M., Cieślik, M., Czapski, G. A., Jęsko, H., Frontczak-Baniewicz, M., Gewartowska, M., Dominiak, A., Polowy, R., Filipkowski, R. K., Babiec, L., & Adamczyk, A. (2020). Prenatal Exposure to Valproic Acid Affects Microglia and Synaptic Ultrastructure in a Brain-Region-Specific Manner in Young-Adult Male Rats: Relevance to Autism Spectrum Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(10), 3576.
- GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. (2022). Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet. Psychiatry*, *9*(2), 137–150.
- Gharehgzlou, A., Vandewouw, M., Ziolkowski, J., Wong, J., Crosbie, J., Schachar, R., Nicolson, R., Georgiades, S., Kelley, E., Ayub, M., Hammill, C., Ameis, S. H., Taylor, M. J., Lerch, J. P., & Anagnostou, E. (2022). Cortical Gyrfication Morphology in ASD and ADHD: Implication for Further Similarities or Disorder-Specific Features? *Cerebral Cortex*, *32*(11), 2332–2342.
- Gillberg, C., & Wing, L. (1999). Autism: not an extremely rare disorder. In *Acta Psychiatrica Scandinavica* (Vol. 99, Issue 6, pp. 399–406). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1999.tb00984.x>
- Gładysz, D., Krzywdzińska, A., & Hozyasz, K. K. (2018). Immune Abnormalities in Autism Spectrum Disorder-Could They Hold Promise for Causative Treatment? *Molecular Neurobiology*, *55*(8), 6387–6435.

- González Ibanez, F., Picard, K., Bordeleau, M., Sharma, K., Bisht, K., & Tremblay, M.-È. (2019). Immunofluorescence Staining Using IBA1 and TMEM119 for Microglial Density, Morphology and Peripheral Myeloid Cell Infiltration Analysis in Mouse Brain. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 152. <https://doi.org/10.3791/60510>
- Goodspeed K, Pérez-Palma E, Iqbal S, Cooper D, Scimemi A, Johannesen KM, Stefanski A, Demarest S, Helbig KL, Kang J, Shaffo FC, Prentice B, Brownstein CA, Lim B, Helbig I, De Los Reyes E, McKnight D, Crunelli V, Campbell AJ, Møller RS, Freed A, Lal D. (2020). Current knowledge of SLC6A1-related neurodevelopmental disorders. *Brain Commun* 2(2): fcaa170. doi: 10.1093/braincomms/fcaa170.
- Guerini, F. R., Bolognesi, E., Chiappedi, M., Ghezzi, A., Manca, S., Zanette, M., Sotgiu, S., Mensi, M. M., Zanzottera, M., Agliardi, C., Costa, A. S., Balottin, U., & Clerici, M. (2018). HLA-G*14bp Insertion and the KIR2DS1-HLAC2 Complex Impact on Behavioral Impairment in Children with Autism Spectrum Disorders. *Neuroscience*, 370, 163–169.
- Guerini, F. R., Bolognesi, E., Sotgiu, S., Carta, A., Clerici, C., Chiappedi, M., Ghezzi, A., Zanette, M., Mensi, M. M., Canevini, M. P., Zanzottera, M., Agliardi, C., Costa, A. S., Balottin, U., & Clerici, M. (2019). HLA-G allelic distribution in Sardinian children with Autism spectrum disorders: A replication study. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 314–318.
- Guzman-Martinez, L., Maccioni, R. B., Andrade, V., Navarrete, L. P., Pastor, M. G., & Ramos-Escobar, N. (2019). Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01008>
- Gzielo, K., & Nikiforuk, A. (2021). Astroglia in Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111544>
- Ha, S., Sohn, I.-J., Kim, N., Sim, H. J., & Cheon, K.-A. (2015). Characteristics of Brains in Autism Spectrum Disorder: Structure, Function and Connectivity across the Lifespan. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 273.
- Habib, A., Harris, L., Pollick, F., & Melville, C. (2019). A meta-analysis of working memory in individuals with autism spectrum disorders. *PloS One*, 14(4), e0216198.
- Hanada, T., & Yoshimura, A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(4-5), 413–421.
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., Sheng M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *Journal of Cell Biology* 217(2): 459-472.
- Harms F. L., Kloth K., Bley A., Denecke J., Santer R., Lessel D., Hempel M., Kutsche K. (2018). Activating Mutations in PAK1, Encoding p21-Activated Kinase 1, Cause a Neurodevelopmental Disorder. *Am J Hum Genet*, 103(4): 579-591. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.09.005.
- Hall J. E. (2020). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (14th ed.). Elsevier.
- Hassan, A., Scott, H. and Hill, M. (2021), Regulation of microglial transcription factor MEF2C by Alzheimer's disease-relevant stimuli. *Alzheimer's Dement*, 17: e057448. <https://doi.org/10.1002/alz.057448>
- Hazlett, H. C., Gu, H., Munsell, B. C., Kim, S. H., Styner, M., Wolff, J. J., Elison, J. T., Swanson, M. R., Zhu, H., Botteron, K. N., Louis Collins, D., Constantino, J. N., Dager, S. R., Estes, A. M., Evans, A. C., Fonov, V. S., Gerig, G., Kostopoulos, P., McKinstry, R. C., ... for the IBIS Network. (2017). Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. *Nature*, 542(7641), 348.
- Hodges, H., Fealko, C., & Soares, N. (2020). Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Translational Pediatrics*, 9(Suppl 1), S55.
- Hofman, M. A. (1988). Size and shape of the cerebral cortex in mammals. II. The cortical volume.

- Brain, Behavior and Evolution*, 32(1), 17–26.
- Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H., & McDermott, M. F. (2019). Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1>
- Hutsler, J. J., & Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, 1309, 83–94.
- Iles, A. (2021). Autism Spectrum Disorders. *Primary Care*, 48(3), 461–473.
- Ismail, F. Y., & Shapiro, B. K. (2019). What are neurodevelopmental disorders? In *Current Opinion in Neurology* (Vol. 32, Issue 4, pp. 611–616). <https://doi.org/10.1097/wco.0000000000000710>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 57(1). [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0)
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T., & Fukuuchi, Y. (2001). Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 32(5). <https://doi.org/10.1161/01.str.32.5.1208>
- Ito T., Yoshida K., Negishi T., Miyajima M., Takamatsu H., Kikutani H., Kumanogoh A., Yukawa K. (2014). Plexin-A1 is required for Toll-like receptor-mediated microglial activation in the development of lipopolysaccharide-induced encephalopathy. *Int J Mol Med* 33(5): 1122-30. doi: 10.3892/ijmm.2014.1690
- Janach, G. M. S., Reetz, O., Döhne, N., Stadler, K., Grosser, S., Byvaltcev, E., Bräuer, A. U., & Strauss, U. (2020). Interferon- γ acutely augments inhibition of neocortical layer 5 pyramidal neurons. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 69.
- Javed, K., Reddy, V., & Lui, F. (2021). Neuroanatomy, Cerebral Cortex. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Jawabri, K. H., & Sharma, S. (2022). Physiology, Cerebral Cortex Functions. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Jones, K. L., Croen, L. A., Yoshida, C. K., Heuer, L., Hansen, R., Zerbo, O., DeLorenze, G. N., Kharrazi, M., Yolken, R., Ashwood, P., & de Water J, V. (2017). Autism with intellectual disability is associated with increased levels of maternal cytokines and chemokines during gestation. *Molecular Psychiatry*, 22(2). <https://doi.org/10.1038/mp.2016.77>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 0. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Jyonouchi, H., Geng, L., & Davidow, A. L. (2014). Cytokine profiles by peripheral blood monocytes are associated with changes in behavioral symptoms following immune insults in a subset of ASD subjects: an inflammatory subtype? *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1–13.
- Jyonouchi, H., Sun, S., & Le, H. (2001). Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *Journal of Neuroimmunology*, 120(1-2), 170–179.
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*, 9(1), 64–79.
- Kalavai, S. V., & Ikezu, S. (2021). Neuritogenic function of microglia in maternal immune activation and autism spectrum disorders. *Neural Regeneration Research*, 16(7), 1436.
- Kandel E.R., & Schwartz J.H., & Jessell T.M., & Siegelbaum S.A., & Hudspeth A.J., & Mack

- S(Eds.), (2014). *Principles of Neural Science*, (5th ed). McGraw Hill.
- Kanner, L. (1943). Autistic Disturbances of Affective Contact. *Nervous Child*, 2, 217–250.
- Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>
- Karayanidis, F., & McKewen, M. (2021). More than “just a test”—Task-switching paradigms offer an early warning system for cognitive decline. In K. D. Federmeier (Ed.), *Psychology of Learning and Motivation* (Vol. 74, pp. 141–193). Academic Press.
- Kawanokuchi, J., Mizuno, T., Takeuchi, H., Kato, H., Wang, J., Mitsuma, N., & Suzumura, A. (2006). Production of interferon- γ by microglia. *Multiple Sclerosis Journal*, 12(5), 558–564. doi:10.1177/1352458506070763
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Selvakumar, G. P., Zaheer, S., Ahmed, M. E., Raikwar, S. P., Zahoor, H., Saeed, D., Natteru, P. A., Iyer, S., & Zaheer, A. (2017). Brain and Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 0. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00216>
- Kenkhuys, B., Somarakis, A., Kleindouwel, L. R. T., van Roon-Mom, W. M. C., Höllt, T., & van der Weerd, L. (2022). Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Disease*, 167, 105684.
- Khundrakpam, B. S., Lewis, J. D., Kostopoulos, P., Carbonell, F., & Evans, A. C. (2017). Cortical Thickness Abnormalities in Autism Spectrum Disorders Through Late Childhood, Adolescence, and Adulthood: A Large-Scale MRI Study. *Cerebral Cortex*, 27(3), 1721–1731.
- Kimberley McAllister, A. (2017). Immune contributions to cause and effect in autism spectrum disorder. *Biological Psychiatry*, 81(5), 380.
- Kim, J. Y., Son, M. J., Son, C. Y., Radua, J., Eisenhut, M., Gressier, F., Koyanagi, A., Carvalho, A. F., Stubbs, B., Solmi, M., Rais, T. B., Lee, K. H., Kronbichler, A., Dragioti, E., Shin, J. I., & Fusar-Poli, P. (2019). Environmental risk factors and biomarkers for autism spectrum disorder: an umbrella review of the evidence. *The Lancet. Psychiatry*, 6(7), 590–600.
- Kolk, S. M., & Rakic, P. (2021). Development of prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 47(1), 41–57.
- Kongsui, R., Beynon, S. B., Johnson, S. J., & Walker, F. R. (2014). Quantitative assessment of microglial morphology and density reveals remarkable consistency in the distribution and morphology of cells within the healthy prefrontal cortex of the rat. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1–9.
- Konsman, J. (2022). Cytokines in the Brain and Neuroinflammation: We Didn’t Starve the Fire! In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 2, p. 140). <https://doi.org/10.3390/ph15020140>
- Krakowiak, P., Walker, C. K., Tancredi, D., Hertz-Picciotto, I., & Van de Water, J. (2017). Autism-specific maternal anti-fetal brain autoantibodies are associated with metabolic conditions. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 10(1), 89–98.
- Kuo H-Y and Liu F-C (2018) Molecular Pathology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder-Like Phenotypes Using Rodent Models. *Front. Cell. Neurosci*, 12: 422. doi: 10.3389/fncel.2018.00422
- Lee, A. S., Azmitia, E. C., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2017). Developmental microglial priming in postmortem autism spectrum disorder temporal cortex. *Brain, Behavior, and Immunity*, 62, 193–202.
- Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17(3), 157–172.

- <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H. A., & Liu, G. (2021). Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advancement of Science*, 8(15), e2004433.
- Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X.-M., Ji, L., Brown, T., & Malik, M. (2009). Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal of Neuroimmunology*, 207(1-2), 111–116.
- 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 and Adolescent Psychiatry*, 56(6), 466–474.
- López-Cacho, J. M., Gallardo, S., Posada, M., Aguerri, M., Calzada, D., Mayayo, T., Lahoz, C., & Cárdbaba, B. (2016). Characterization of immune cell phenotypes in adults with autism spectrum disorders. *Journal of Investigative Medicine*, 64(7), 1179–1185. <https://doi.org/10.1136/jim-2016-000070>
- Lord, C., Brugha, T. S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., Jones, E. J. H., Jones, R. M., Pickles, A., Matthew W. State, Taylor, J. L., & Veenstra-VanderWeele, J. (2020). Autism spectrum disorder. *Nature Reviews. Disease Primers*, 6(1), 5.
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392(10146), 508–520.
- Lotter, V. (1967). Epidemiology of autistic conditions in young children. In *Social Psychiatry* (Vol. 1, Issue 4, pp. 163–173). <https://doi.org/10.1007/bf00578950>
- Lyall, K., Van de Water, J., Ashwood, P., & Hertz-Picciotto, I. (2015). Asthma and Allergies in Children With Autism Spectrum Disorders: Results From the CHARGE Study. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 8(5), 567–574.
- Madore, C., Leyrolle, Q., Morel, L., Rossitto, M., Greenhalgh, A. D., Delpech, J. C., Martinat, M., Bosch-Bouju, C., Bourel, J., Rani, B., Lacabanne, C., Thomazeau, A., Hopperton, K. E., Beccari, S., Sere, A., Aubert, A., De Smedt-Peyrusse, V., Lecours, C., Bisht, K., ... Layé, S. (2020). Essential omega-3 fatty acids tune microglial phagocytosis of synaptic elements in the mouse developing brain. *Nature Communications*, 11(1), 1–19.
- Maenner, M. J., Shaw, K. A., Bakian, A. V., Bilder, D. A., Durkin, M. S., Esler, A., Furnier, S. M., Hallas, L., Hall-Lande, J., Hudson, A., Hughes, M. M., Patrick, M., Pierce, K., Poynter, J. N., Salinas, A., Shenouda, J., Vehorn, A., Warren, Z., Constantino, J. N., ... Cogswell, M. E. (2021). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries*, 70(11), 1–16.
- Majerczyk D., Ayad E. G., Brewton K. L., Saing P., Hart P. C. (2022). Systemic maternal inflammation promotes ASD via IL-6 and IFN- γ . *Bioscience Reports* 42(11): BSR20220713. <https://doi.org/10.1042/BSR20220713>
- Mapunda, J. A., Tibar, H., Regragui, W., & Engelhardt, B. (2022). How Does the Immune System Enter the Brain? *Frontiers in Immunology*, 13, 805657.
- Martínez-Cerdeño, V. (2017). Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Developmental Neurobiology*, 77(4), 393.
- Martínez-Tapia, R. J., Estrada-Rojo, F., Hernández-Chávez, A. A., Barajas-Martínez, A., Islas Escoto, S., Navarro, L., & Chavarría, A. (2018). Neuroinflamación: el ying-yang de la neuroinmunología. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 61(5), 44–53.
- Masi, A., Breen, E. J., Alvares, G. A., Glozier, N., Hickie, I. B., Hunt, A., Hui, J., Beilby, J.,

- Ravine, D., Wray, J., Whitehouse, A. J. O., & Guastella, A. J. (2017). Cytokine levels and associations with symptom severity in male and female children with autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, 8(1), 1–11.
- Masi, A., Glozier, N., Dale, R., & Guastella, A. J. (2017). The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience Bulletin*, 33(2), 194.
- Masi, A., Quintana, D. S., Glozier, N., Lloyd, A. R., Hickie, I. B., & Guastella, A. J. (2014). Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 20(4), 440–446.
- Matta, S. M., Moore, Z., Walker, F. R., Hill-Yardin, E. L., & Crack, P. J. (2020). An altered glial phenotype in the NL3 mouse model of autism. *Scientific Reports*, 10(1), 14492.
- Meltzer, A., & Van de Water, J. (2017). The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(1), 284.
- Meyza, K. Z., & Blanchard, D. C. (2017). The BTBR mouse model of idiopathic autism - Current view on mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 76(Pt A). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.037>
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T. J. (2017). Neuroinflammation and Oxidative Injury in Developmental Neurotoxicity. In *Reproductive and Developmental Toxicology* (pp. 1051–1061). Academic Press.
- Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 167–202.
- Miller, E. K., & Wallis, J. D. (2009). Executive Function and Higher-Order Cognition: Definition and Neural Substrates. *Encyclopedia of Neuroscience*, 99–104.
- Mizuno, T., Zhang, G., Takeuchi, H., Kawanokuchi, J., Wang, J., Sonobe, Y., Jin, S., Takada, N., Komatsu, Y., & Suzumura, A. (2008). Interferon- γ directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN- γ receptor and AMPA GluR1 receptor. In *The FASEB Journal* (Vol. 22, Issue 6, pp. 1797–1806). <https://doi.org/10.1096/fj.07-099499>
- Mohebiany A. N., Harroch S., Bouyain S. (2014). New insights into the roles of the contactin cell adhesion molecules in neural development. *Adv Neurobiol*, 8: 165-94. DOI: 10.1007/978-1-4614-8090-7_8.
- Molnár, Z., Clowry, G. J., Šestan, N., Alzu'bi, A., Bakken, T., Hevner, R. F., Hüppi, P. S., Kostović, I., Rakic, P., Anton, E. S., Edwards, D., Garcez, P., Hoerder-Suabedissen, A., & Kriegstein, A. (2019). New insights into the development of the human cerebral cortex. *Journal of Anatomy*, 235(3), 432–451.
- Moore A., Chinnaiya K., Kim D. W., Brown S., Stewart I., Robins S., Dowsett G. K. C., Muir C., Travaglio M., Lewis J. E., Ebling F., Blackshaw S., Furley A., Placzek M. (2022). Loss of Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NrCAM Regulates Differentiation, Proliferation and Neurogenesis in Early Postnatal Hypothalamic Tanycytes. *Front. Neurosci*, 16: 832961. DOI: 10.3389/fnins.2022.832961
- Morgan, J. T., Barger, N., Amaral, D. G., & Schumann, C. M. (2014). Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder. *PLoS One*, 9(10), e110356.
- Morgan, J. T., Chana, G., Abramson, I., Semendeferi, K., Courchesne, E., & Everall, I. P. (2012). Abnormal microglial-neuronal spatial organization in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Brain Research*, 1456, 72–81.
- Morgan, J. T., Chana, G., Pardo, C. A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne,

- E., & Everall, I. P. (2010). Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biological Psychiatry*, 68(4), 368–376.
- Morimoto, K., & Nakajima, K. (2019). Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. *Frontiers in Neuroscience*, 0. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00916>
- Morris-Rosendahl, D. J., & Crocq, M.-A. (2020). Neurodevelopmental disorders—the history and future of a diagnostic concept. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(1), 65.
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Nonneman, R. J., Segall, S. K., Andrade, G. M., Crawley, J. N., & Magnuson, T. R. (2008). Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research*, 191(1), 118–129.
- Moy, S. S., Riddick, N. V., Nikolova, V. D., Teng, B. L., Agster, K. L., Nonneman, R. J., Young, N. B., Baker, L. K., Nadler, J. J., & Bodfish, J. W. (2014). Repetitive behavior profile and supersensitivity to amphetamine in the C58/J mouse model of autism. *Behavioural Brain Research*, 259, 200–214.
- Nadgir, R., & David M. Yousem MD, M. B. A. (2017). Cranial Anatomy. In Elsevier, Inc (Ed.), *Neuroradiology: The Requisites* (pp. 1–39). Elsevier, Inc.
- Napolioni, V., Ober-Reynolds, B., Szelinger, S., Corneveaux, J. J., Pawlowski, T., Ober-Reynolds, S., Kirwan, J., Persico, A. M., Melmed, R. D., Craig, D. W., Smith, C. J., & Huentelman, M. J. (2013). Plasma cytokine profiling in sibling pairs discordant for autism spectrum disorder. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 1–12.
- Norris, G. T., & Kipnis, J. (2019). Immune cells and CNS physiology: Microglia and beyond. *The Journal of Experimental Medicine*, 216(1), 60–70.
- Ousman, S. S., & Kubes, P. (2012). Immune surveillance in the central nervous system. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1096–1101.
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., & Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology*, 29, 71–109.
- Palomero-Gallagher, N., & Zilles, K. (2019). Cortical layers: Cyto-, myelo-, receptor- and synaptic architecture in human cortical areas. *NeuroImage*, 197, 716–741.
- Pardo, C. A., Vargas, D. L., & Zimmerman, A. W. (2005). Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *International Review of Psychiatry*, 17(6). <https://doi.org/10.1080/02646830500381930>
- Paasila, P. J., Davies, D. S., Sutherland, G. T., Goldsbury, C. (2020). Clustering of activated microglia occurs before the formation of dystrophic neurites in the evolution of A β plaques in Alzheimer's disease. *Free Neuropathol.* doi: 10.17879/freeneuropathology-2020-2845.
- Parthasarathy, G., Pattison, M. B., Midkiff, C. C. (2023). The FGF/FGFR system in the microglial neuroinflammation with *Borrelia burgdorferi*: likely intersectionality with other neurological conditions. *J Neuroinflammation* 20, 10. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02681-x>
- Pawelec P., Ziemka-Nalecz M., Sypecka J., Zalewska T. (2020). The Impact of the CX3CL1/CX3CR1 Axis in Neurological Disorders. *Cells*, 9(10): 2277. DOI: 10.3390/cells9102277.
- Parenti, I., Rabaneda, L. G., Schoen, H., & Novarino, G. (2020). Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 43, Issue 8, pp. 608–621). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.004>
- Pearce, J. M. S. (2005). Kanner's infantile autism and Asperger's syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 76(2), 205.
- Penner, M., Anagnostou, E., Andoni, L. Y., & Ungar, W. J. (2018). Systematic review of clinical

- guidance documents for autism spectrum disorder diagnostic assessment in select regions. *Autism: The International Journal of Research and Practice*, 22(5), 517–527.
- Pensado-López, A., Veiga-Rúa, S., Carracedo, Á., Allegue, C., & Sánchez, L. (2020). Experimental Models to Study Autism Spectrum Disorders: hiPSCs, Rodents and Zebrafish. *Genes*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/genes11111376>
- Perrin J, Le Coadic M, Vernay A, Dias M, Gopaldass N, Ouertatani-Sakouhi H, Cosson P. (2015). TM9 family proteins control surface targeting of glycine-rich transmembrane domains. *J Cell Sci*. 1;128(13):2269-77. doi: 10.1242/jcs.164848
- Persico, A. M., & Merelli, S. (2015). Environmental Factors and Autism Spectrum Disorder. In *Autism Spectrum Disorders* (pp. 113–134). <https://doi.org/10.1159/000363611>
- Petrelli, F., Pucci, L., & Bezzi, P. (2016). Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 0. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00021>
- Pozniak, P. D., White, M. K., & Khalili, K. (2013). TNF- α /NF- κ B Signaling in the CNS: Possible Connection to EPHB2. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 9(2), 133–141.
- Prigge, M. B. D., Lange, N., Bigler, E. D., King, J. B., Dean, D. C., III, Adluru, N., Alexander, V., Lainhart, J. E., & Zielinski, B. A. (2021). A 16-year study of longitudinal volumetric brain development in males with autism. *NeuroImage*, 236, 118067.
- Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292–311.
- Prinz, M., Masuda, T., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2021). Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages-From Origin to Disease Modulation. *Annual Review of Immunology*, 39, 251–277.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., White, L., Mooney, R., & Platt, M. (2018). *Neuroscience*.
- Quartier A., Courraud J., Thi Ha T., McGillivray G., Isidor B., Rose K., Drouot N., Savidan M. A., Feger C., Jagline H., Chelly J., Shaw M., Laumonnier F., Gecz J., Mandel J. L., Piton A. (2019). Novel mutations in NLGN3 causing autism spectrum disorder and cognitive impairment. *Hum Mutat* 40(11): 2021-2032. doi: 10.1002/humu.23836.
- Raffaele, S., Lombardi, M., Verderio, C., & Fumagalli, M. (2020). TNF Production and Release from Microglia via Extracellular Vesicles: Impact on Brain Functions. *Cells*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/cells9102145>
- Ramirez-Celis, A., Becker, M., Nuño, M., Schauer, J., Aghaeepour, N., & Van de Water, J. (2021). Risk assessment analysis for maternal autoantibody-related autism (MAR-ASD): a subtype of autism. *Molecular Psychiatry* 2021 26:5, 26(5), 1551–1560. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00998-8>
- Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1164.
- Ricci S., Businaro R., Ippoliti F., Lo Vasco V. R., Massoni F., Onofri E., Troili G. M., Pontecorvi V., Morelli M., Rapp Ricciardi M., Archer T. (2013). Altered Cytokine and BDNF Levels in Autism Spectrum Disorder. *Neurotox Res* 24, 491–501. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9393-4>
- Robinson-Agramonte, M. de L. A., Noris García, E., Fraga Guerra, J., Vega Hurtado, Y., Antonucci, N., Semprún-Hernández, N., Schultz, S., & Siniscalco, D. (2022). Immune Dysregulation in Autism Spectrum Disorder: What Do We Know about It? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/ijms23063033>

- Rockland, K. (2017). Anatomy of the Cerebral Cortex. In *The Cerebral Cortex in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders* (pp. 3–36). Academic Press.
- Rockland, K. S., & DeFelipe, J. (2018). Editorial: Why Have Cortical Layers? What Is the Function of Layering? Do Neurons in Cortex Integrate Information Across Different Layers? *Frontiers in Neuroanatomy*, *12*, 78.
- Rodriguez, J. I., & Kern, J. K. (2011). Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *Neuron Glia Biology*, *7*(2-4), 205.
- Rosen, N. E., Lord, C., & Volkmar, F. R. (2021). The Diagnosis of Autism: From Kanner to DSM-III to DSM-5 and Beyond. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *51*(12), 4253.
- Ruan, C., & Elyaman, W. (2022). A New Understanding of TMEM119 as a Marker of Microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *0*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.902372>
- Rutter, M. (1972). Childhood schizophrenia reconsidered. *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia*, *2*(4), 315–337.
- Rutter, M. (1978). Diagnosis and definition of childhood autism. In *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia* (Vol. 8, Issue 2, pp. 139–161). <https://doi.org/10.1007/bf01537863>
- 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.
- Rylaarsdam, L., & Guemez-Gamboa, A. (2019). Genetic Causes and Modifiers of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00385>
- Saghazadeh, A., Ataenia, B., Keynejad, K., Abdolalizadeh, A., Hirbod-Mobarakeh, A., & Rezaei, N. (2019). A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: Effects of age, gender, and latitude. *Journal of Psychiatric Research*, *115*, 90–102.
- Satoh, J.-I., Kino, Y., Yanaizu, M., Ishida, T., & Saito, Y. (2019). Microglia express TMEM119 in the brains of Nasu-Hakola disease. *Intractable & Rare Diseases Research*, *8*(4), 260–265.
- Satoh, J., Kino, Y., Asahina, N., Takitani, M., Miyoshi, J., Ishida, T., & Saito, Y. (2016). TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, *36*(1). <https://doi.org/10.1111/neup.12235>
- Schaaf, Z. A., Tat, L., Cannizzaro, N., Green, R., Rüllicke, T., Hippenmeyer, S., & Zarbalis, K. S. (2022). WDFY3 mutation alters laminar position and morphology of cortical neurons. *Molecular Autism*, *13*(1), 27.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. *74*(4), 691-705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.
- Schafer DP, Heller CT, Gunner G, Heller M, Gordon C, Hammond T, Wolf Y, Jung S, Stevens B. (2016). Microglia contribute to circuit defects in Mecp2 null mice independent of microglia-specific loss of Mecp2 expression. *Elife* *5*: e15224. doi: 10.7554/eLife.15224.
- Schaffer A. E., Breuss M. W., Caglayan A. O., Al-Sanaa N., Al-Abdulwahed H. Y., Kaymakçalan H., Yılmaz C., Zaki M. S., Rosti R. O., Copeland B., Baek S. T., Musaeu D., Scott E. C., Ben-Omran T., Kariminejad A., Kayserili H., Mojahedi F., Kara M., Cai N., Silhavy J. L., Elsharif S., Fenercioglu E., Barshop B. A., Kara B., Wang R., Stanley V., James K. N., Nachnani R., Kalur A., Megahed H., Incecik F., Danda S., Alanay Y., Faqeih E., Melikishvili G., Mansour L., Miller I., Sukhudyay B., Chelly J., Dobyns W. B., Bilguvar K., Jamra R. A., Gunel M., Gleeson J. G. (2018). Biallelic loss of human CTNNA2, encoding α N-catenin, leads to ARP2/3 complex overactivity and disordered cortical neuronal migration. *Nat Genet*,

- 50(8) :1093-1101. doi: 10.1038/s41588-018-0166-0.
- Schiff, M., & Asato, M. R. (2015). Autism and Medical Comorbidities. In *Autism Spectrum Disorders* (pp. 20–33). <https://doi.org/10.1159/000363562>
- Schumann, C. M., Bloss, C. S., Barnes, C. C., Wideman, G. M., Carper, R. A., Akshoomoff, N., Pierce, K., Hagler, D., Schork, N., Lord, C., & Courchesne, E. (2010). Longitudinal magnetic resonance imaging study of cortical development through early childhood in autism. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(12). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5714-09.2010>
- Sha, Z., van Rooij, D., Anagnostou, E., Arango, C., Auzias, G., Behrmann, M., Bernhardt, B., Bolte, S., Busatto, G. F., Calderoni, S., Calvo, R., Daly, E., Deruelle, C., Duan, M., Duran, F. L. S., Durston, S., Ecker, C., Ehrlich, S., Fair, D., ... Francks, C. (2022). Subtly altered topological asymmetry of brain structural covariance networks in autism spectrum disorder across 43 datasets from the ENIGMA consortium. *Molecular Psychiatry*, 27(4), 2114–2125.
- Shipp, S. (2007). Structure and function of the cerebral cortex. *Current Biology: CB*, 17(12), R443–R449.
- Silberman, S. (2017). *NeuroTribes: The Legacy of Autism and How to Think Smarter About People Who Think Differently*. Atlantic Books.
- Simons Foundation Autism Research Initiative. (2022, February 23). *Gene Scoring Module*. SFARI Gene. <https://gene.sfari.org/database/gene-scoring/>
- Sochocka, M., Diniz, B. S., & Leszek, J. (2016). Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Molecular Neurobiology*, 54(10), 8071–8089.
- Solso, S., Xu, R., Proudfoot, J., Hagler, D. J., Campbell, K., Venkatraman, V., Barnes, C. C., Ahrens-Barbeau, C., Pierce, K., Dale, A., Eyler, L., & Courchesne, E. (2016). Diffusion Tensor Imaging Provides Evidence of Possible Axonal Overconnectivity in Frontal Lobes in Autism Spectrum Disorder Toddlers. In *Biological Psychiatry* (Vol. 79, Issue 8, pp. 676–684). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.06.029>
- Song, M., Martinowich, K., & Lee, F. S. (2017). BDNF at the synapse: why location matters. *Molecular Psychiatry*, 22(10), 1370–1375.
- Song W., Li Q., Wang T., Li Y., Fan T., Zhang J., Wang Q., Pan J., Dong Q., Sun Z. S., Wang Y. (2022). Putative complement control protein CSMD3 dysfunction impairs synaptogenesis and induces neurodevelopmental disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 102: 237-250. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.02.027>.
- Sousa, C., Biber, K., & Michelucci, A. (2017). Cellular and Molecular Characterization of Microglia: A Unique Immune Cell Population. *Frontiers in Immunology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00198>
- Ståhlberg, O., Nilsson, T., Lundström, S., & Anckarsäter, H. (2015). Autism Spectrum Disorders and Coexisting Mental Health Problems. In *Autism Spectrum Disorders* (Vol. 180, pp. 5–19). Karger Publishers.
- Strang, K. H., Golde, T. E., & Giasson, B. I. (2019). MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Laboratory Investigation*, 99(7): 912–928.
- Stephenson D. T., O'Neill S. M., Narayan S., Tiwari A., Arnold E., Samaroo H. D., Du F., Ring R. H., Campbell B., Pletcher M., Vaidya V. A., Morton D. (2011). Histopathologic characterization of the BTBR mouse model of autistic-like behavior reveals selective changes in neurodevelopmental proteins and adult hippocampal neurogenesis. *Mol Autism*, 2(1): 7. doi: 10.1186/2040-2392-2-7.
- Steven Leary, Wendy Underwood, Raymond Anthony, Samuel Cartner, Temple Grandin, Cheryl Greenacre, Sharon Gwaltney-Brant, Mary Ann McCrkin, Robert Meyer, David Miller, Jan

- Shearer, Tracy Turner, Roy Yanong. (2020). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*.
- 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. *The New England Journal of Medicine*, *370*(13), 1209–1219.
- Sun, L., Meng, Z., Zhu, Y., Lu J., Li Z., Zhao Q., Huang Y., Jianq L., Yao X. (2018). TM9SF4 is a novel factor promoting autophagic flux under amino acid starvation. *Cell Death Differ* *25*, 368–379. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.166>
- Suzuki, K., Matsuzaki, H., Iwata, K., Kamen, Y., Shimmura, C., Kawai, S., Yoshihara, Y., Wakuda, T., Takebayashi, K., Takagai, S., Matsumoto, K., Tsuchiya, K. J., Iwata, Y., Nakamura, K., Tsujii, M., Sugiyama, T., & Mori, N. (2011). Plasma Cytokine Profiles in Subjects with High-Functioning Autism Spectrum Disorders. *PloS One*, *6*(5), e20470.
- Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., Yoshihara, Y., Omata, K., Matsumoto, K., Tsuchiya, K. J., Iwata, Y., Tsujii, M., Sugiyama, T., & Mori, N. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, *70*(1). <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.272>
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, *53*(2). <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Tan, Y.-L., Yuan, Y., & Tian, L. (2019). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular Psychiatry*, *25*(2), 351–367.
- Tartaglione, A. M., Villani, A., Ajmone-Cat, M. A., Minghetti, L., Ricceri, L., Pazienza, V., De Simone, R., & Calamandrei, G. (2022). Maternal immune activation induces autism-like changes in behavior, neuroinflammatory profile and gut microbiota in mouse offspring of both sexes. *Translational Psychiatry*, *12*(1), 1–10.
- Ta, T.-T., Dikmen, H. O., Schilling, S., Chausse, B., Lewen, A., Hollnagel, J.-O., & Kann, O. (2019). Priming of microglia with IFN- γ slows neuronal gamma oscillations in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(10), 4637–4642.
- Taylor, D. L., Jones, F., Chen Seho Kubota, E. S., & Pocock, J. M. (2005). Stimulation of Microglial Metabotropic Glutamate Receptor mGlu2 Triggers Tumor Necrosis Factor α -Induced Neurotoxicity in Concert with Microglial-Derived Fas Ligand. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(11), 2952–2964.
- Tay, T. L., Béchade, C., D'Andrea, I., St-Pierre, M.-K., Henry, M. S., Roumier, A., & Tremblay, M.-E. (2018). Microglia Gone Rogue: Impacts on Psychiatric Disorders across the Lifespan. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *0*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00421>
- Tetreault, N. A., Hakeem, A. Y., Jiang, S., Williams, B. A., Allman, E., Wold, B. J., & Allman, J. M. (2012). Microglia in the cerebral cortex in autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *42*(12), 2569–2584.
- Theoharides, T. C., Asadi, S., & Patel, A. B. (2013). Focal brain inflammation and autism. *Journal of Neuroinflammation*, *10*(1), 1–7.
- Theoharides, T. C., & Zhang, B. (2011). Neuro-inflammation, blood-brain barrier, seizures and autism. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 1–5.
- Thurm, A., Farmer, C., Salzman, E., Lord, C., & Bishop, S. (2019). State of the Field: Differentiating Intellectual Disability From Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Psychiatry / Frontiers Research Foundation*, *10*, 526.
- Tick, B., Colvert, E., McEwen, F., Stewart, C., Woodhouse, E., Gillan, N., Hallett, V., Lietz, S.,

- Garnett, T., Simonoff, E., Ronald, A., Bolton, P., Happé, F., & Rijsdijk, F. (2016). Autism Spectrum Disorders and Other Mental Health Problems: Exploring Etiological Overlaps and Phenotypic Causal Associations. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *55*(2), 106–113.e4.
- Tioleco, N., Silberman, A. E., Stratigos, K., Banerjee-Basu, S., Spann, M. N., Whitaker, A. H., & Turner, J. B. (2021). Prenatal maternal infection and risk for autism in offspring: A meta-analysis. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, *14*(6), 1296–1316.
- Tobe, R., Kim, Y. S., Owley, T. B., & Leventhal, B. L. (2012). The Autistic Spectrum Disorders. In *Clinical Child Psychiatry* (pp. 353–376). <https://doi.org/10.1002/9781119962229.ch21>
- Tonhajzerova I., Ondrejka I., Mestanik M., Milkolka P., Hrtanek I., Mestanikova A., Bujnakova I., Mokra D. (2015). Inflammatory Activity in autism Spectrum Disorder. *Respiratory Health. Advances in Experimental Medicine and Biology*(), vol 861. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/5584_2015_145
- Tosches, M. A. (2021). From Cell Types to an Integrated Understanding of Brain Evolution: The Case of the Cerebral Cortex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *37*, 495–517.
- Tromans, S., Chester, V., Gemegah, E., Roberts, K., Morgan, Z., Yao, G. L., & Brugha, T. (2021). Autism identification across ethnic groups: a narrative review. In *Advances in Autism* (Vol. 7, Issue 3, pp. 241–255). <https://doi.org/10.1108/aia-03-2020-0017>
- Tsilioni, I., Taliou, A., Francis, K., Theoharides T. C. (2015). Children with autism spectrum disorders, who improved with a luteolin-containing dietary formulation, show reduced serum levels of TNF and IL-6. *Transl Psychiatry* *5*, e647. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.142>
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience* *16*, 543–551 <https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Vaccarino, F. M., & Smith, K. M. (2009). Increased brain size in autism—what it will take to solve a mystery. *Biological Psychiatry*, *66*(4), 313.
- Van Essen, D. C., Donahue, C. J., & Glasser, M. F. (2018). Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex. *Biotechnology and Bioprocess Engineering: BBE*, *91*, 158–169.
- van Horsen, J., Singh, S., van der Pol, S., Kipp, M., Lim, J. L., Peferoen, L., Gerritsen, W., Kooi, E., Witte, M. E., Geurts, J. JG., de Vries, H. E., Peferoen-Baert, R., van den Elsen, P. J., van der Valk, P., Amor S. (2012). Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *J Neuroinflammation* *9*, 156. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-156>
- van Rooij, D., Anagnostou, E., Arango, C., Auzias, G., Behrmann, M., Filho, G. B., Calderoni, S., Calvo, R., Daly, E., Deruelle, C., Di Martino, A., Dinstein, I., Duran, F. L. S., Durston, S., Ecker, C., Ehrlich, S., Fair, D., Fedor, J., Feng, X., ... Francks, C. (2019). Altered structural brain asymmetry in autism spectrum disorder in a study of 54 datasets. *Nature Communications*, *10*(1), 1–12.
- Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, *57*(1), 67–81.
- Varghese, M., Keshav, N., Jacot-Descombes, S., Warda, T., Wicinski, B., Dickstein, D. L., Harony-Nicolas, H., De Rubeis, S., Drapeau, E., Buxbaum, J. D., & Hof, P. R. (2017). Autism spectrum disorder: Neuropathology and animal models. *Acta Neuropathologica*, *134*(4), 537.
- Vásquez, B., & del Sol, M. (2021). Role of Neuroglia in Autism Spectrum Disorder. *International*

- Journal of Morphology = Revista Internacional de Morfologia*, 39(3), 920–927.
- Velmeshev, D., Schirmer, L., Jung, D., Haeussler, M., Perez, Y., Mayer, S., Bhaduri, A., Goyal, N., Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2019). Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. In *Science* (Vol. 364, Issue 6441, pp. 685–689). <https://doi.org/10.1126/science.aav8130>
- Vivanti, G., & Messinger, D. S. (2021). Theories of Autism and Autism Treatment from the DSM III Through the Present and Beyond: Impact on Research and Practice. In *Journal of Autism and Developmental Disorders* (Vol. 51, Issue 12, pp. 4309–4320). <https://doi.org/10.1007/s10803-021-04887-z>
- Volkmar, F. R., Cohen, D. J., & Paul, R. (1986). An Evaluation of DSM-III Criteria for Infantile Autism. In *Journal of the American Academy of Child Psychiatry* (Vol. 25, Issue 2, pp. 190–197). [https://doi.org/10.1016/s0002-7138\(09\)60226-0](https://doi.org/10.1016/s0002-7138(09)60226-0)
- Wagstyl, K., Larocque, S., Cucurull, G., Lepage, C., Cohen, J. P., Bludau, S., Palomero-Gallagher, N., Lewis, L. B., Funck, T., Spitzer, H., Dickscheid, T., Fletcher, P. C., Romero, A., Zilles, K., Amunts, K., Bengio, Y., & Evans, A. C. (2020). BigBrain 3D atlas of cortical layers: Cortical and laminar thickness gradients diverge in sensory and motor cortices. *PLoS Biology*, 18(4), e3000678.
- Waligóra, A., Waligóra, S., Kozarska, M., Damasiewicz-Bodzek, A., Gorczyca, P., & Tyrpień-Golder, K. (2019). Autism spectrum disorder (ASD) - biomarkers of oxidative stress and methylation and transsulfuration cycle. *Psychiatria Polska*, 53(4), 771–788.
- Wang, K., Duan, W., Duan, Y., Yu, Y., Chen, X., Xu, Y., Chen, H., Huang, H., & Xiong, B. (2021). A Bibliometric Insight of Genetic Factors in ASD: Emerging Trends and New Developments. *Brain Sciences*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/brainsci11010033>
- Warre-Cornish K., Perfect L., Nagy R., Duarte R. R. R., Reid M. J., Raval P., Mueller A., Evans A. L., Couch A., Ghevaert C., McAlonan G., Loth E., Murphy D., Powell T. R., Vernon A. C., Srivastava D. P., Price J. (2020). Interferon- γ signaling in human iPSC-derived neurons recapitulates neurodevelopmental disorder phenotypes. *Sci Adv.* 19;6(34): eaay9506. doi: 10.1126/sciadv.aay9506.
- Wei, H., Chadman, K. K., McCloskey, D. P., Sheikh, A. M., Malik, M., & Brown, W. T. (2012). Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(6), 831–842.
- Wei, H., Zou, H., Sheikh, A. M., Malik, M., Dobkin, C., Brown, W. T., & Li, X. (2011). IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 1–10.
- Wilkes, B. J., Bass, C., Korah, H., Febo, M., & Lewis, M. H. (2019). Volumetric magnetic resonance and diffusion tensor imaging of C58/J mice: neural correlates of repetitive behavior. *Brain Imaging and Behavior*, 14(6), 2084–2096.
- Wiśniowiecka-Kowalnik, B., & Nowakowska, B. A. (2019). Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder—current evidence in the field. In *Journal of Applied Genetics* (Vol. 60, Issue 1, pp. 37–47). <https://doi.org/10.1007/s13353-018-00480-w>
- Woodburn, S. C., Bollinger, J. L., & Wohleb, E. S. (2021). The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 1–16.
- World Health Organization. (2019). *The International Classification of Diseases, 11th edition (ICD-11)* (American College of Physicians (Ed.)). World Health Organization.
- World Health Organization. (2022). *Autism*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>

- Wrigley S., Arafa D., Tropea D. (2017). Insulin-Like Growth Factor 1: At the Crossroads of Brain Development and Aging. *Front. Cell. Neurosci.*, 11:14. doi: 10.3389/fncel.2017.00014
- Xu, Z.-X., Kim, G. H., Tan, J.-W., Riso, A. E., Sun, Y., Xu, E. Y., Liao, G.-Y., Xu, H., Lee, S.-H., Do, N.-Y., Lee, C. H., Clipperton-Allen, A. E., Kwon, S., Page, D. T., Lee, K. J., & Xu, B. (2020). Elevated protein synthesis in microglia causes autism-like synaptic and behavioral aberrations. *Nature Communications*, 11(1), 1–17.
- Xie M, Mak JWY, Yu H, Cheng CTY, Chan HCH, Chan TT, Lau LHS, Wong MTL, Ko WH, Jiang L, Yao X. (2022). TM9SF4 Is a Crucial Regulator of Inflammation and ER Stress in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 14(2):245-270. doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.04.002.
- Yang L., Liu C. C., Zheng H., Kanekiyo T., Atagi Y., Jia L., Wang D., N'songo A., Can D., Xu H., Chen X. F., Bu G. (2016). LRP1 modulates the microglial immune response via regulation of JNK and NF- κ B signaling pathways. *J Neuroinflammation*, 13(1): 304. doi: 10.1186/s12974-016-0772-7.
- Yankowitz, L. D., Herrington, J. D., Yerys, B. E., Pereira, J. A., Pandey, J., & Schultz, R. T. (2020). Evidence against the “normalization” prediction of the early brain overgrowth hypothesis of autism. *Molecular Autism*, 11(1), 51.
- Yoon, S. H., Choi, J., Lee, W. J., & Do, J. T. (2020). Genetic and Epigenetic Etiology Underlying Autism Spectrum Disorder. *Journal of Clinical Medicine Research*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/jcm9040966>
- Young, H. A., & Hodge, D. L. (2003). Interferon- γ . *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, 391–397.
- Zeidan, J., Fombonne, E., Scolah, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., & Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 15(5), 778–790.
- Zeldovich, L. (2018). Cold parenting? Childhood schizophrenia? How the diagnosis of autism has evolved over time. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aau1206>
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27.
- Zhang, Y., Liu, X., Guo, R., Xu, W., Guo, Q., Hao, C., Ni, X., & Li, W. (2021). Biological implications of genetic variations in autism spectrum disorders from genomics studies. *Bioscience Reports*, 41(7). <https://doi.org/10.1042/BSR20210593>
- Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, 17(3), 400–406. DOI: 10.1038/nn.3641
- Zhao, H., Zhang, H., Liu, S., Luo, W., Jiang, Y., & Gao, J. (2021). Association of Peripheral Blood Levels of Cytokines With Autism Spectrum Disorder: A Meta-Analysis. *Frontiers in Psychiatry / Frontiers Research Foundation*, 0. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.670200>
- Zheng, W., Zhao, Z., Zhang, Z., Liu, T., Zhang, Y., Fan, J., & Wu, D. (2021). Developmental pattern of the cortical topology in high-functioning individuals with autism spectrum disorder. *Human Brain Mapping*, 42(3), 660–675.
- Zilles, K. (2018). Brodmann: a pioneer of human brain mapping—his impact on concepts of cortical organization. In *Brain* (Vol. 141, Issue 11, pp. 3262–3278). <https://doi.org/10.1093/brain/awy273>

13. ANEXOS

ANEXO I. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN (NND) DE LA MICROGLÍA.

El procedimiento descrito en el artículo *Immunofluorescence Staining Using IBA1 and TMEM119 for Microglial Density, Morphology and Peripheral Myeloid Cell Infiltration Analysis in Mouse Brain* (González Ibanez et al., 2019) se modificó para cumplir nuestros objetivos.

Las imágenes se abren en el programa ImageJ con el plugin instalado **Nearest Neighbor Distance (NND)**. Después de fijar la escala, establecer los parámetros de medición.

Crear una imagen compuesta con todos los canales RGB (Red, Green, Blue) y seleccionar y ajustar el área de interés (ROI).

Posteriormente, medir los parámetros establecidos y marcar en el canal IBA-1 con puntos (tamaño 10; uno por célula positiva para IBA-1) sin sobreponerse a los demás canales.

Separar los canales de la imagen original. Identificar el canal marcado y ajustar la imagen a 8-bits.

Ajustar el umbral B/N para observar los puntos en contraste con el fondo y borrar aquellos que no pertenecen a células IBA-1⁺.

Analizar las partículas (tamaño 3-20 píxeles) eliminando el ruido de fondo. Seleccionar el plugin NND para analizar las distancias entre puntos. Los resultados se pueden guardar y visualizar en la ventana de resultados, resumen y en ROI Manager.

ANEXO II. LISTA DE SOLUCIONES Y ANTICUERPOS

- Albúmina 2% + leche 3%

Albúmina sérica bovina liofilizada (0.2 g) + leche en polvo (0.3 g) en 10 mL de TBS-Tween 0.1%.
- Amortiguador de citrato de sodio 10 mM
Citrato de sodio (1.47 g), Tween ® 20 (20 uL), agua destilada c.b.p. 500 mL, pH = 6.0.
- PBS 1x (0.01 M)
Cloruro de sodio (8 g), cloruro de potasio (0.2 g), fosfato de sodio dibásico (1.44 g), fosfato monopotásico (0.24 g), agua destilada c.b.p. 1000 mL, pH = 7.4.
- RIPA (amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas)
Tris 20 mM, Sacarosa 0.25 M, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM, Triton X-100 1%, Cóctel de Inhibidores de Proteasas (1 tableta/10 mL)
- Suero de cabra 5%
Suero de cabra normal (50 uL), TBS 1x (950 uL).
- TBS 10x
Trízma ® hydrochloride (70.2 g), Trizma ® base (6.7 g), cloruro de sodio (87.66 g), agua destilada c.b.p. 1000 mL, pH = 7.5.
- TBS-Tween 0.1%
TBS 10x (100 mL), Tween ® 20 (1 mL), agua destilada c.b.p. 1000 mL.
- Anticuerpos primarios
 - IgG policlonal de conejo anti-IBA1; FUJIFILM Wako Chemicals; 019-19741
 - IgG monoclonal de ratón anti-Tubulina α ; Santa Cruz Biotechnology; sc-398103
 - IgG monoclonal de conejo anti-TMEM119; Abcam Cambridge; ab210405
 - IgG monoclonal de ratón anti-GAPDH; Santa Cruz Biotechnology; sc-32233 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.)
- Anticuerpos secundarios
 - IgG de cabra Alexa-Fluor ® 594 anti-conejo; Life Technologies; R37117
 - Proteína de unión a IgGk de ratón conjugada a peroxidasa de rábano (HRP); Santa Cruz Biotechnology; sc-516102
 - IgG de cabra conjugado a HRP anti-conejo; Jackson Immunoresearch; 1111-035-003