



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Modificaciones en las proteínas del citoesqueleto en
un modelo murino de autismo

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

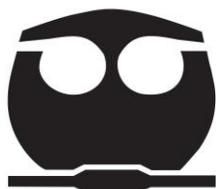
Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA:

Isabel Cristina Barón Mendoza

ASESORA:

Dra. Aliesha Araceli González Arenas



Ciudad Universitaria. Cd. Mx., 2016



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.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 138, Edificio C, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Av.
Universidad No. 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, C.U., Ciudad
de México, 04510.

ASESORA DEL TEMA:

Dra. Aliesha Araceli González Arenas

SUSTENTANTE:

Isabel Cristina Barón Mendoza

Índice

Lista de abreviaturas	iv
Lista de tablas	v
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1 Trastorno del espectro autista (TEA)	5
3.1.1 Definición	5
3.1.2 Epidemiología	6
3.1.3 Diagnóstico	7
3.1.4 Etiología del TEA	10
3.1.4.1 Genética del TEA	10
3.1.4.2 Anormalidades anatómicas y neurobiológicas del TEA	14
I.Regiones cerebrales relacionadas con funciones alteradas en el TEA	15
II. Diferencias en el volumen cerebral	16
III. Anormalidades en diferentes áreas cerebrales	16
IIIa. Hipocampo	17
IIIb. Cuerpo calloso	19
IIIc. Amígdala	19
IIId. Cerebelo	19
IIIe. Corteza	20
IIIe .1 Corteza frontal	20
IIIe. 2 Corteza prefrontal	22
IIIe. 3 Densidad de espinas dendríticas en las capas corticales	23
IIIe. 4 Minicolumnas corticales	25
IIIe. 5 Circuito corteza- ganglios basales	26
3.2 Plasticidad neuronal	27
3.2.1 Definición de plasticidad neuronal	27
3.2.2 Papel de las proteínas del citoesqueleto en la plasticidad neuronal	28

3.2.2.1 Actina	29
3.2.2.2 Tubulina	32
3.2.2.3 Proteínas asociadas a microtúbulos	32
I. Tau.....	33
II. MAP2A.....	35
3.3 Modelos murinos de autismo	36
3.3.1 Cepa C58/J con fenotipo autista	38
3.3.2 Pruebas de comportamiento de la cepa C58/J	39
4. Planteamiento del problema	42
5. Hipótesis	42
6. Objetivos	43
7. Material y métodos	44
7.1 Reactivos	44
7.2 Animales	45
7.3 Disección de corteza prefrontal e hipocampo de ratón	45
7.4 Extracción de proteínas	46
7.5 Western Blot	46
7.6 Análisis de datos	47
8. Resultados	48
8.1 Expresión de proteína Tau	48
8.2 Expresión de proteína MAP2A	51
8.3 Expresión de proteína α - tubulina	51
8.4 Expresión de proteína β - actina	51
9. Discusión	53
10. Conclusiones	57
11. Perspectivas	57
12. Referencias	58
Apéndice	68

Lista de abreviaturas

A	Cepa Autista
ABPs	Proteínas de unión a actina (actin-binding proteins)
AF	Anisotropía fraccional
cdk5	Cinasa dependiente de ciclina 5
CICUAL	Comisión Institucional del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio
CK1	Caseína cinasa 1
CNV	Variación en el número de copias (copy-number variation)
Cx	Corteza prefrontal
DSM	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales
ECL	Quimioluminiscencia enzimática (enzymatic chemiluminiscence)
ERK2	Cinasa regulada por señales extracelulares 2
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GSK-3	Cinasa de la glucógeno sintasa 3
Hc	Hipocampo
IRM	Imágenes por resonancia magnética
ITD	Imágenes por tensor de difusión
JNK	Cinasa de N-terminal c-Jun
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos (microtubule-associated proteins)
NMDA	N-metil- D- aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico
PSD	Densidad postsináptica (postsynaptic density)
RRBs	Comportamientos repetitivos y restringidos (Restricted and repetitive behaviors)
SA	Síndrome de Asperger
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (Single nucleotide polymorphism)
Sx	Síndrome
TA	Trastorno autista
TDI	Trastorno desintegrativo de la Infancia
TEA	Trastorno del Espectro Autista
TGD	Trastorno Generalizado del Desarrollo
WT	Cepa Silvestre (Wildtype)

Lista de tablas

<i>Tabla 1. Características principales del trastorno del espectro autista.</i>	8
<i>Tabla 2. Padecimientos comórbidos presentados frecuentemente en pacientes con TEA.</i>	9
<i>Tabla 3. Mutaciones genéticas más frecuentes en pacientes con TEA.</i>	12
<i>Tabla 4. Mutaciones genéticas en pacientes con TEA asociadas con otros síndromes comórbidos.</i>	14
<i>Tabla 5. Regiones cerebrales asociadas con las características del TEA.</i>	15
<i>Tabla 6. Modelos murinos con características asociadas al TEA.</i>	37
<i>Tabla 7. Genotipo y fenotipo de la cepa C58/J.</i>	38

1. Resumen

Dentro de las patologías más devastadoras de la niñez, se encuentra el trastorno del espectro autista (TEA), el cual engloba un amplio rango de niveles de discapacidad y síntomas que pueden presentarse en personas que lo padecen. El TEA está considerado dentro de los trastornos del desarrollo neuronal prenatal y posnatal.

Se ha reportado que la cepa murina C58/J tiene un alto nivel de estereotipos motores, baja capacidad social, hiperactividad e incluso posibles patrones de comportamiento repetitivo, así que ha sido usada como un modelo animal de autismo. Estas conductas anormales podrían estar relacionadas con cambios en la plasticidad cerebral, y por ende, con modificaciones en la dinámica del citoesqueleto neuronal.

El objetivo de este estudio fue analizar las diferencias en la expresión de las proteínas de citoesqueleto: α -tubulina, β -actina, y de las proteínas asociadas a microtúbulos: Tau y MAP2A en la cepa murina C58/J con fenotipo autista.

Se determinó el contenido de las proteínas en la corteza prefrontal e hipocampo de ratón por medio de la técnica de Western Blot, ya que estas estructuras cerebrales han sido asociadas a la neuropatología del TEA. Se evaluaron tres isoformas de Tau, de 80, 60 y 30 kDa, además de su forma fosforilada (residuo serina 396). El contenido de la isoforma de Tau de 80 kDa, al igual que el de la isoforma de 60 kDa y su forma fosforilada, fue significativamente menor en la corteza prefrontal de los ratones autistas, en comparación con la cepa silvestre (C57 BL/6). No se encontraron cambios significativos en la expresión de la isoforma de Tau y fosfo-Tau de 30 kDa en ninguna de las dos estructuras de la cepa autista. Por otra parte, la expresión de la proteína asociada a microtúbulos MAP2A, fue menor en la cepa autista, tanto en corteza prefrontal como en hipocampo. Mientras que el contenido de las proteínas α -tubulina y β -actina no difirió entre las dos cepas en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas.

Se observaron variaciones en el contenido de las isoformas de Tau (30 y 60 kDa) entre la corteza prefrontal y el hipocampo de la cepa silvestre, sin embargo, estas diferencias no se encontraron en las áreas cerebrales de los ratones autistas.

Estos resultados sugieren un posible desbalance en la dinámica del citoesqueleto, que indicaría alteraciones en la plasticidad neuronal de la corteza prefrontal e hipocampo, cuyo daño podría estar relacionado con la conducta atípica de estos ratones.

2. Introducción

Dentro de las patologías más devastadoras de la niñez, se encuentra el trastorno del espectro autista (TEA), el cual engloba un amplio rango de niveles de discapacidad y síntomas que se pueden presentar en personas que lo padecen (DiCicco-Bloom *et al.*, 2006; Bourgeron, 2015; Wegiel *et al.*, 2010). Actualmente el TEA está considerado dentro de los trastornos del desarrollo neuronal prenatal y posnatal (DSM-5, 2014).

La prevalencia del TEA ha ido aumentando desde el primer estudio epidemiológico realizado en 1966, probablemente en parte, por los cambios hechos en los conceptos y criterios de diagnóstico, e incluso por el incremento de los factores de riesgo (Lai *et al.*, 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha revelado que el TEA se presenta sin distinción en todos los grupos étnicos y raciales, con una prevalencia de 1 caso por cada 160 personas, lo cual podría indicar que el 0.6% de la población global sufre este padecimiento (World Health Organization, 2013). Sin embargo, se ha reportado que los niños son más susceptibles a desarrollar este desorden que las niñas (Lai *et al.*, 2015).

Se ha encontrado una amplia variedad de genes asociados con el autismo, muchos de ellos involucrados con las funciones plásticas del cerebro. La mutación de estos genes podría influenciar la estructura y el volumen de las sinapsis a diferentes niveles, ya que codifican para proteínas involucradas en la remodelación de cromatina, la transcripción génica, la síntesis y degradación de proteínas, en la transmisión sináptica y en la dinámica del citoesqueleto (Bourgeron, 2015).

Por lo anterior, una de las causas del TEA puede involucrar anomalías en el desarrollo cerebral asociadas a alteraciones en los componentes del citoesqueleto y el rearreglo del mismo, afectando así la neuritogénesis, la elongación de axones, la formación de dendritas, y en sí, la conectividad sináptica.

Dentro de los componentes más importantes del citoesqueleto se encuentran las proteínas tubulina, actina, y la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) que incluye a las proteínas Tau y MAP2A (Hansberg-Pastor *et al.*, 2015).

Actualmente, los modelos murinos son de gran utilidad para estudiar la neuropatología del TEA. Se ha reportado que la cepa murina C58/J tiene un alto nivel de estereotipos motores, baja capacidad social, hiperactividad e incluso posibles patrones de comportamiento repetitivo, así que ha sido usada como un modelo animal de autismo (Argyropoulos *et al.*, 2013; The Jackson Laboratory). Las diferencias en el comportamiento de los ratones C58/J, podrían estar relacionados con cambios en la plasticidad neuronal, y estos, con modificaciones en la dinámica del citoesqueleto neuronal.

3. Antecedentes

3.1 Trastorno del espectro autista (TEA)

3.1.1 Definición

Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5, 2014), los trastornos del neurodesarrollo se refieren a un conjunto de afecciones que tienen su inicio de manera precoz en el periodo de desarrollo, produciendo deficiencias en el funcionamiento personal, social, académico u ocupacional del sujeto que lo padece. En este grupo de trastornos se encuentra el Trastorno del Espectro Autista (TEA).

El autismo está dentro de las patologías más devastadoras de la niñez y se refiere a un grupo de desórdenes del neurodesarrollo muy heterogéneo tanto en el aspecto clínico como etiológico, que colectivamente se ha hecho llamar “Trastorno del Espectro Autista” (TEA), el cual engloba un amplio rango de niveles de discapacidad y síntomas que pueden presentarse en personas que lo padecen (DiCicco-Bloom *et al.*, 2006; Bourgeron, 2015; Wegiel *et al.*, 2010).

Fue descrito por primera vez en 1943 en EUA, por Leo Kanner en su escrito “Trastornos Autistas del contacto afectivo” donde estudió a once niños (ocho niños y tres niñas) que “habían venido al mundo con una discapacidad innata para formar el contacto afectivo con la gente, provisto de manera usual y biológica” (Kanner, 1943). En 1944, en Austria, Hans Asperger publicó “La psicopatía autista en la infancia” describiendo a otros cuatro niños con síntomas autistas (Lyons *et al.*, 2007). Sin embargo, no fue hasta el año de 1980 cuando su estudio tomó relevancia fuera del ámbito de la neuropsiquiatría, cuando estudios en gemelos revelaran que el autismo era un desorden con elevados índices de heredabilidad (Miles, 2011).

Actualmente el TEA está considerado dentro de los trastornos del desarrollo neuronal prenatal y posnatal (DSM-5, 2014).

3.1.2 Epidemiología

La prevalencia del TEA ha ido aumentando desde el primer estudio epidemiológico realizado en 1966 por Lotter, V. (4.5 casos por cada 10'000 habitantes), probablemente en parte, por los cambios hechos en los conceptos y criterios de diagnóstico, e incluso por el incremento de los factores de riesgo (Lai *et al.*, 2014).

A continuación se presentan algunos estudios epidemiológicos de autismo, publicados a partir del año 2000, indicando la prevalencia del trastorno sugerida.

Baird *et al.*, 2006: 3.8/1'000; Ouellette-Kuntz *et al.*, 2006: 2.8/1'000; Glasson *et al.*, 2008: 6/1'000; Centers for Disease Control and Prevention, 2008: 11.3/1'000; Idring *et al.*, 2012: 11.5/1'000; Saemundsen *et al.*, 2013: 12/1'000.

En 2013, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció que el TEA se presenta sin distinción en todos los grupos étnicos y raciales, y con una prevalencia de 1 caso por cada 160 personas, lo cual podría indicar que el 0.6% de la población global sufre este padecimiento (World Health Organization, 2013).

Por su parte, el reciente análisis de resultados de diferentes estudios epidemiológicos realizado por Robinson-Agramonte, 2015, sugiere que la prevalencia actual del autismo es de aproximadamente 69 casos por cada 10'000 habitantes, que se traduce en 1 persona por cada 145 habitantes con diagnóstico de TEA, señalando que este estimado representa un promedio, y que existe una substancial variabilidad entre los criterios de cada estudio.

En México, en el 2010, la Clínica Mexicana de Autismo A.C, en León, Guanajuato, realizó un estudio de prevalencia en 5000 niños de 8 años de edad. Con base en este estudio se estimó que 1 de cada 300 niños tenían diagnóstico de TEA en México, con una probabilidad aproximada de 115 mil niños con autismo en el país (Secretaría de Salud, 2015).

Estudios actuales muestran que el autismo afecta de 4 a 5 veces más al sexo masculino, aunque esta diferencia disminuye en individuos con discapacidad intelectual (Lai *et al.*, 2015). También existen reportes contradictorios, mencionando una proporción de prevalencia menor (2-5:1) y sin asociación con la capacidad intelectual (Kim, Y.S. *et al.*, 2011).

Se han propuesto varios factores que podrían predisponer en mayor proporción a los varones al TEA, dentro de los cuales se encuentran: mecanismos genéticos como la sobreexpresión de genes cromosomales por monosomía o polisomía, genes ligados al cromosoma Y, expresión específica de genes ligados al cromosoma X, mosaicismo, inactivación sesgada del cromosoma X, e impronta materna (Schaafsma *et al.*, 2014).

3.1.3 Diagnóstico

Hoy en día el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales sigue siendo el estándar para el diagnóstico de TEA. Su última actualización fue la 5ta edición en 2014 (DSM-5, 2014), donde especifica que el diagnóstico de TEA al presente engloba a: **1)** el trastorno autista (TA) (antes llamado autismo de la primera infancia, autismo infantil, autismo de Kanner, autismo de alto funcionamiento o autismo atípico), **2)** el Síndrome de Asperger (SA), **3)** el trastorno desintegrativo de la infancia (TDI) y **4)** el trastorno generalizado del desarrollo no especificado (TGD-No especificado).

A continuación se presenta la Tabla 1, que incluye las características principales del TEA según el criterio del DSM-5 (2014), así como otros comportamientos atípicos frecuentes.

Tabla 1. Características principales del trastorno del espectro autista. Tomada de Lai et al., 2014.
***Contiene información reproducida de la DMS-5, 2014.**

Características principales del TEA	
Características bajo el criterio de DSM-5	Especificaciones
➤ Déficits persistentes en la comunicación e interacciones sociales a través de múltiples contextos	Déficits en la reciprocidad social-emocional. Déficits en los comportamientos comunicativos no-verbales utilizados para la comunicación social. Déficits en el desarrollo, mantenimiento y entendimiento de las relaciones interpersonales.
➤ Patrones de comportamiento repetitivos o intereses o actividades restringidas (RRBs: Restricted and repetitive behaviors).	Movimientos motores estereotipados, uso repetitivo de objetos y lenguaje. Insistencia en lo mismo. Inflexibilidad o adherencia a rutinas, o patrones ritualizados de comportamiento verbal y no- verbal. Intereses altamente restrictivos o fijaciones. Híper-reactividad o hipo-reactividad a impulsos sensoriales o intereses inusuales en aspectos sensoriales del ambiente.
Características asociadas (no incluidas en el criterio de DSM-5)	Especificaciones
➤ Desarrollo atípico del lenguaje	En edades < 6 años: desviaciones o retrasos en la comprensión. Dos tercios de los pacientes presentan dificultad con la expresión fonológica o gramática. En edades > 6 años: desviaciones pragmáticas, semánticas y morfológicas, con articulación relativamente intacta y sintaxis.
➤ Anormalidades motoras	Retraso motor: hipotonía, catatonía, déficits en la coordinación, en la preparación y planeación de movimientos, en la práctica de éstos, al caminar o en el equilibrio.
➤ Excelente atención al detalle	

Cabe señalar que una vez establecido el diagnóstico de TEA, éste puede darse ligado a una afección médica, genética, o un factor ambiental conocido, es decir, cuando el paciente presenta conjuntamente otros padecimientos asociados, como por ejemplo: síndrome de Rett, síndrome de X frágil, esclerosis tuberosa, epilepsia, algunos antecedentes de exposición ambiental como valproato, síndrome alcohólico fetal, etc. (DSM-5, 2014).

En la Tabla 2 se anexan algunas de las afecciones comórbidas comúnmente presentadas conjuntamente con TEA.

Tabla 2. Padecimientos comórbidos presentados frecuentemente en pacientes con TEA.

**Información tomada de Lai et al., 2014.*

Padecimiento	Proporción de individuos afectados con autismo
Discapacidad intelectual	~45%
Epilepsia	8-30%
Problemas gastrointestinales	9-70%
Desbalance inmune	≥38%
Síndromes genéticos	
Síndrome de X frágil	21-50%
Síndrome de Rett	La mayoría tienen características autistas, pero presentan un perfil diferente al autismo idiopático.
Esclerosis tuberosa	24-60%
Síndrome de Down	5-39%
Fenilcetonuria	5-20%
Síndrome de CHARGE**	15-50%
Síndrome de Angelman	50-81%
Síndrome de Timothy	60-70%
Síndrome de Joubert	~40%
Desórdenes de sueño	50-80%
Ansiedad	42-56%
Conducta agresiva	≤68%
Conducta auto lesiva	≤50%

****CHARGE: coloboma (C), malformaciones cardíacas (H), atresia de coanas (A), retraso psicomotor y/o en el crecimiento (R), hipoplasia de genitales (G), malformaciones auriculares y/o sordera (E).**

3.1.4 Etiología del TEA

La etiología del autismo es muy compleja, primero, por el gran espectro de síntomas que se toman en cuenta para su diagnóstico, lo que implica un amplio rango de mecanismos patológicos involucrados, la mayoría de los cuáles, actualmente, se desconocen.

Se han propuesto y estudiado varias teorías que incluyen como causa: daños en el desarrollo perinatal, algunas condiciones médicas como el síndrome de X frágil, esclerosis tuberosa, fenilcetonuria (entre otras), además de algunos mecanismos inmunológicos (Trottier *et al.*, 1999).

Aunque en el TEA se comparten perfiles perceptuales, cognitivos y conductuales, estos se pueden manifestar a través de diferentes condiciones del neurodesarrollo que surgen también de diversas causas genéticas (Bertone *et al.*, 2010).

Actualmente, se han asociado una gran cantidad de genes con TEA, y varios de ellos parecen tener un papel en la plasticidad sináptica. También se han identificado genes de riesgo para el autismo, involucrados con la regulación de la actividad neuronal, ya sea modulando el número de sinapsis o la fuerza de éstas (Bourgeron, 2015).

3.1.4.1 Genética del TEA

Como ya ha sido mencionado, uno de los factores más importantes en la etiología del TEA, es la carga genética, ya que el trastorno se presenta en hermanos con un promedio de 20-25 veces mayor que en la población en general (Lauritsen *et al.*, 2005).

Hay tres evidencias contundentes de la etiología genética del autismo: los estudios en gemelos, comparando los gemelos monozigóticos (concordancia 82-92%) con los dizigóticos (concordancia >20%); estudios de familia en parientes de primer grado

(recurrencia de 5-20%) comparado con la población en general (recurrencia 1%); y estudios de síndromes genéticos que comparten ciertos aspectos del diagnóstico para autismo (Geschwind, 2011; Huguet *et al.*, 2013).

Sin embargo, los mecanismos genéticos involucrados en el TEA son muy complejos y heterogéneos, siendo esto reflejado en la expresión de diversos síntomas y diferente grado de severidad del desorden (Pisula *et al.*, 2015).

Varios estudios indican que los sujetos con autismo presentan un incremento en la frecuencia de variaciones en el número de copias de regiones particulares en el genoma (CNVs: Copy-number variations), comparado con personas normales, sugiriendo la existencia de una inestabilidad genómica en un gran número de casos. Estas CNVs anormales afectan varios loci involucrados en el desarrollo de sinapsis, orientación de axones y motilidad neuronal, siendo encontrados en aproximadamente 5-8% de los casos de TEA (Persico *et al.*, 2013).

Según Bourgeron (2015), en aproximadamente 17-60% de los pacientes con TEA, se han identificado más de 1000 polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs: Single nucleotide polymorphism), que aunque se pueden considerar como variantes comunes, es claro que tienen contribución en el trastorno.

Las siguientes tablas muestran una recopilación de las alteraciones genéticas más documentadas en el TEA (Tabla 3) y asociadas con otros síndromes comórbidos (Tabla 4).

Tabla 3. Mutaciones genéticas más frecuentes en pacientes con TEA.

Gen	Proteína	Función	CNV/ SNP/Mutación [Ref]
Moléculas de adhesión celular (CAMs)			
NLGN3	Neuroligina 3	Apoyo de la formación de sinapsis tanto inhibitorias como excitatorias; anclaje para proteínas de andamiaje.	R451C [126]
NLGN4	Neuroligina 4		-355G>A, T787M, Exón 4 del [126]
NRXN1	Neurexina 1	Encontrada principalmente en las terminales postsinápticas como molécula de unión a Neuroligina; regulación de receptor NMDA postsináptico.	CNV, S14L, R8P, L13F, c1024 + 1 G>A, T665I, E715K [59,126]
SHANK3	SHANK3	Proteína de andamiaje abundante en la densidad postsináptica donde interactúa con neuroliginas; tiene dominios de interacción para los receptores de glutamato y proteínas regulatorias de actina.	CNV, 142-800 kb del, E409X, R12C, A198G, G1011V [59,126]
CDH8	Cadherina 8	Mantenimiento de interacciones homofílicas para apoyar la adhesión celular en las sinapsis excitatorias e inhibitorias	CNV [123]
PCDH9	Protocadherina 9		CNV [17]
CNTNAP2	Proteína asociada a contactina like-2	Molécula de adhesión celular de la familia de las neurexinas en sistema nervioso.	CNV, rs7794745 [59, 5]
ITGB3	Subunidad β3 de Integrina	Adhesión celular y señalización celular mediada por superficie. Codifica para la glicoproteína IIIa que forma la subunidad beta del receptor membranar adhesivo de plaquetas. Asociado con niveles séricos de serotonina en TEA.	rs5918 [105]
Receptores/Transportadores sinápticos			
GRIK2 (GLUR6)	Subunidad 2 del receptor ionotrópico de glutamato tipo kainato	Transporte de principal neurotransmisor excitatorio: glutamato, involucrado directamente en funciones cognitivas como memoria y aprendizaje.	rs2227281, rs2235076 [48]
GRIN2A	Subunidad 2A del receptor ionotrópico de glutamato tipo NMDA.	Papel en la potenciación de larga duración (LTP: Long term potentiation); incremento en la eficiencia de la transmisión sináptica involucrada en procesos de memoria y aprendizaje. Relacionado con epilepsia focal y trastorno del habla.	rs1014531 [120]
GABRB3	Subunidad β3 del receptor de GABA tipo A	Regulación inhibitoria sináptica por transporte de GABA	rs25409 [44]
OXTR	Receptor de oxitocina	Receptor acoplado a proteína G para oxitocina; activación de vía fosfatidilinositol-calcio como segundo mensajero.	rs2254298 [78]
SLC6A4	Transportador de serotonina	Transporte del neurotransmisor serotonina desde los espacios sinápticos hacia las neuronas presinápticas; reciclaje de serotonina.	rs1042173; rs140700; rs2066713, 5HTTLPR [105, 60]

<i>Involucrados en la remodelación de cromatina y regulación génica</i>			
MECP2	Proteína 2 de unión a metil CpG	Constituyente de la cromatina neuronal, cuyo papel es la represión transcripcional. Asociado a síndrome de Rett e impacto en el nivel de expresión de UBE3A y GABRB3.	IVS2 + 2delTAAG, R133C, R453X, c.1461 G>A [126, 135]
HOXA1	Homeobox A1	Primer gen en ser expresado durante la embriogénesis; necesario para el desarrollo apropiado del tallo cerebral, cerebelo, varios nervios craneales, oído medio e interno, y huesos hioides y occipitales.	c.84 C>G, 175-176insG [126]
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina	Supresor de tumor que favorece el arresto del ciclo celular en G1 y apoptosis, equilibrando la proliferación celular. Inhibidor de vía de señalización PI3K/mTOR. Relacionado con macrocefalia.	H93R, D252G, F241S, 520insT, R130X, E157G, L139X, IVS6-3C>G [126]
EIF4E	Factor de inicio de la traducción eucariota 4E	Papel esencial en la traducción proteica al final de la vía de señalización mTOR. Relacionado con regresión del lenguaje.	46,XY,t(4,5)(q23;q31.3) [126]
EN2	Engrailed homeobox 2	Proteína de homeodominio implicada en la formación del patrón durante el desarrollo del sistema nervioso central.	rs3735653, rs3824068, rs2361688 [157]
MET	Protooncogen MET (Receptor tirosin-cinasa del factor de crecimiento de hepatocitos)	Receptor pleiotrópico con actividad tirosina cinasa; regulación de señalización de HGF (factor de crecimiento de hepatocitos); esencial para desarrollo cerebral y cicatrización de heridas.	rs1858830 [27]
<i>Relacionados con la homeostasis de calcio</i>			
CACNA1C	Canal Cav 1.2. voltaje tipo L cerrado por Ca ²⁺	Participación en homeostasis de calcio durante las sinapsis. Mutaciones incrementan riesgo de epilepsia. (CACNA1C relacionado a síndrome de Timothy)	G406R [126]
CACNA1F	Canal Cav 1.4 voltaje tipo L cerrado por Ca ²⁺		I745T [126]
KCNMA1	Canal activado por calcio y potasio alfa 1 subfamilia M		A138V [126]
SCN2A	Subunidad 2 α del canal de sodio cerrado por voltaje		R1902C [126]
<i>Moléculas involucradas en la migración neuronal</i>			
RELN	Relina	Proteína de matriz extracelular secretada crítica para la migración neuronal en varias regiones cerebrales durante el desarrollo.	rs362691, rs736707 [142]

Tabla 4. Mutaciones genéticas en pacientes con TEA asociadas con otros síndromes comórbidos.
***Información tomada de Persico et al., 2013.**

Genes implicados tanto en TEA como en otros síndromes comórbidos				
Gen y proteína	Función	Síndrome	Incidencia del síndrome en TEA	Incidencia de TEA en el síndrome
FMR1 (FMRP: Proteína de retraso mental de X frágil 1)	Asociada a polisomas; participación en el tráfico de mRNA del núcleo al citoplasma.	Sx de X frágil	2.10%	18–33%
TSC1, TSC2 (tuberina y harmatina)	Posible rol en el transporte vesicular y como supresor de tumor.	Esclerosis tuberosa	1–4% (8–14% Si se presentan convulsiones)	25–60%
NF1 (neurofibromina 1)	Regulador negativo de la vía de señalización de ras	Neurofibromatosis tipo 1	<1.4%	4%
PAH (fenilalanina hidroxilasa)	Esencial en el catabolismo de fenilalanina	Fenilcetonuria	5-20% [95]	5.70%
ADSL (adenilosuccinato liasa)	Esencial en el metabolismo de purinas	Deficiencia de Adenilosuccinato liasa	<1%	80–100%
UBE3A (Ubiquitina proteína ligasa E3A)	Esencial en el sistema de ubiquitinación.	Sx de Angelman	≤1%	50–81%

3.1.4.2 Anormalidades anatómicas y neurobiológicas del TEA

La etiología neuropatológica del autismo sigue sin ser esclarecida, sin embargo, varias investigaciones que han ligado regiones neuroanatómicas específicas con procesos sociales y emocionales tanto en sujetos normales como con pacientes autistas, han permitido el desarrollo de diferentes hipótesis respecto a las bases neurológicas de los impedimentos sociales encontrados en el TEA (Munson *et al.*, 2006), como diferencias en el volumen total del cerebro o sólo en algunas áreas como la amígdala, hipocampo, corteza y cerebelo; un aumento específico de la materia gris o blanca y alteraciones en la estructura minicolumnar de la corteza, por mencionar algunas (Amaral *et al.*, 2008).

I. Regiones cerebrales relacionadas con funciones alteradas en el TEA

Se han observado muchas áreas cerebrales implicadas en el comportamiento social, dentro de las cuales se encuentran regiones del lóbulo frontal, la corteza frontal superior, la corteza parietal y la amígdala. En lo que respecta a la función del lenguaje se ha reportado estar relacionada con áreas a lo largo de varias regiones corticales y subcorticales, además del área de Broca en el giro frontal inferior, algunas regiones de la corteza motora suplementaria, y el área de Wernicke. Por su parte, los estereotipos motores y comportamientos repetitivos (RRBs) han sido relacionados con la corteza orbitofrontal y el núcleo caudado (Amaral *et al.*, 2008).

Enseguida se presenta la Tabla 5 con las características principales del TEA y su asociación con diferentes regiones cerebrales.

Tabla 5. Regiones cerebrales asociadas con las características del TEA. Tomada de Amaral et al., 2008.

Impedimento social	Déficits en la comunicación	Comportamientos repetitivos
Corteza orbitofrontal	Giro frontal inferior (área de Broca)	Corteza orbitofrontal
Corteza cingulada anterior	Surco temporal superior	Corteza cingulada anterior
Giro fusiforme	Área motora suplementaria	Ganglios basales
Surco temporal superior	Ganglios basales	Tálamo
Regiones de neuronas especulares de la amígdala	Sustancia nigra	
Giro frontal inferior	Tálamo	
Corteza parietal posterior	Núcleo pontino	

II. Diferencias en el volumen cerebral

En un contexto general, se han reportado dos clases de anormalidades volumétricas neuroanatómicas en el TEA. La primera implica un cerebro autista de mayor tamaño comparado con el de un niño promedio normal, según estudios reportados por Piven *et al.*, 1995; Davidovitch *et al.*, 1996; Lainhart *et al.*, 1997 y Bailey *et al.*, 1998. La segunda implica alteraciones focales en el volumen, es decir, una reducción en el tamaño sólo de ciertas regiones cerebrales como el hipocampo y amígdala; o por el contrario, un aumento en la densidad celular, como ha sido reportado para el lóbulo temporal medial, de acuerdo con investigaciones de Bauman *et al.*, 1995; Aylward *et al.*, 1999, y Courchesne *et al.*, 1994; Herbert *et al.*, 2003.

El tamaño del cerebro se ha definido usando la circunferencia de la cabeza (el cual en la niñez temprana, es un indicador confiable del volumen cerebral), cálculos volumétricos utilizando imágenes por resonancia magnética (IRM) y estudios post-mortem del peso del cerebro. Diferentes investigaciones de Courchesne *et al.*, (2001, 2004, 2005) han revelado que durante la niñez temprana, el volumen del cerebro en el TEA muestra un aumento anormal, pero esta diferencia disminuye en algún punto, durante la misma niñez o en la adolescencia. A su vez, se ha observado que al momento del nacimiento, la circunferencia de la cabeza de niños con autismo es normal; sin embargo, entre los tres y cuatro años, el tamaño del cerebro excede el promedio normal aproximadamente en un 10%, con base en estudios de IRM in-vivo (DiCicco-Bloom *et al.*, 2006).

III. Anormalidades en diferentes áreas cerebrales

Varios casos de autismo han mostrado un incremento en la densidad celular y un volumen reducido en áreas como el hipocampo, subículo, amígdala, y aunque menos frecuente, en la corteza entorrinal, en los cuerpos mamilares y en el núcleo septal. Este

patrón de acomodamiento de neuronas cercano y compacto, con arborizaciones dendríticas limitadas, es similar al típicamente observado durante las etapas tempranas del desarrollo cerebral, reflejando posiblemente características de un cerebro inmaduro (Palmen *et al.*, 2004).

Se han reportado muchas otras áreas cerebrales alteradas en estos pacientes, siendo a continuación presentadas las más frecuentes.

IIIa. Hipocampo

El hipocampo representa un elemento importante en el procesamiento atípico de ciertos tipos de información visto en individuos con TEA.

Tiene una estructura laminar de tres capas: molecular, piramidal y polimórfica. La capa piramidal a su vez está formada por dos estratos: el piramidal, dividido en los campos CA1, CA2, CA3 y CA4 e hilus, donde se encuentran las células piramidales; y el radiado, donde están las dendritas apicales de las células piramidales (Alcaraz, 2001). Es un área cerebral clave para el aprendizaje y memoria espacial. Se sabe que muchas de las sinapsis dentro del hipocampo son modificadas como resultado de la experiencia y de los tipos de aprendizaje espacial y asociativo (Treves *et al.*, 1994).

El grupo de Raymond y colaboradores (1996), demostró un decremento del tamaño del soma en las neuronas de la región CA4, y una complejidad reducida de las ramificaciones dendríticas de las células piramidales tanto en la región CA4 como en la CA1, en el hipocampo de niños autistas.

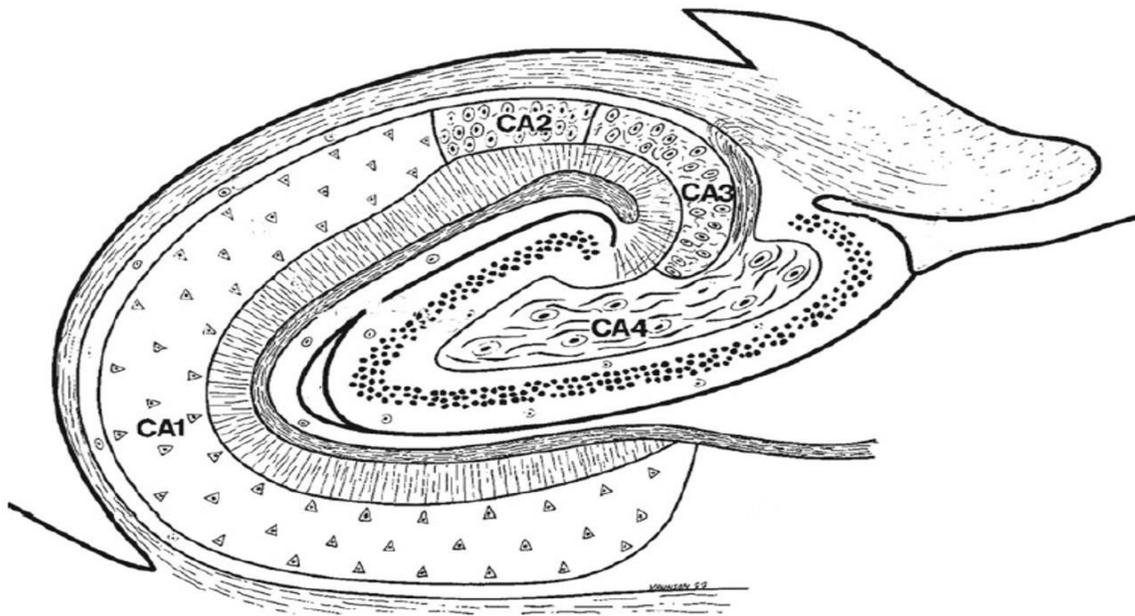


Figura 1. Representación esquemática de las regiones del hipocampo humano. Modificado de Duvernoy et al., 2013.

Además, se ha observado que en niños con TEA, tengan o no retraso mental, se presenta un incremento en el volumen hipocampal derecho, al compararlo con los niños control con desarrollo normal. Los niños con autismo pero sin retraso mental también han registrado este aumento de volumen en el área hipocampal izquierda. Sin embargo, se ha visto que el tamaño del hipocampo no varía al llegar a la adolescencia, sugiriendo un patrón anormal en esta estructura que persiste a lo largo de la niñez y juventud (Schumann et al., 2004).

IIIb. Cuerpo calloso

Por otra parte, algunas investigaciones de Egaas *et al.*, 1995 y Harden *et al.*, 2000, han reportado un contrastante decremento en el volumen del cuerpo calloso de niños autistas comparado con niños control, sin embargo, otros autores no han encontrado estas diferencias, reflejando nuevamente la heterogeneidad del TEA.

Estas alteraciones en el cuerpo calloso son de interés debido a sus implicaciones potenciales en las conexiones interhemisféricas anormales en el autismo (Boger-Megiddo *et al.*, 2006).

IIIc. Amígdala

También se tiene evidencia de que existe una asociación entre el impedimento social, como anormalidades en el procesamiento de emociones faciales y conductas sociales no-verbales, y la estructura amigdalal en el autismo (Nacewicz *et al.*, 2006).

Según el estudio de IRM de Schumann *et al.*, 2004, la amígdala inicialmente parece ser más grande de lo normal en los niños con autismo, pero no sufre el mismo aumento de volumen que está relacionado con la edad preadolescente que se produce en los niños con desarrollo típico (Boger-Megiddo *et al.*, 2006).

IIId. Cerebelo

Se sabe que el cerebelo conecta con muchas estructuras corticales y subcorticales en los hemisferios cerebrales, y que actúa como modulador de funciones cognitivas, de lenguaje, motoras, sensoriales y emocionales asociadas con estas regiones, por lo cual

sus anormalidades se podrían relacionar con varias características clínicas en sujetos con autismo (Fatemi *et al.*, 2012).

Se ha encontrado que en el cerebelo de pacientes con TEA hay una densidad de células de Purkinje reducida, y en contraste, se ha observado un incremento en su tamaño en los pacientes autistas a través de estudios con IRM (Amaral *et al.*, 2008).

IIIe. Corteza

Tiempo atrás se pensaba que la corteza cerebral de los pacientes con autismo, en la mayoría de los casos, era cualitativamente similar a la de los individuos con un desarrollo normal, sin embargo, en la actualidad, el estudio cuantitativo de esta área ha revelado una variedad de alteraciones en su organización, incluyendo un incremento en la densidad de columnas corticales, aumento en el grosor cortical, altas densidades neuronales, neuronas supernumerarias en la capa molecular, pequeñas áreas de desorganización neuronal, pobre diferenciación en el límite entre la materia gris y blanca, y heterotopías neuronales (acúmulos de neuronas normales de localización anómala) (Hutsler *et al.*, 2009).

IIIe. 1 Corteza frontal

La corteza frontal desempeña algunos roles esenciales en funciones de alto grado cognitivo, social y emocional, las cuales son realmente deficientes en el autismo.

Está formada por regiones funcionalmente distintas: corteza motora primaria (representación y ejecución de movimientos esqueléticos elementales), corteza premotora (organización secuencial de los movimientos elementales en función de una

finalidad concreta) y corteza prefrontal (elaboración y ajuste de planes de acción tanto a nivel esquelético como del lenguaje expresivo) (Kolb *et al.*, 2008; Junqué *et al.*, 2009).

Zilbovicius *et al.*, 1995, sugirió una maduración postnatal retrasada del lóbulo frontal en niños con autismo.

También se ha reportado, con estudios de imágenes con tensor de difusión (ITD), que pacientes autistas presentan una anisotropía fraccional AF (medida del grado de anisotropía de la difusión de las moléculas de agua en dado voxel o unidad tridimensional en el tejido cerebral. Los valores de AF van de 0-1, reflejando el nivel de organización y mielinización de fibras conforme el valor de AF aumenta) reducida en la materia blanca adyacente a los córtices prefrontales (Barnea-Goraly *et al.*, 2004), lo que podría sugerir alteraciones en la organización de axones y dendritas.

Por su parte, Courchesne *et al.*, 2001, ha encontrado un aumento en la materia blanca de niños autistas pequeños, lo que aunado a lo anterior, podría indicar anomalías en el desarrollo de neuritas en esta área cerebral.

Se ha observado un aumento en la materia gris del lóbulo frontal en niños autistas de 2 a 3 años (Courchesne *et al.*, 2001), sin embargo, otro estudio indica que este aumento también se presenta en adolescentes y adultos con autismo (Hazlett *et al.*, 2006).

También se tiene reporte por el grupo de Bailey *et al.*, 1998; Kemper *et al.*, 1998 y Belichenko *et al.*, 1997, de alteraciones leves de la organización laminar, engrosamiento de la corteza, incremento en la densidad de diferentes tipos celulares, células más pequeñas, malformaciones menores en la corteza orbitofrontal y marcas de decremento de la densidad de células piramidales (Carper *et al.*, 2005).

IIIe. 2 Corteza prefrontal

La corteza prefrontal es una colección de áreas neocorticales interconectadas que recibe proyecciones de todos los sistemas corticales sensoriales, sistemas motores y otras estructuras subcorticales, como tálamo, amígdala, hipocampo, cerebelo y ganglios basales (Fuster, 1988). Se piensa que tiene un importante papel en el control cognitivo y en la habilidad de organizar pensamientos y acciones de acuerdo a metas internas (Miller *et al.*, 2001).

La corteza prefrontal se divide en tres regiones funcionalmente distintas: corteza prefrontal dorsolateral (organización temporal de la conducta), corteza prefrontal medial o paralímbica (atención y motivación dirigida a la acción) y corteza prefrontal orbital (inhibición de la interferencia de estímulos sensoriales y tendencias internas que aparecen en el contexto de estructuración de la conducta) (Kolb *et al.*, 2008; Junqué *et al.*, 2009).

Se ha documentado un excesivo número de neuronas en la corteza prefrontal de pacientes autistas con un volumen cerebral mayor en comparación con sujetos control (Courchesne *et al.*, 2011).

También se ha encontrado un aumento de volumen específico de la corteza prefrontal dorsolateral y medial en niños autistas por debajo de los 5 años (Carper *et al.*, 2005).

Además, Castelli *et al.*, 2002; Happe *et al.*, 1996 y Pierce *et al.*, 2004 mediante numerosos estudios de neuroimágenes, han demostrado una actividad reducida en la corteza prefrontal de pacientes autistas durante pruebas sociales realizadas, sobre todo en adolescentes autistas de acuerdo con Silk *et al.*, 2006.

También se tiene reporte de que el gen SLC25A12, que codifica para una proteína mitocondrial acarreadora de unión a calcio involucrada en el intercambio de aspartato por glutamato a través de la membrana mitocondrial interna, está sobreexpresado en la corteza prefrontal de sujetos autistas (Lepagnol-Bestel *et al.*, 2008).

IIIe. 3 Densidad de espinas dendríticas en las capas corticales

La corteza también puede dividirse en capas que pueden distinguirse por el tipo, densidad, y disposición de las células. La capa I molecular o la más superficial, es una red densa de fibras nerviosas orientadas tangencialmente, junto con algunas células horizontales de Ramón y Cajal. La capa II o granular externa, está compuesta por células piramidales y células estrelladas. La capa III piramidal externa, como bien su nombre indica, está formada de células piramidales, seguida de la capa IV o granular interna compuesta por células estrelladas muy compactas. La capa V ganglionar, o bien, la piramidal interna contiene células piramidales grandes y de tamaño intermedio, células estrelladas y células de Martinotti. Mientras que la última capa multiforme o VI, consiste en células fusiformes (pueden ser piramidales modificadas de cuerpo triangular u ovoide) (Snell, RS., 2007).

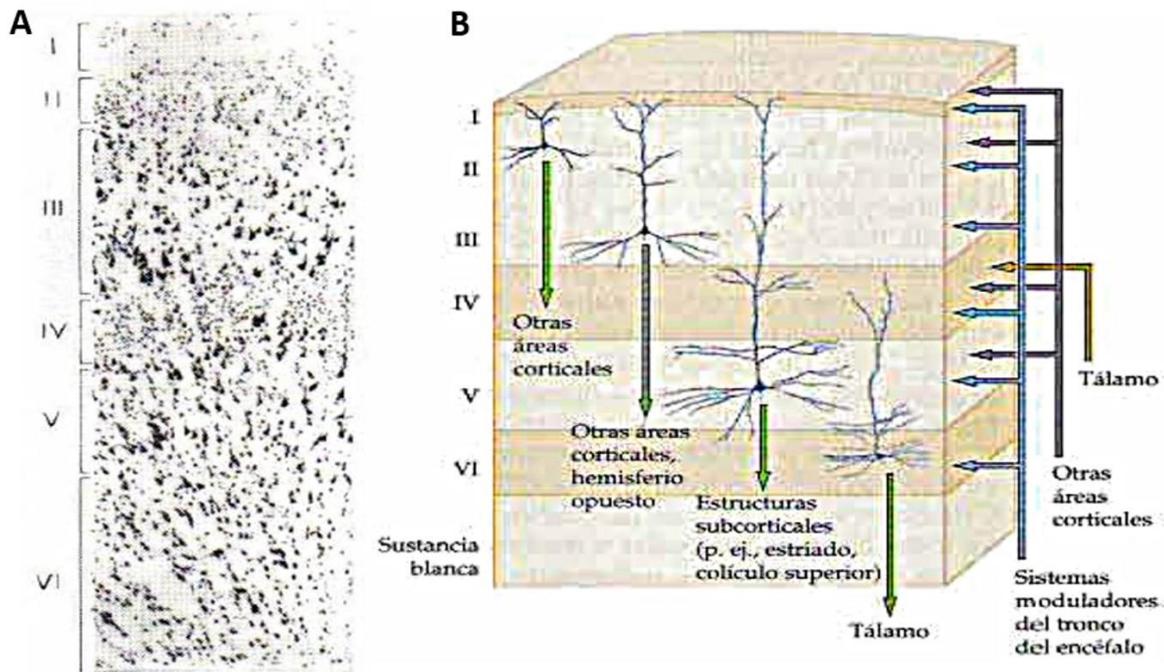


Figura 2. Citoarquitectura de la corteza cerebral. A) Neocorteza con tinción de Nissl. B) Representación esquemática de las capas corticales y sus principales eferencias y aferencias. Modificado de Carpenter M., 1994 y Purves et al., 2007.

Según un estudio de Hutsler *et al.* (2009), hay alteraciones en la densidad espinal en las diferentes capas corticales en individuos con TEA, reportando una mayor densidad de espinas en pacientes autistas comparados con individuos control, siendo más elevada en la capa cortical II, tanto en la región parietal como en la temporal y frontal. Las espinas que cubren las arborizaciones dendríticas de las células piramidales tienen un papel de suma importancia como apoyo de las conexiones excitatorias.

La alta densidad espinal encontrada en la capa II, podría estar asociada con el proceso de maduración prolongado de las capas corticales superficiales que ocurre durante el periodo postnatal, ya que las espinas dendríticas primero sólo aparecen en las capas corticales profundas en el periodo prenatal (Koenderink, *et al.*, 1995). Las células piramidales de la capa II están predominantemente involucradas en la interconectividad entre regiones corticales dentro de un hemisferio (Hutsler *et al.*, 2009).

En personas con un desarrollo normal, entre los 12 y 36 meses de edad, la densidad espinal alcanza un máximo, que es seguido de un declive en el número de éstas, lo cual está asociado a una “poda” de conexiones no usadas y el establecimiento de nuevas redes corticales maduras, probablemente influenciado por la experiencia y guiado por el aporte ambiental (Dawson *et al.*, 2000). Así, se ha sugerido que en sujetos autistas este proceso de eliminación de sinapsis puede estar dañado, lo cual podría ser atribuible a su incapacidad para procesar la información ambiental (Frith, 2004).

IIIe. 4 Minicolumnas corticales

Por otra parte, se han detectado irregularidades en el rearrreglo minicolumnar en pacientes con TEA.

Las minicolumnas son los elementos base tanto arquitectónicos como fisiológicos de la neocorteza (definida como la corteza que tiene seis capas celulares o láminas) (Purves *et al.*, 2007). El núcleo minicolumnar comprime los arreglos de las proyecciones de neuronas piramidales, además de que distintas interneuronas GABAérgicas se acomodan tanto en el núcleo como en la periferia de la minicolumna para modular la señalización de las neuronas piramidales para el procesamiento de información (Casanova *et al.*, 2006).

La formación de minicolumnas ha sido asociada con etapas tempranas del desarrollo cortical cuando las neuronas postmitóticas ascienden en rearrreglos lineares a lo largo del andamiaje radial glial. En el primer año de vida, hay un dramático aumento en el crecimiento de dendritas, pero al llegar a los dos años de edad, las minicolumnas se espacian aún más con una menor densidad celular, mientras que los haces de axones y dendritas se acomodan entre ese espacio entre minicolumnas, extendiéndose a lo largo de las diferentes capas corticales (Amaral *et al.*, 2008).

Se ha propuesto que este arreglo minicolumnar podría ser aberrante en el TEA, al analizar datos preliminares que indican una estructura columnar anormal en la capa III con menos espacio entre las minicolumnas, por ende, un incremento en el número de ellas, y consecuentemente una mayor densidad celular (Casanova *et al.*, 2006). Las neuronas piramidales de la capa III están involucradas con la interconectividad de áreas corticales en el hemisferio opuesto (Purves *et al.*, 2007).

IIIe. 5 Circuito corteza- ganglios basales

Los ganglios basales son un grupo de estructuras subcorticales asociadas con una función motora. Incluyen al núcleo caudado y putamen (cuerpo estriado), globus pallidus, núcleo subtalámico y la sustancia nigra.

Estos circuitos consisten en múltiples vías de retroalimentación, que involucran impulsos desde el cuerpo estriado que van a áreas motoras primarias y áreas corticales premotoras y prefrontales (Langen *et al.*, 2011). Al recibir proyecciones masivas provenientes de la corteza prefrontal, sugieren un papel en la planeación y la cognición. Incluso se sabe que en especial el cuerpo estriado tiene conexiones con la corteza entera que se asocian con la integración de varios tipos de información para planear o seleccionar una acción (Berns *et al.*, 1998).

Se tiene evidencia de alteraciones en este circuito que involucran la conectividad entre el núcleo caudado y las áreas corticales reportado por Turner *et al.*, 2006, y una conectividad fronto-estriatal atípica descrita por Horwitz *et al.*, 1988, en personas con autismo comparadas con sujetos control. Estos problemas podrían ser consistes con el desarrollo y expresión de los comportamientos repetitivos y restringidos (RRBs) (Lewis *et al.*, 2009). Según Kanner (1943), los comportamientos repetitivos y restringidos (RRBs) conforman a una clase de comportamientos caracterizados por su alta frecuencia, repetición en una manera invariante, y deseo por la monotonía ambiental. La restricción es aparente en la inflexibilidad y perseverancia en intereses y actividades. La repetición se puede manifestar en los estereotipos motores, lenguaje repetitivo, rutinas y rituales (Leekam *et al.*, 2011).

3.2 Plasticidad neuronal

3.2.1 Definición de plasticidad neuronal

La aplicación de un estímulo en el cerebro puede conducir a cambios de acuerdo a dos tipos de propiedades neuronales. El primer tipo de cambios surge a partir de la propiedad de las células nerviosas de reaccionar ante un estímulo o impulso entrante, llamada excitabilidad. El segundo tipo de cambios se refiere a ciertas transformaciones funcionales permanentes que surgen en sistemas neuronales particulares, como resultado de estímulos apropiados, lo que se conoce como plasticidad (Kandel *et al.*, 2000).

Los cambios plásticos dependen de la regulación de la expresión de genes, de modificaciones en la estructura sináptica, de su función, y pueden incluir expansión dendrítica, axonal, y la creación de nuevas sinapsis. La plasticidad es dependiente de la actividad cerebral, y predominante tanto en los sistemas sensoriales como en los motores, además de ser requerida en procesos de memoria y aprendizaje (Squire *et al.*, 2008).

Hay evidencia de plasticidad en las sinapsis químicas. Las sinapsis químicas frecuentemente tienen una notable capacidad para dar lugar a cambios fisiológicos a corto plazo (duración de horas) que incrementan o disminuyen la eficacia de la sinapsis. Los cambios a largo plazo (duración de días) pueden dar origen a más cambios fisiológicos que conduzcan a cambios anatómicos, incluyendo la “poda” de conexiones existentes, e incluso el crecimiento de nuevas conexiones entre neuronas (Kandel *et al.*, 2000).

3.2.2 Papel de las proteínas del citoesqueleto en la plasticidad neuronal

El citoesqueleto de las células neuronales es una estructura agregada formada por tres clases de proteínas estructurales citoplasmáticas: microtúbulos de tubulina, microfilamentos de actina y filamentos intermedios. Los tres componentes interactúan entre ellos y con otras estructuras celulares, por lo tanto son dinámicos, y son la base de la morfología celular y la plasticidad del tejido nervioso. Por ende, neurofilamentos junto con otras proteínas como tubulina, proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), kinesinas, actina y proteínas de unión a actina (ABPs), conforman los componentes claves del citoesqueleto axonal y dendrítico (Billingsley *et al.*, 1997).

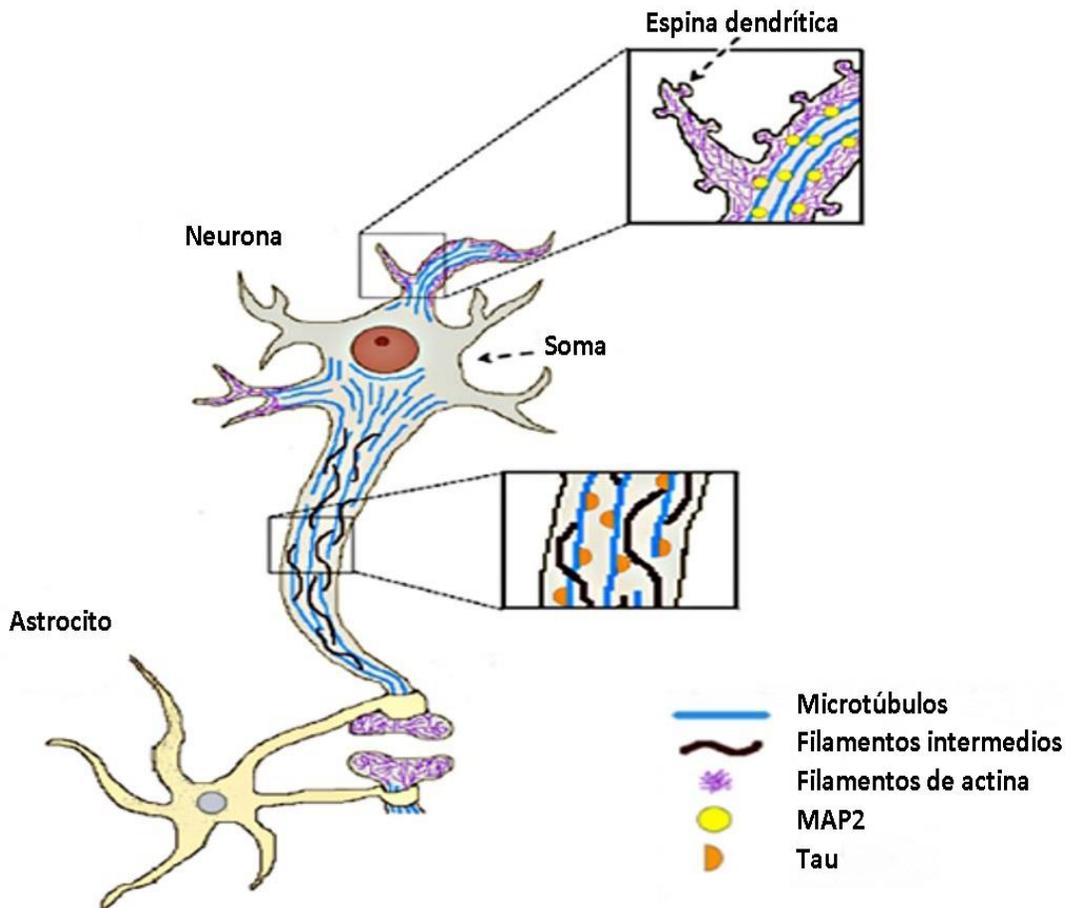


Figura 3. Localización de las proteínas de citoesqueleto en la neurona. Modificado de Hansberg-Pastor *et al.*, 2015.

En varios casos el citoesqueleto está bioquímicamente especializado de acuerdo a un tipo celular, función o etapa de desarrollo en particular. Además cada tipo de elemento del citoesqueleto tiene papeles únicos y esenciales para la funcionalidad del sistema nervioso (Squire *et al.*, 2008).

Las espinas dendríticas son protuberancias de membrana y son los sitios donde se lleva a cabo la mayor parte de las sinapsis glutamatérgicas. Se sabe que los cambios en las espinas dendríticas están basados en el rearrreglo del citoesqueleto. Es por esto que las espinas contienen una densidad postsináptica (PSD), una compleja matriz de receptores postsinápticos, moléculas de señalización y proteínas del citoesqueleto involucradas en la señalización postsináptica y plasticidad (Kennedy *et al.*, 2005; Sheng *et al.*, 2007). Se ha reportado que existe una fuerte relación entre el tamaño de las espinas y la fuerza de la sinapsis (Hering *et al.*, 2001; Kaufmann *et al.*, 2000; y Newey *et al.*, 2005) que sugiere un importante mecanismo de remodelación espinal involucrado con varios síndromes mentales, los cuales se asocian con una morfología espinal alterada (Jaworski *et al.*, 2009).

3.2.2.1 Actina

Actina es una proteína globular de 42 kDa. Es uno de los componentes principales del citoesqueleto y la proteína más abundante en la mayoría de los tipos celulares. Puede existir en forma monomérica (G-actina), o en diferentes subunidades que se ensamblan para formar actina filamentosa (F-actina). La transición de un estado a otro le confiere flexibilidad y le permite participar en una gran cantidad de procesos celulares, en colaboración con las proteínas de unión a actina (ABPs) (Matas-Guadix, 2005).

El ensamblaje y la organización de los filamentos de actina es crucial, ya que estos procesos promueven la división celular, la locomoción y aseguran la integridad celular.

El citoesqueleto de actina juega un importante papel en la morfología de las células neuronales (Kessels *et al.*, 2011), además, también participa en la organización de proteínas presentes en la densidad post-sináptica, así como en el anclaje de diferentes tipos de receptores post-sinápticos necesarios para la recepción del mensaje y la transmisión de la información sináptica (Fregozo *et al.*, 2012).

Se han identificado cuatro genes humanos de α -actina expresados específicamente en diferentes tipos celulares musculares (esqueléticos, cardíacos, músculo liso vascular, y entérico). Mientras que se han reportado dos genes de actina no musculares, β -actina y γ -actina, que están expresados abundantemente en tejido nervioso. Se han visto diferencias en la distribución de los isotipos en neuronas individuales, siendo β -actina predominante en los conos de crecimiento, que están encargados de la extensión de la neurona (Squire *et al.*, 2008).

El control coordinado de actina, microtúbulos y proteínas asociadas, es importante para la formación del cono de crecimiento y su direccionalidad.

En la periferia de la punta direccional del cono de crecimiento están localizadas dos estructuras dinámicas, los lamelipodios y filopodios. Los lamelipodios son protuberancias grandes, presentadas frecuentemente junto con extensiones de filopodios, que son estructuras delgadas y tubulares; ambos tienen un importante papel en la motilidad celular (Korey *et al.*, 2000). Tanto los filopodios como lamelipodios están formados principalmente de gruesos haces de fibras de actina, mientras que en la región central del cono de crecimiento hay microtúbulos confinados (Dehmelt *et al.*, 2004; Bakos *et al.*, 2014).

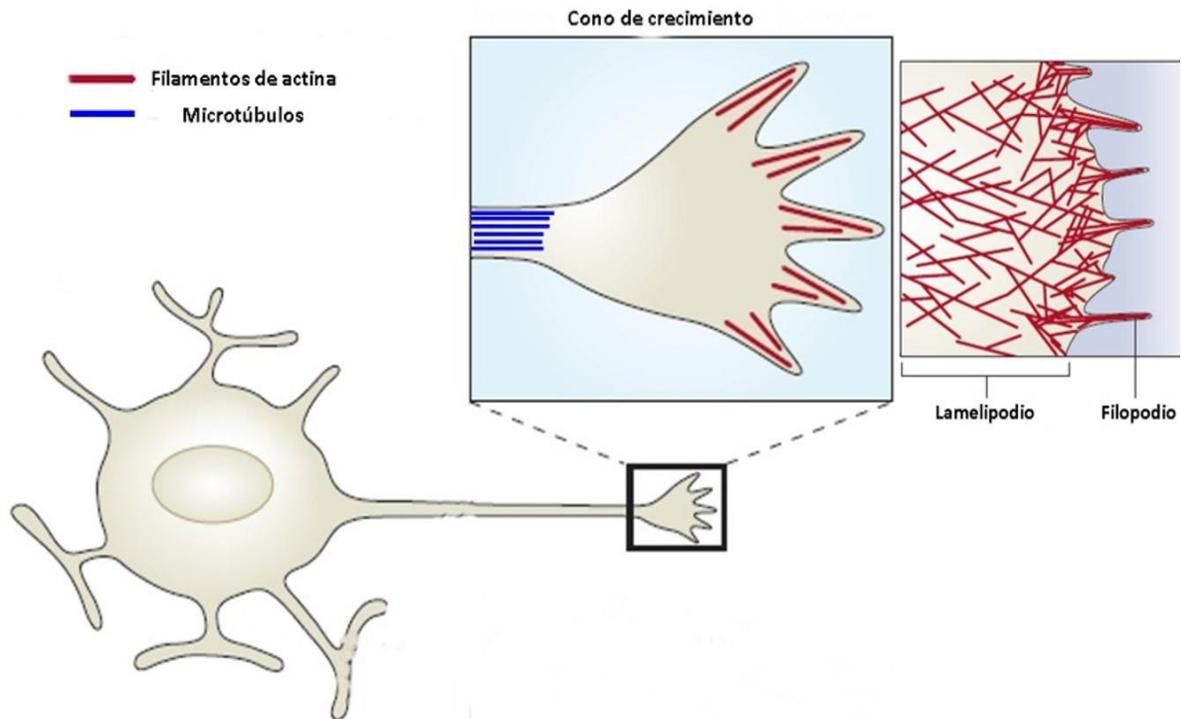


Figura 4. Representación del cono de crecimiento axonal y las formaciones de lamelipodios y filopodios neuronales. Modificado de Mattila, P. et al., 2008.

Además, se ha estudiado que el reordenamiento de actina tiene efectos sobre la formación y/o la pérdida de espinas dendríticas, así como en cambios morfológicos (forma y número de espinas) que son controlados por el grado de polimerización de actina, y por lo tanto, de la relación G-actina/F-actina (Fregozo *et al.*, 2012).

Actualmente se sabe que los miembros de la familia de GTPasas Rho, son los reguladores clave del citoesqueleto de actina (Hall, 1998).

3.2.2.2 Tubulina

Los microtúbulos constituyen uno de los componentes mayores del citoesqueleto neuronal, y están involucrados en procesos esenciales como la división celular, motilidad y transporte intracelular (Hyams *et al.*, 1993; McKean *et al.*, 2001).

Los microtúbulos aparentan ser una especie de tubos huecos de 25nm de diámetro y pueden tener cientos de micrómetros de longitud en los axones. Las paredes de los microtúbulos generalmente comprenden 13 protofilamentos formados por un rearrreglo lineal de subunidades globulares, que son heterodímeros de α y β tubulina, con una variedad de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) unidas a las superficies de los microtúbulos (Squire *et al.*, 2008).

Son tres los isotipos de tubulina de mayor relevancia en eucariontes: α , β y γ tubulina. α -tubulina y β -tubulina (52 y 50 kDa respectivamente) forman complejos de heterodímeros, que están asociados de extremo a extremo, en protofilamentos y luego lateralmente para dar lugar a la pared cilíndrica del microtúbulo.

γ -tubulina (51 kDa) se encuentra tanto en el citosol, como en los centros de organización de los microtúbulos, donde se encuentra como estructuras en forma de anillo cuando nuclea a los microtúbulos (Macrae, 1997).

3.2.2.3 Proteínas asociadas a microtúbulos

Se sugiere que la modulación de la transición del cono de crecimiento a la neurita está mediado por la presencia de gruesos haces de microtúbulos aparentemente estables en las neuritas en avance, y por tubulina sin polimerizar junto con algunos pequeños microtúbulos inestables en los conos de crecimiento (Bamburg *et al.*, 1996, Tanaka *et al.*, 1981). La regulación de esta dinámica de los microtúbulos y de su estabilidad

importante en la morfogénesis neuronal, está relacionada con las llamadas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) que están altamente expresadas tanto en axones como en dendritas (Matus, 1988; Goedert *et al.*, 1991).

Dentro de los prominentes miembros de estas MAPs neuronales están dos proteínas: MAP2 y Tau, que comparten dominios homólogos de unión a tubulina y que están concentradas en el compartimiento dendrítico o axonal de neuronas polarizadas, respectivamente (Bernhard *et al.*, 1984; Binder *et al.*, 1985; Craig *et al.*, 1994; Kaech *et al.*, 1996).

I. Tau

Tau pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y deriva de un sólo gen ubicado en el cromosoma 17 (Buée *et al.*, 2000). Es encontrada predominantemente en neuronas del sistema nervioso central. Tau promueve el ensamblaje de microtúbulos, e interactúa con ellos específicamente por sus dominios de unión a éstos (Billingsley *et al.*, 1997). Se une a los microtúbulos durante ciclos de ensamblaje-desensamblaje con una estequiometría constante y promueve su estabilización (Squire *et al.*, 2008).

Tau existe en un número de isoformas de diferente peso molecular expresadas diferencialmente tanto en regiones del sistema nervioso como en etapas del desarrollo, probablemente señalando un papel fisiológico específico (Buée, *et al.*, 2000). Se tiene reporte de que el cerebro humano adulto expresa seis isoformas de Tau (Billingsley, *et al.*, 1997). Estas isoformas son generadas por splicing alternativo y se han reportado entre 45-100 kDa de peso molecular (Squire *et al.*, 2008).

Las isoformas de Tau también se pueden unir a otros elementos o proteínas de citoesqueleto. Se unen a filamentos de actina, y a través de estas interacciones, las

isoformas de Tau podrían permitir a los microtúbulos interconectarse con otros componentes del citoesqueleto como neurofilamentos. También hay evidencia de que la proteína Tau interactúa con organelos como la mitocondria (Buée *et al.*, 2000).

Dentro de las modificaciones postraduccionales de las isoformas de Tau, y que las hace aún más heterogéneas, se encuentra la fosforilación. La actividad de Tau es regulada por ciclos de fosforilación/desfosforilación. Su fosforilación en sitios específicos la separa de los microtúbulos y permite su despolimerización, mientras que la desfosforilación de Tau promueve la unión y estabilización de estos (González-Arenas *et al.*, 2012).

Actualmente se han descrito treinta y tres sitios de fosforilación de serina (Ser) o treonina (Thr) en la isoforma de Tau cerebral más larga (441 aminoácidos): Thr39, Ser46Pro, Thr50Pro, Thr69Pro, Thr153Pro, Thr175Pro, Thr181Pro, Ser198, Ser199Pro, Ser202Pro, Thr205Pro, Ser208, Ser210, Thr212Pro, Ser214, Thr217Pro, Thr231Pro, Ser235Pro, Ser237, Ser241, Ser285, Ser305, Ser324, Ser352, Ser396Pro, Ser400, Thr403, Ser404Pro, Ser409, Ser412, Ser413, Ser416 y Ser422Pro (Buée *et al.*, 2000).

La mayoría de estos sitios están localizados fuera de los dominios de unión a microtúbulos, y los diferentes estados de fosforilación de Tau resultan de la actividad de cinasas y fosfatasas específicas hacia estos sitios. Se tiene reporte de que Tau puede ser fosforilada por diferentes cinasas, dentro de las que se encuentran la cinasa de la glucógeno sintasa 3 (GSK-3), la cinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5), la caseína cinasa 1 (CK1), la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), la cinasa regulada por señales extracelulares 2 (ERK2), la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y la cinasa de N-terminal c-Jun (JNK) (Hanger *et al.*, 2009).

Algunas formas hiperfosforiladas de Tau, como Ser198, Ser199Pro, Ser202Pro, han sido asociadas con otros desórdenes neurodegenerativos como Alzheimer (Hanger *et al.*, 2009).

II. MAP2A

La proteína MAP2 está expresada en el cuerpo celular y en las dendritas, y es uno de los miembros predominantes de la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) en el sistema nervioso de los mamíferos.

Las múltiples isoformas de MAP2 son traducidas de un splicing alternativo de un sólo gen consistente en 20 exones. Las isoformas han sido divididas en dos subgrupos, las de alto peso molecular: MAP2a y MAP2b (270 y 280 kDa), y las de bajo peso molecular MAP2c y MAP2d (ambas de 68 kDa) (Kalcheva *et al.*, 1998). Las de alto peso molecular son predominantes en el cerebro adulto, y están selectivamente localizadas en dendritas y en el cuerpo celular neuronal. Mientras que las de bajo peso molecular tienen una amplia distribución en el cerebro, tanto en los cuerpos neuronales, como en las dendritas y axones, además de en células gliales (Sánchez *et al.*, 1995).

Chung *et al.*, 1996 y Shafit-Zagardo *et al.*, 1997 han demostrado mediante el análisis regional del cerebro adulto de rata, que MAP2a está expresada en el cerebelo, corteza frontal, hipocampo, cuerpo estriado, mesencéfalo y en el tallo cerebral, donde sólo algunas poblaciones de neuronas expresan la proteína aunque esté distribuida en todo el cerebro. Además, MAP2a aparenta ser preferencialmente expresada en neuronas más grandes, como las piramidales de las capas III y V de la corteza, células de Purkinje, neuronas de Golgi en la capa interna de células granulares del cerebelo, subículo, giro parahipocampal, corteza insular, hipotálamo lateral, ganglios basales y el núcleo basal de Meynert (Kalcheva *et al.*, 1998).

También se ha reportado un incremento en la fosforilación de las MAP2 de alto peso molecular observado durante la dendritogénesis en cultivos de neuronas hipocampales, así se ha especulado que este tipo de proteínas MAP2 podrían ser un sustrato para proteínas cinasas activadas en respuesta a factores dendritogénicos, sin embargo se sabe muy poco de la fosforilación de las MAP2 de alto peso molecular *in vivo*. (Díaz-Nido *et al.*, 1996). Incluso Sánchez *et al.* 1995 ha establecido una posible

correlación entre el estado fosforilación de MAP2 y las múltiples formas de plasticidad neuronal, indicando un probable papel fisiológico de la fosforilación/desfosforilación de MAP2 en el desencadenamiento de cambios en el citoesqueleto en respuesta a ciertas señales extracelulares.

3.3 Modelos murinos de autismo

Una de las estrategias usadas actualmente para sustentar los estudios de TEA, es la utilización de modelos animales.

Es claro que para que estos tengan validez deben de contar con una fuerte relación entre sus endofenotipos y el trastorno humano, es decir, la misma disfunción biológica que cause la enfermedad en el humano, ya sea una mutación genética o anomalía anatómica, además de una respuesta análoga a los tratamientos que prevengan o reviertan los síntomas en el padecimiento humano (Silverman *et al.*, 2010).

Se han desarrollado diferentes modelos murinos que reflejan alteraciones asociadas con el TEA. Entre estos se encuentran los modelos que **1)** están asociados genéticamente con el autismo; que se basan en manipulaciones de loci que controlan desórdenes de un sólo gen caracterizadas por síntomas autistas, o que involucran mutaciones en vías probablemente afectadas en el trastorno (Moy *et al.*, 2006), por ejemplo, cepas con una mutación en SHANK3; **2)** modelos que representan síndromes comórbidos, como el de X frágil, o el de Rett; y **3)** modelos que presentan una fuerte validez en cuanto a conducta y síntomas relacionados a TEA, pero que no tienen una asociación genética directa, como los ratones BTBR y C58/J (Ellegood *et al.*, 2015).

La Tabla 6 muestra algunos de los modelos murinos con características asociadas al autismo.

Tabla 6. Modelos murinos con características asociadas al TEA. Tomada de Silverman et al., 2010.

Modelo murino	Características genéticas	Fenotipos conductuales asociados con TEA
Nlgn4	Mutación nula para gen ortólogo de humano NLGN4	Interacciones sociales recíprocas reducidas, falta de preferencia hacia la novedad, bajas vocalizaciones ultrasónicas
Neurexina 1 alfa	Mutación nula para neurexina 1 alfa murina	Sin daño en habilidades sociales, capacidad de construcción de cuevas dañada, acicalamiento repetitivo
Pten	Mutación condicionada para gen ortólogo de humano PTEN en neuronas de corteza e hipocampo	Interacciones sociales recíprocas reducidas, daño en capacidad de construcción de cuevas
Slc6a4	Mutación nula para gen ortólogo humano SLC6A4 (transportador de serotonina)	Baja sociabilidad, falta de preferencia hacia la novedad
Mecp2	Mutación heterocigota en la proteína 2 de unión a metil-CpG	Interés social reducido
Fmr1	Mutación nula para FMR1 en cepas: C57BL/6J; híbrido de FVB/NJ x C57BL/6J	Baja sociabilidad dependiendo de la cepa.
SHANK3B	Mutación en el gen SHANK en el fragmento que codifica para el dominio PDZ	Baja sociabilidad, acicalamientos repetitivos. [125]
BTBR	Cepa endogámica (genéticamente homogénea)	Baja sociabilidad, acicalamientos repetitivos, baja transmisión social de preferencia de comida, vocalizaciones ultrasónicas inusuales.
BALB	Cepa endogámica (genéticamente homogénea)	Baja sociabilidad, sin daño a la preferencia hacia la novedad, vocalizaciones ultrasónicas reducidas
C58/J	Cepa endogámica (genéticamente homogénea)	Baja sociabilidad (sobre todo en machos), alto nivel de estereotipos motores emergentes en el desarrollo temprano, acicalamientos repetitivos

3.3.1 Cepa C58/J con fenotipo autista

Los ratones pueden presentar características físicas y conductuales paralelas a los humanos. De hecho, se ha demostrado que algunos rasgos, como un interés disminuido en la interacción social, déficits en la comunicación, y comportamientos repetitivos, pueden ser estudiados en estos modelos murinos (Ey *et al.*, 2011).

Como claramente se muestra en la tabla anterior, hay una gran heterogeneidad tanto en los síntomas presentados, como en el genotipo de las cepas murinas modificadas. Y es por esta razón que ha resultado de gran interés el estudio de modelos animales con endofenotipos presentados “naturalmente” relacionados con los criterios del TEA (Argyropoulos *et al.*, 2013) dentro de los cuales tenemos a las cepas murinas C58/J, BALB, FVB y BTBR.

Se sabe que los machos de la cepa C58/J presentan disminuida preferencia social, bajo desempeño en el laberinto de T (relacionado con memoria y aprendizaje), alto grado de estereotipos motores, e hiperactividad, de acuerdo a lo reportado por Argyropoulos *et al.*, 2013, y por The Jackson Laboratory (Tabla 7), rasgos que pueden ser altamente asociados con las características principales del TEA.

Tabla 7. Genotipo y fenotipo de la cepa C58/J. *Información tomada de The Jackson Laboratory.

Mutación	Fenotipo
Ahr ^{b-1}	Receptor de aril-hidrocarburos
Cdh23 ^{ahl}	Cadherina 23 u otocadherina
Il3ra ^{m1}	Receptor de interleucina 3, cadena alfa
Micr1 ⁿ	Aumento inducido por microondas en el receptor de complemento de células B
Rmcf ^s	Resistencia a virus MCF

3.3.2 Pruebas de comportamiento de la cepa C58/J

Para confirmar las alteraciones en el comportamiento social de la cepa C58/J, así como sus anormales respuestas repetitivas, se han documentado varias pruebas conductuales, comparando a la cepa con otros modelos murinos autistas, y con su cepa de origen C57 BL/6.

Se ha reportado que en algunas pruebas conductuales como el test de campo abierto, la prueba en el tablero con agujeros (evaluación de ansiedad, actividad locomotriz, capacidad exploratoria), y en la caja de observación conductual (evaluación de conducta detallada en periodos de observación largos), tanto los machos como hembras de la cepa C58/J muestran distintivos estereotipos motores como constantes saltos, brincos hacia atrás, y acicalaciones, al comparar a estos ratones con otra cepa endogámica autista como la FVB, y con la cepa control de origen C57 BL/6, la cual, cabe señalar, es carente de estos estereotipos (Blick *et al.*, 2015; Ryan *et al.*, 2010; Muehlmann *et al.*, 2012; Moy *et al.*, 2008).

Además, se ha visto que la cepa C58/J tiene una evidente sensibilidad a los efectos de las anfetaminas reflejada en la actividad motora y en el número de levantamientos, lo que puede sugerir la existencia de alteraciones intrínsecas en las vías dopaminérgicas, involucradas en el circuito de la corteza-ganglios basales. Como se había mencionado anteriormente, las anomalías en este circuito están relacionadas con la presencia de estereotipos motores (Moy *et al.*; 2014).

También se ha observado un alto grado de actividad motora en la prueba de campo abierto, donde la ansiedad puede deprimir los comportamientos exploratorios, sin embargo, se piensa que la hiperactividad mostrada por la cepa C58/J podría estar asociada con déficit en la exploración, falta de curiosidad por el estímulo ambiental, y otras formas de comportamiento restrictivo características del autismo, más que con una conducta ansiosa (Ryan *et al.*, 2010). Incluso estas marcadas alteraciones de la

locomoción exhibidas por los ratones C58/J fueron similares en severidad al fenotipo de los ratones Grin neo/neo, que es un modelo de comportamiento repetitivo asociado a una profunda deficiencia del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) (Moy *et al.*, 2014).

Los machos de la cepa C58/J además han presentado un menor olfateo de objetos sociales y no sociales en la prueba de elección de tres cámaras, y una actividad anormal en la caja de comportamiento social (evaluación de preferencia social en general, dominancia, memoria social). Aunque esto podría deberse a la prevalencia de estereotipos motores que limita otras actividades, también puede ser asociado con dificultades en la capacidad recíproca social (Ryan *et al.*, 2010).

Se tiene reporte de que los ratones C58/J presentan un bajo desempeño en el laberinto de T, prueba con la cual se puede reflejar el grado de memoria y aprendizaje de la cepa (Moy, *et al.*, 2008).

Por otra parte, se sabe que la cepa C58/J exhibe un número bajo de excavaciones en la prueba del tablero de enterramiento (evaluación de respuesta a la novedad y a estímulos aversivos) (Blick, *et al.*, 2015; Muehlmann, *et al.*, 2012). Un alto número de excavaciones podría ser reflejo de un comportamiento perseverante y resistente al cambio, sin embargo, el bajo número de enterramientos registrado por la cepa C58/J, podría ser atribuible a su escasa respuesta al estímulo ambiental.

Es importante señalar que son pocas las cepas murinas en las que se han estudiado patrones de comportamiento repetitivo de alto grado que se presentan en casos de TEA de mayor severidad. Aunque no se tienen reportes claros de estas conductas repetitivas o rutinarias en los ratones C58/J, hay evidencia de que los presentan bajo ciertas situaciones.

Se han utilizado anteriormente pruebas como el laberinto de T, laberinto de Barnes, laberinto acuático de Morris (memoria y aprendizaje espacial) y el test del tablero con agujeros para tratar de evaluar comportamientos repetitivos en los modelos murinos,

aunque han mostrado muchas limitaciones. Sin embargo, una prueba desarrollada por Blick y colaboradores ha revelado posibles patrones de exploración rutinarios, y alta preferencia por ciertos objetos en la cepa C58/J, lo que ha sido un parte aguas para futuras investigaciones con tal de seguir evaluando al modelo animal para su utilización en el estudio del TEA (Blick, *et al.*, 2015).

Por otra parte, los ratones C58/J han demostrado ser un modelo útil para el estudio de fármacos como tratamiento del TEA.

Se tiene documentado que esta cepa responde favorablemente a antagonistas del receptor mGluR5, el cual ha sido estudiado como posible terapia experimental para el padecimiento comórbido del síndrome de X frágil, reduciendo los saltos estereotipados de los ratones C58/J (Silverman *et al.*, 2012).

Además se ha visto que los ratones C58/J disminuyen su nivel de estereotipos motores con un tratamiento agudo de oxitocina, sin inducción de hipoactividad o efectos similares a los ansiolíticos en la prueba de campo abierto (Teng *et al.*, 2013).

4. Planteamiento del problema

Los modelos murinos de autismo representan una gran oportunidad en el estudio del TEA, sin embargo, se han presentado algunas limitantes en su validez, tanto en las cepas con mutaciones genéticas asociadas, como en aquellas con fenotipo y síntomas relacionados al trastorno.

Una de las cepas murinas de mayor caracterización conductual es la cepa C58/J, no obstante, hay una carencia de estudios que le atribuyan anomalías a nivel cerebral y molecular que pudieran asociarse con su fenotipo autista.

Por lo anterior, el estudio de las proteínas involucradas con la plasticidad neuronal como Tau, MAP2A, β -actina y α -tubulina resulta trascendental para entender la neurobiología del autismo.

5. Hipótesis

La cepa C58/J con fenotipo autista presentará diferencias en el contenido de las proteínas del citoesqueleto, Tau, MAP2A, α -tubulina y β -actina, en la corteza prefrontal e hipocampo, en comparación con la cepa silvestre C57 BL/6.

El patrón de expresión de las proteínas del citoesqueleto (Tau, MAP2A, α -tubulina y β -actina) entre la corteza prefrontal y el hipocampo del cerebro de ratones de la cepa C58/J (fenotipo autista) será diferente al patrón que presente la cepa C57 BL/6 (silvestre).

6. Objetivo general

Determinar si existen diferencias en la expresión de algunas proteínas del citoesqueleto neuronal en la corteza prefrontal e hipocampo de la cepa murina C58/J con fenotipo autista en comparación con la cepa silvestre C57 BL/6.

6.1 Objetivos particulares

Analizar si en la corteza prefrontal y el hipocampo de ratones de la cepa C58/J hay cambios en el contenido de las proteínas del citoesqueleto: β -actina y α -tubulina, así como en las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), Tau y MAP2A, en comparación con la cepa silvestre C57 BL/6.

Realizar un análisis comparativo de la expresión de estas proteínas entre la corteza prefrontal y el hipocampo en los ratones de cada fenotipo.

7. Material y métodos

7.1 Reactivos

- Buffer de lisis RIPA: 50mM TRIS-HCL, 150mM NaCl, 1% Tritón, 0.1% SDS, inhibidor de proteasas SIGMAFAST.
- Buffer de Laemlie: Tris base 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, azul de bromofenol, Glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, Amortiguador Tris (TBS): Tris base 0.05 M, NaCl 0.15 M.
- Tris (TBS): Tris base 0.05 M, NaCl 0.15 M
- Glicina ácida: glicina pH 2.5, SDS 10%.
- Solución rica en proteínas: 5% leche descremada, 2% albúmina sérica bovina.
- Kit de quimioluminiscencia (ECL): Pierce ECL Western Blotting Substrate.

Anticuerpos primarios

- anti- β -actina: Actin C-11 sc-1615 desarrollado en cabra. Santa Cruz Biotechnology.
- anti-Tau: Tau (46) 40195 desarrollado en ratón. Cell Signaling.
- anti-fosfo-Tau: RbmAb to Tau (E178) (phospho s396) ab32057 desarrollado en conejo. Abcam
- anti- α -tubulina: α -tubulina sc-398103 desarrollado en ratón. Santa Cruz Biotechnology.
- anti-MAP2: MAP2 4542S desarrollado en conejo. Cell Signaling
- anti-GAPDH: MAB374 636571 desarrollado en ratón. Millipore.

Anticuerpos secundarios

- Anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa: goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005. Santa Cruz Biotechnology.
- Anti- IgG de conejo acoplado a peroxidasa: goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004. Santa Cruz Biotechnology.
- Anti- IgG de cabra acoplado a peroxidasa: mouse anti-goat IgG-HRP sc-2354. Santa Cruz Biotechnology.

7.2 Animales

Los ratones C58/J (fenotipo autista) fueron adquiridos en The Jackson Laboratory y los ratones C57 BL/6 (fenotipo silvestre) fueron adquiridos en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Cinco crías macho de cada cepa, fueron amamantadas (la cepa C58/J por nodrizas) durante tres semanas hasta el destete. Se mantuvieron por siete semanas más con alimentación y agua ad libitum en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

7.3 Disección de corteza prefrontal e hipocampo de ratón

Los animales fueron sacrificados por asfixia en una cámara de CO₂. Se diseccionó la corteza prefrontal y el hipocampo de cada uno (Figura 5).

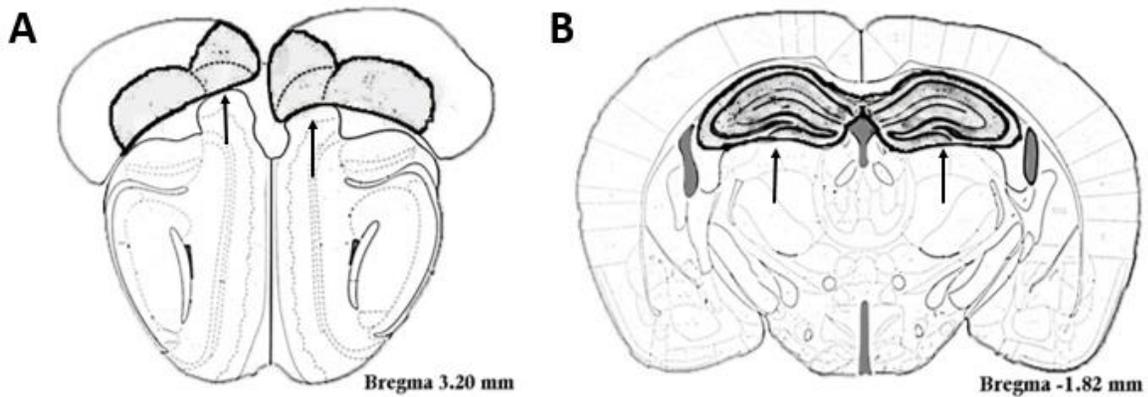


Figura 5. Localización de las regiones cerebrales estudiadas. Imágenes representativas de la corteza prefrontal (A) e hipocampo (B) de ratón (señaladas con flechas). Modificado de Franklin y Paxinos, 2008.

Las prácticas de experimentación y cuidado animal en el Instituto de Investigaciones Biomédicas son evaluadas continuamente por la Comisión Institucional del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) con el fin de asegurar el cumplimiento de las reglas y recomendaciones internacionales (NOM-062-ZOO-1999). Este proyecto está avalado con el folio ID 181.

7.4 Extracción de proteínas

Las estructuras cerebrales disecadas se homogeneizaron en 500µl de buffer de lisis con inhibidores de proteasas (RIPA). Las proteínas fueron obtenidas por centrifugación a 14,000 rpm, 4 °C por 15 min y cuantificadas con un espectro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., DE, USA).

7.5 Western Blot

Se adicionó buffer de Laemmli a las muestras de proteína y se hirvieron durante 5 minutos.

Las proteínas (100µg) fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE 10% a 80 mV. Se incluyeron marcadores preteñidos para la determinación del peso molecular. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en condiciones semi-secas durante 2 horas a 70mA para β-actina, α-tubulina, Tau, y 7 horas a 35mA para MAP2A. Las membranas fueron bloqueadas con una solución rica en proteínas al 5% y albúmina al 1% por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con anticuerpos anti-Tau (0.02 unidades/ml), anti-fosfo-Tau (0.04µg/ml), anti-MAP2 (5X10⁻⁴ unidades/ml), anti-β-actina (0.1µg/ml), y anti-α-tubulina (0.8µg/ml), por toda la noche a 4°C.

Las membranas se incubaron después con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano: anti-IgG de ratón (dil: 1:10'000) para Tau, MAP2A y α-tubulina; anti-IgG de conejo (dil: 1:12'000) para fosfo-Tau; y anti-IgG de cabra (dil: 1:20'000) para β-actina, por 40 minutos a temperatura ambiente. El complejo proteína-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (ECL: enzymatic chemiluminiscence) y las membranas se revelaron por autoradiografía.

Para corregir las diferencias en la cantidad total de proteína cargada en cada pozo, las membranas se trataron con glicina ácida durante toda la noche a 4 °C, y por 30 minutos a temperatura ambiente para quitar los anticuerpos unidos anteriormente (técnica de stripping). Las membranas fueron re-incubadas con anticuerpo anti-GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (0.4µg/ml) durante toda la noche a 4°C, y luego con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (dil: 1:10'000) conjugado con peroxidasa de rábano por 40 minutos a temperatura ambiente, el complejo proteína-anticuerpo se detectó por ECL y las membranas se revelaron por autoradiografía.

Nota: La detección de Tau se realizó seguida del stripping de la membrana, bajo las mismas condiciones previamente descritas, para luego ser re-incubada con anti-fosfo-Tau, y posteriormente con anti-GAPDH.

7.6 Análisis de datos

Las bandas obtenidas fueron sometidas a un análisis densitométrico mediante el programa ImageJ 1.45. Los resultados de la densitometría fueron evaluados a través del programa GraphPad Prism 6.0, y analizados estadísticamente mediante la prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey post hoc. Los valores de P<0.05 fueron considerados significativos.

8. Resultados

Se realizó la técnica de Western Blot para determinar las proteínas Tau, fosfo-Tau (p-Tau), MAP2A, α -tubulina y β -actina de las muestras del hipocampo y la corteza prefrontal de los ratones C58/J y C57 BL/6, con fenotipo autista (A) y silvestre (WT), respectivamente.

Se llevó a cabo un análisis comparativo del contenido de éstas proteínas del citoesqueleto en la corteza prefrontal e hipocampo, entre la cepa silvestre y la cepa autista. Así mismo se realizó la comparación del contenido de las mismas proteínas entre la corteza prefrontal y el hipocampo de cada cepa.

Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

8.1 Expresión de proteína Tau

Observamos seis isoformas de la proteína Tau de peso molecular entre 30-80 kDa (Figura 6A), en la corteza prefrontal y en el hipocampo de la cepa autista C58/J (A) y la cepa silvestre C57 BL/6 (WT). Para su análisis sólo se seleccionaron tres de ellas, las isoformas de 80,60 y 30 kDa, ya que fueron presentadas por ambas cepas. Las isoformas de 30 y 60 kDa fueron las más abundantes.

Con respecto al contenido de Tau y fosfo-Tau en los ratones WT y autistas se observó lo siguiente.

En la gráfica B de la Figura 6, se muestra la expresión de la isoforma de 80 kDa de Tau y de su forma fosforilada (p-Tau) en el residuo de serina 396. El contenido de esta isoforma fue significativamente menor en la corteza prefrontal de los ratones autistas, en comparación con los ratones WT ($P=0.0197$). Sin embargo, no se encontraron diferencias al comparar la expresión de la isoforma fosforilada entre la corteza prefrontal de ambas cepas. Tampoco se observaron diferencias entre el contenido de la isoforma y su estado fosforilado entre el hipocampo de cepa autista y WT.

Por su parte, la expresión de la isoforma de 60 kDa y de su estado fosforilado (Figura 6C), fue significativamente menor en la corteza prefrontal de la cepa con fenotipo autista, al compararla con la cepa WT ($P < 0.0001$). En el hipocampo no se observaron diferencias en la expresión de esta isoforma entre los dos fenotipos.

En lo que respecta a la isoforma de Tau y fosfo-Tau de 30 kDa (Figura 6D), no se encontraron diferencias en su contenido ni en la corteza prefrontal ni en el hipocampo, al comparar ambas cepas. Sin embargo, se observó que la expresión de esta isoforma y de su estado fosforilado tuvo una tendencia a disminuir en el hipocampo de los ratones autistas comparado con los WT.

También se observaron diferencias en el contenido de Tau dependientes de la región cerebral estudiada. El contenido de la isoforma de 80 kDa de Tau y su forma fosforilada, no difirió entre la corteza prefrontal y el hipocampo en ninguna de las dos cepas (Figura 6B). Sin embargo, en los ratones WT, la expresión de Tau como de fosfo-Tau de 60 kDa, fue mayor en la corteza prefrontal respecto al hipocampo ($P < 0.0001$, Figura 6C). De forma interesante, al comparar el contenido de esta isoforma y de su forma fosforilada entre la corteza prefrontal y el hipocampo en la cepa autista, no se hallaron diferencias.

La expresión de Tau y fosfo-Tau de 30 kDa, fue significativamente mayor en el hipocampo de los ratones WT comparado con el contenido en la corteza prefrontal ($P = 0.0001$, Figura 6D), mientras que al determinar el contenido de esta isoforma en las estructuras cerebrales de los ratones autistas, no se encontraron cambios.

En la gráfica E de la Figura 6, se presenta la proporción fosfo-Tau/Tau para cada una de las tres isoformas. No se encontraron diferencias significativas entre los dos fenotipos, ni variaciones dependientes de la región cerebral estudiada.

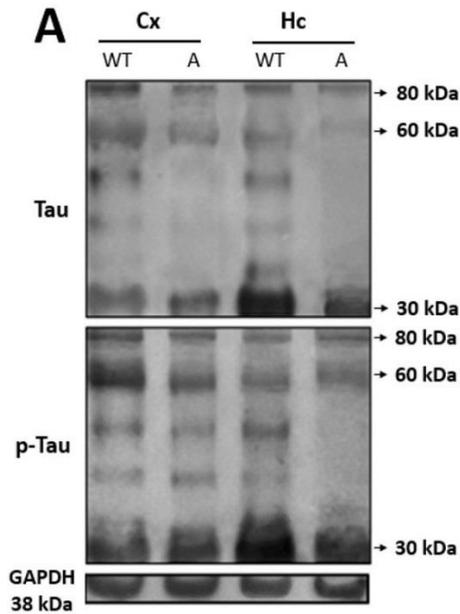
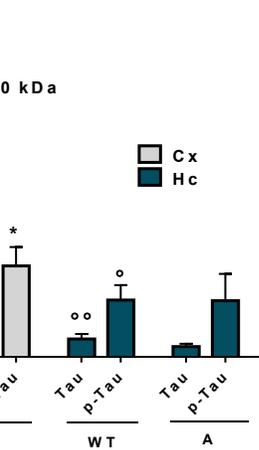
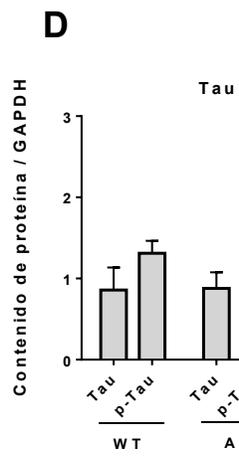
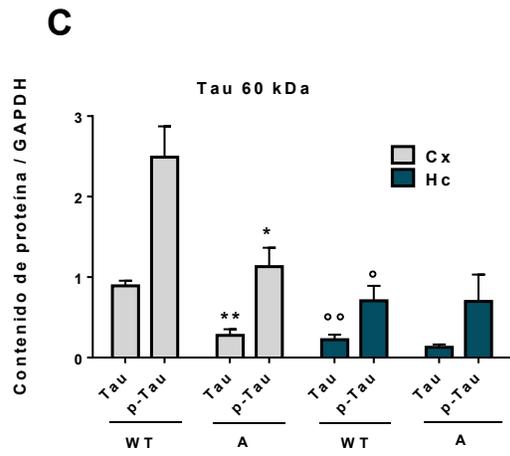
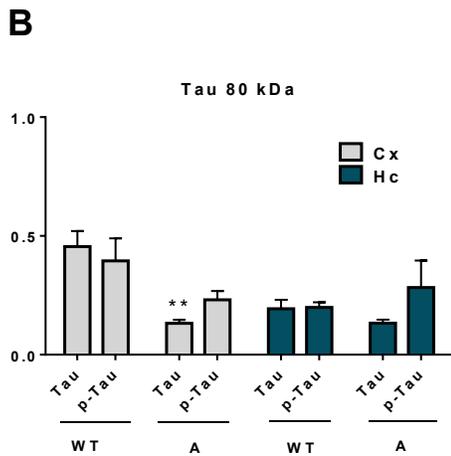


Figura 6. Expresión de las isoformas de Tau en la corteza prefrontal e hipocampo de los ratones WT y autistas.

A) Western Blot representativo; se observan seis isoformas para Tau y fosfo-Tau entre 30-80 kDa. Las isoformas de 80, 60 y 30 kDa están señaladas con flechas. Las proteínas del hipocampo y corteza prefrontal fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE 10%. El complejo proteína-anticuerpo fue detectado por quimioluminiscencia (ECL). Se realizó la técnica de stripping a las membranas, fueron re-incubadas con anti-GAPDH y el complejo proteína-anticuerpo fue detectado por ECL. La proteína GAPDH fue utilizada como control de carga. Las proteínas detectadas fueron cuantificadas por análisis densitométrico y corregidas usando los resultados del contenido de GAPDH. **(B-D)** Expresión de las isoformas de Tau y fosfo-Tau (p-Tau) en la corteza prefrontal e hipocampo de la cepa autista (C58/J) y la cepa WT (C57 BL/6). **(E)** Relación fosfo-Tau/Tau para cada isoforma en la corteza prefrontal e hipocampo de ambas cepas. La relación fue calculada usando los datos del análisis del Western Blot de cada isoforma. WT (silvestre), A (autista), Cx (corteza prefrontal), Hc (hipocampo). Los resultados son expresados como media \pm SEM., n = 5. Análisis comparativo entre cepas (WT vs A): * $P < 0.05$ vs. Corteza prefrontal WT (p-Tau). ** $P < 0.05$ vs. Corteza prefrontal WT (Tau); Análisis comparativo entre regiones (Hc vs. Cx para cada cepa): ° $P < 0.05$ vs. Corteza prefrontal WT (p-Tau). °° $P < 0.05$ vs. Corteza prefrontal WT (Tau). El análisis estadístico fue hecho utilizando ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.



8.2 Expresión de proteína MAP2A

En la gráfica B de la Figura 7, se presenta la expresión de la proteína MAP2A en las estructuras cerebrales de ambas cepas. El contenido de esta proteína asociada a microtúbulos fue significativamente menor tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo de los ratones autistas comparados con la cepa WT ($P < 0.0001$). Al llevar a cabo el análisis comparativo entre las áreas cerebrales de cada una de las cepas, se encontró que la expresión de MAP2A fue significativamente mayor en la corteza prefrontal comparada con el hipocampo tanto de la cepa WT como de la autista ($P < 0.0001$).

8.3 Expresión de proteína α - tubulina

La expresión de α -tubulina en la corteza prefrontal y el hipocampo de la cepa autista y WT se muestra en la gráfica C de la Figura 7. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de α -tubulina al comparar los ratones autistas con los WT. Tampoco se observaron variaciones en el contenido de la proteína dependientes de la región cerebral estudiada en ninguna de las dos cepas.

8.4 Expresión de proteína β - actina

En la gráfica D de la Figura 7, se presenta la expresión de la proteína β -actina tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo de los ratones autistas y WT. No se observaron cambios significativos en la expresión de β -actina en las estructuras cerebrales de la cepa autista al compararla con los ratones WT. Tampoco se encontraron diferencias en el contenido de la proteína entre las estructuras cerebrales de cada fenotipo.

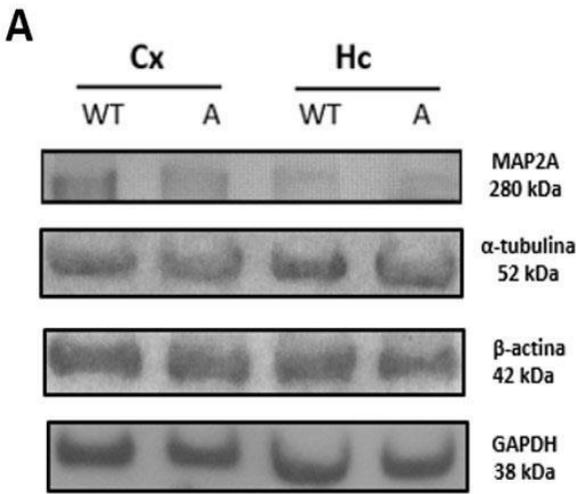
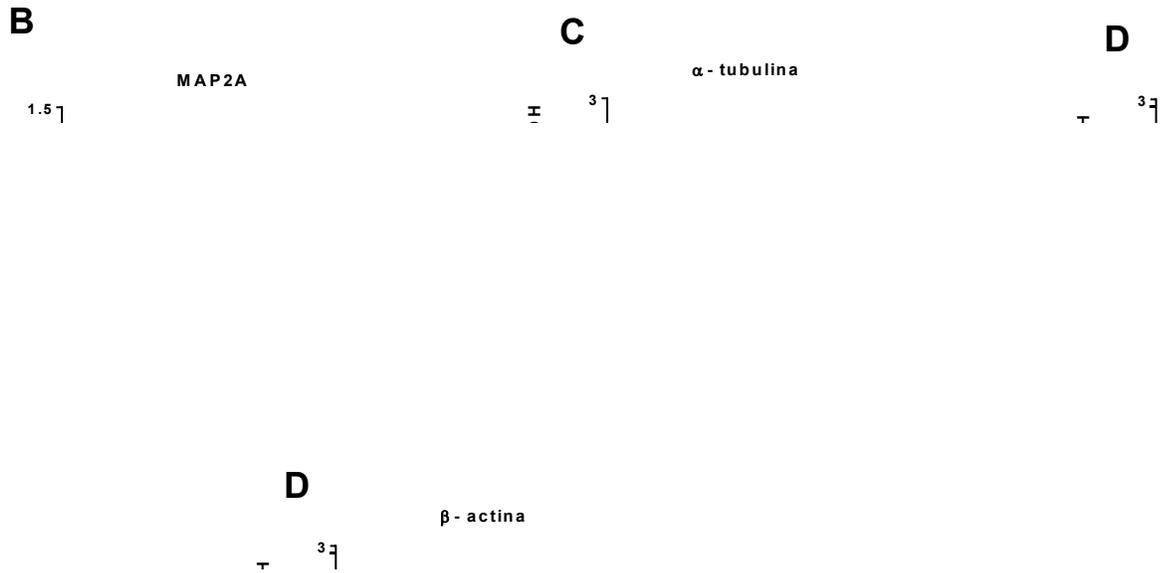


Figura 7. Expresión de MAP2A, α -tubulina y β -actina en la corteza prefrontal e hipocampo de ratones WT y autistas.

A) Western Blot representativo. Las proteínas del hipocampo y corteza prefrontal fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE 10%. El complejo proteína-anticuerpo fue detectado por quimioluminiscencia (ECL). Se realizó la técnica de stripping a las membranas, fueron re-incubadas con anti-GAPDH y el complejo proteína-anticuerpo fue detectado por ECL. La proteína GAPDH fue utilizada como control de carga. Las proteínas detectadas fueron cuantificadas por análisis densitométrico y corregidas usando los resultados del contenido de GAPDH. **(B)** Expresión de MAP2A, **(C)** α -tubulina, y **(D)** β -actina, en la corteza prefrontal e hipocampo de la cepa autista (C58/J) y la cepa WT (C57 BL/6). WT (silvestre), A (autista), Cx (corteza prefrontal), Hc (hipocampo). Los resultados son expresados como media \pm SEM., n = 5. Análisis comparativo entre cepas (WT vs. A): * $P < 0.0001$ vs. Hipocampo WT. ** $P < 0.0001$ vs. Corteza prefrontal WT; Análisis comparativo entre regiones (Hc. vs. Cx para cada cepa): $^{\circ}P < 0.0001$ vs. Corteza prefrontal A. $^{\circ\circ}P < 0.0001$ vs. Corteza prefrontal WT. El análisis estadístico fue hecho utilizando ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.



9. Discusión

Los componentes del citoesqueleto constituyen la base estructural y dinámica de la neurona, modificando su morfología de acuerdo a los requerimientos cerebrales. Es por eso, que una alteración en la expresión de estas proteínas, podría desencadenar un desbalance en la plasticidad del cerebro.

Precisamente en el modelo murino de autismo C58/J, se encontraron anomalías en la expresión de algunas de las proteínas del citoesqueleto neuronal, que podrían estar ligados con su fenotipo patológico.

Aunque el TEA está relacionado con daños en un sin fin de estructuras cerebrales, para este trabajo se eligieron la corteza prefrontal y el hipocampo, por ser de las regiones cerebrales de mayor estudio para este trastorno, por relacionarse funcionalmente con procesos cognitivos afectados en pacientes autistas, y también por estar asociadas con los resultados de las pruebas conductuales documentadas para la cepa C58/J (Blick *et al.*, 2015; Ryan *et al.*, 2010; Muehlmann *et al.*, 2012; y Moy *et al.*, 2008).

Las proteínas actina y tubulina han sido reconocidas como componentes clave del citoesqueleto, mientras que Tau y MAP2A están involucradas en la dinámica de éste (Hansberg-Pastor *et al.*, 2015).

Se encontraron seis isoformas de Tau en las estructuras cerebrales de los ratones (peso molecular de 30-80 kDa), mismo número que el que ha sido reportado en humanos (Billingsley, *et al.*, 1997), de las cuales sólo fueron evaluadas las de peso molecular correspondiente a 30, 60 y 80 kDa. En un primer plano, los resultados encontrados sugieren que sólo la expresión de las isoformas de Tau de 60 y 80 kDa, así como de la forma fosforilada (p-Tau) de 60 kDa, podría estar alterada en la corteza prefrontal de los ratones con fenotipo autista, siendo indicativo de un posible desbalance en la dinámica del citoesqueleto, causando anomalías en la estabilización y ensamblaje de los microtúbulos, y por ende, alteraciones en la

neuritogénesis, en la formación de espinas dendríticas y en la regulación de conexiones sinápticas de esta región cerebral, de acuerdo con las alteraciones cerebrales reportadas como consecuencia de cambios en la expresión de Tau por Caceres *et al.*, 1991; Harada *et al.*, 1994 y Shahania *et al.*, 2002.

Anteriormente se ha reportado que las isoformas de Tau pueden encontrarse diferencialmente expresadas entre las estructuras cerebrales, e incluso que esto podría estar influenciado por la etapa de desarrollo (Buée, *et al.*, 2000), lo que concuerda con nuestros resultados encontrados en el cerebro de la cepa murina sana (C57 BL/6), donde los cambios en el contenido de las diferentes isoformas de Tau podrían ser considerados como variaciones comunes debidas a un posible rol de Tau dependiente del área cerebral donde se exprese. La importancia de este resultado se puede asociar con la carencia de estas variaciones en la cepa con fenotipo autista. El no observar la expresión predominante de Tau y fosfo-Tau de 60 kDa en la corteza prefrontal y de 30 kDa en el hipocampo de los ratones autistas, que sí se observa en la cepa WT, podría sugerir un desbalance fisiológico en dichas estructuras. Lo anterior afectaría funciones como memoria, aprendizaje y preferencia social, las cuales se han reportado como anormales en la cepa C58/J, según diferentes evaluaciones conductuales (Moy *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2010).

Al evaluar los resultados correspondientes a la proporción fosfo-Tau/Tau, no se encontraron discrepancias entre la cepa WT y la autista. Lo que aunado a lo anterior, podría sugerir que las anomalías en la proteína Tau están ligadas a alteraciones en su expresión, más no en el estado de actividad de la proteína relacionado con su fosforilación por diferentes cinasas. Sin embargo, sólo se evaluó la fosforilación del residuo de serina 396, cuando actualmente se han identificado treinta y tres sitios de fosforilación de Tau, tanto en el cerebro sano, como en estado patológico (Hanger, *et al.*, 2009), que podrían evaluarse.

Al analizar el contenido del otro miembro de la familia de MAPs, MAP2A, se observó que su expresión, al igual que la de Tau, también era baja en el cerebro de los ratones autistas, pero a diferencia de las isoformas de Tau, se conservó la relación de la expresión de MAP2A dependiente de la región cerebral estudiada, observada en los ratones WT, al ser predominante en la corteza prefrontal de ambos fenotipos en comparación con el hipocampo. Esta expresión preferencial de MAP2A en la corteza prefrontal ya había sido reportada anteriormente en humanos, especialmente en las neuronas piramidales de las capas corticales III y V (Kalcheva, *et al.*, 1998). Entonces, quizá las anomalías en la expresión de MAP2A, además de relacionarse con problemas en el ensamblaje, polimerización y en la conservación de la estabilidad de los microtúbulos, tengan una influencia en las diferentes capas corticales, que ya se han reportado alteradas en estudios de pacientes con TEA (Hutsler *et al.*, 2009).

Aunque no se podrían asegurar alteraciones en la funcionalidad de Tau y MAP2A, es claro que su baja expresión en los ratones autistas podría estar involucrada con defectos moleculares en el citoesqueleto, que interfirieran con el desarrollo de axones, dendritas y espinas.

Los resultados obtenidos para la expresión de la proteína α -tubulina, que fueron constantes tanto en ambas cepas como entre las áreas cerebrales, podrían sugerir un posible daño en la polimerización de microtúbulos, más no en el contenido de esta proteína. No hay que descartar la posibilidad de una alteración en la formación de los heterodímeros de tubulina, que podría ser afectada por una expresión anormal de β -tubulina e incluso de γ -tubulina. Aunque Miller, *et al.*, 2013 también tiene registro de una expresión constante de α -tubulina en el cerebro de ratones con fenotipo autista de la cepa BTBR, existe un estudio que reporta un decremento de β -tubulina III en el cerebelo de pacientes autistas (Breuss, *et al.*, 2012).

Por otra parte, no se encontraron cambios en la expresión de la proteína β -actina en los ratones autistas, en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, esto puede atribuirse a que posiblemente las alteraciones en el contenido de actina estén reguladas específicamente por ciertas mutaciones asociadas con el TEA, pero que no están presentes en la cepa C58/J. Por ejemplo, se ha reportado que una mutación en

el gen RELN está relacionada con una baja expresión de β -actina en la corteza frontal de pacientes autistas (Fatemi, et al., 2005); mientras que en una investigación se sugiere que el gen SHANK3, involucrado en varios casos de autismo, ejerce efectos en la acumulación de F-actina, o bien en su polimerización (Durand *et al.*, 2011).

Otra consideración que habría que hacer respecto a la expresión de las cuatro proteínas de citoesqueleto estudiadas, es que los resultados del contenido proteico de cada región cerebral son globales, y es probable que existan diferencias importantes dentro de las áreas de cada estructura, al haberse documentado cambios en las capas corticales II y V (Hutsler *et al.*, 2009) y en las áreas CA1 y CA4 del hipocampo (Raymond *et al.*, 1996) en pacientes con TEA. Por ende, sería necesario hacer un análisis comparativo entre las diferentes zonas de una misma estructura cerebral.

10. Conclusiones

La cepa murina C58/J con fenotipo autista presenta una disminución en el contenido de las proteínas asociadas a microtúbulos, Tau de 60 y 80 kDa (en corteza prefrontal) y MAP2A (en corteza prefrontal e hipocampo), en comparación con la cepa C57 BL/6 con fenotipo silvestre.

La cepa silvestre C57 BL/6 presenta diferencias en el contenido de las isoformas de Tau de 30 y 60 kDa en la corteza prefrontal, en comparación con el hipocampo. La cepa C58/J con fenotipo autista no presenta estas variaciones.

11. Perspectivas

- Evaluar si hay alteraciones en la densidad de espinas dendríticas y/o en el volumen tanto del hipocampo como de la corteza prefrontal de la cepa C58/J.
- Determinar si hay cambios morfológicos o moleculares en las diferentes capas corticales y áreas hipocampales del cerebro de los ratones C58/J.
- Estudiar si hay anormalidades en otras estructuras cerebrales de la cepa C58/J asociadas al autismo (cerebelo, tálamo, cuerpo calloso, amígdala).
- Evaluar las alteraciones cerebrales mencionadas tanto en otras cepas con fenotipo autista, como en algunas con genotipo asociado al TEA.

12. Referencias

1. Alcaraz, RV. 2001. Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. 2da Edición. México: El Manual Moderno, Universidad de Guadalajara, Instituto de Neurociencias. 264p.
2. Amaral, DG.; Schumann, MC; Nordahl, WC. 2008. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci.* 31 (3). DOI:10.1016/j.tins.2007.12.005.
3. Argyropoulos, A.; Gilby, K.; Hill-Yardin, E. 2013. Studying autism in rodent models: reconciling endophenotypes with comorbidities. *Front. Hum. Neurosci.* 7:32-41. DOI: 10.3389/fnhum.2013.00417.
4. American Psychiatric Association. 2014. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-5. 5ta Edición. México: Médica Panamericana.
5. Arking, DE.; Cutler, D.; Brune, C.; Teslovich, T.; West, K.; Ikeda, M.; Rea, A.; Guy, M.; Lin, S.; Cook Jr., E.; Chakravarti, A. 2008. A Common Genetic Variant in the Neurexin Superfamily Member CNTNAP2 Increases Familial Risk of Autism. *Am. J. Hum. Genet* 82: 160-164. DOI 10.1016/j.ajhg.2007.09.015.
6. Aylward EH.; Minshew NJ.; Goldstein G.; Honeycutt NA.; Augustine AM.; Yates KO., 1999 MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. *Neurology*; 53: 2145-2150.
7. Bailey A.; Luthert, P.; Bolton P.; LeCouteur A.; Rutter M.; Harding B. 1993. Autism and megalencephaly. *Lancet* 341: 1225-1226. DOI:10.1016/0140-6736(93)91065-T.
8. Bailey A.; Luthert, P.; Dean A.; Harding B.; Janota I.; Montgomery M. 1998. A clinicopathological study of autism. *Brain Res.* 121(Pt 5):889-905. DOI: 10.1093/brain/121.5.889.
9. Baird G. Simonoff, E.; Pickles, A.; Chandler, S.; Loucas, T.; Meldrum, D.; Charman, T. 2006. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the special needs and autism project (SNAP). *Lancet* 368(9531):210-215. DOI:10.1016/S0140-6736(06)69041-7.
10. Bakos, J; Bacova, Z.; Grant, S.; Castejon, A.; Ostatnikova, D. 2014. Are Molecules Involved in Neuritogenesis and Axon Guidance Related to Autism Pathogenesis?. *Neuromol Med.* Springer. DOI: 10.1007/s12017-015-8357-7.
11. Bamberg, JR.; Bray, D.; Chapman, K. 1986. Assembly of microtubules at the tip of growing axons. *Nature* 321, 788-790. DOI: 10.1038/321788a0.
12. Barnea-Goraly, N.; Kwon, H.; Menon, V.; Eliez, S.; Lotspeich, L.; Reiss, A. 2004. White Matter Structure in Autism: Preliminary Evidence from Diffusion Tensor Imaging. *Biol Psychiatry*; 55:323-326. DOI:10.1016/j.biopsych.2003.10.022.
13. Bauman M.; Kemper T.1995. Neuroanatomical observations of the brain in autism. *Adv Biol Psychiatry* 1: 1-26.
14. Belichenko PV.; Hagberg B.; Dahlstrom A. 1997: Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)* 93:50-61.
15. Bernhardt, R.; Matus, A. 1984. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between the dendritic and axonal cytoskeletons. *J. Comp. Neurol.* 226, 203-221.
16. Bertone, A.; Hanck, J; Kogan C; Chaudhuri, A; Cornish, K. 2010. Using Perceptual Signatures to Define and Dissociate Condition-Specific Neural Etiology: Autism and Fragile X Syndrome as Model Conditions. *J Autism Dev Disord* 40:1531-1540. DOI: 10.1007/s10803-010-1109-5.

-
17. Betancur, C.; Sakurai, T.; Buxbaum, J. 2009. The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends Neurosci.* 32 (7): 402-412. DOI:10.1016/j.tins.2009.04.003.
 18. Berns, GS.; Sejnowski, T. 1998. A Computational Model of How the Basal Ganglia Produce Sequences. *J. Cognitive Neurosci.* 10(1):108-121.
 19. Billingsley, ML.; Kincaid, R. 1997. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem. J.* 323: 577-591. DOI: 10.1042/bj3230577.
 20. Binder, LI.; Frankfurter, A.; Rebhun, LI. 1985. The distribution of tau in the mammalian nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371-1378.
 21. Blick, MG.; Puchalski, B.; Bolanos, V.; Wolfe, K.; Green, M.; Ryan, B. 2015. Novel object exploration in the C58/J mouse model of autistic-like behavior. *Behav. Brain Res.* 282: 54-60. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.12.030.
 22. Boger-Megiddo, I.; Shaw, D; Friedman, S; Sparks, B; Artru, A; Giedd, J; Dawson, G; Dager, S. 2006. Corpus Callosum Morphometrics in Young Children with Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord* 36:733-739. DOI: 10.1007/s10803-006-0121-2.
 23. Bourgeron, T. 2015. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Neurosci.* 16: 511-563. DOI:10.1038/nrn3992.
 24. Breuss, M; Heng, TJ.; Poirier, K.; Tian, G.; Jaglin, X.; Qu, Z.; Braun, A.; Gstrein, T.; Ngo, L.; Haas, M.; Bahi-Buisson, N.; Moutard, M.; Passemard, S.; Verloes, A.; Gressens, P; Xie, Y.; Robson, K.; Rani, D.; Thangaraj, K.; Clausen, T.; Chelly, J.; Cowan, N.; Keays, D. 2012. Mutations in the β -Tubulin Gene TUBB5 Cause Microcephaly with Structural Brain Abnormalities. *Cell Rep* 2, 1554-1562. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.11.017.
 25. Buée, L.; Bussiére, T.; Buée Scherrerb, V.; Delacourte, A.; Hof, P. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative 1 disorders. *Brain Res. Reviews* 33: 95-130.
 26. Caceres, A.; Potrebic S.; Kosik, K. 1991. The effect of Tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J. Neurosci.*, 11(6): 1515-1523
 27. Campbell, DB.; Sutcliffe, J.; Ebert, P.; Militerni, R.; Bravaccio, C.; Trillo, S.; Elia, M.; Schneider, C.; Melmed, R.; Sacco, R.; Persico, A.; Levitt, P. 2006. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *PNAS* 103 (45): 16834-16839. DOI: 10.1073/pnas.0605296103.
 28. Carpenter, M. 1994. *Neuroanatomía. Fundamentos.* 4ta Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 442p.
 29. Carper, R.; Courchesne, E. 2005. Localized Enlargement of the Frontal Cortex in Early Autism. *Biol Psychiatry*; 57:126–133. DOI:10.1016/j.biopsych.2004.11.005.
 30. Casanova, MF.; Van Kooten, Imke A. J.; Switala, A; Van Engeland, H.; Heinsen, H.; Steinbusch, H.; Hof, P.; Trippe, J.; Stone, J; Schmitz, C. 2006. Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta Neuropathol* 112:287-303. DOI: 10.1007/s00401-006-0085-5.
 31. Castelli, F.; Frith, C.; Happe, F.; Frith, U. 2002. Autism, Asperger syndrome and brain mechanisms for the attribution of mental states to animated shapes. *Brain* 125:1839 –1849. DOI: 10.1093/brain/awf189.
 32. Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Prevalence of autism spectrum disorders- autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2008. *Morb Mortal Wkly Rep Surveillance Summaries*, 61(3):1–19.
 33. Chung, W.J.; Kindler, S.; Seidenbecher, C.; and Garner, C.C. 1996. MAP-2a an alternatively spliced variant of microtubule associated protein 2. *J. Neurochem.* 66:1273-1281.

-
34. Courchesne E.; Townsend J.; Saitoh O. 1994. The brain in infantile autism: posterior fossa structures are abnormal. *Neurology* 44: 214-223.
 35. Courchesne E.; Karns CM.; Davis HR.; Ziccardi R.; Carper RA.; Tigue ZD.; Chisum HJ.; Moses P.; Pierce K.; Lord C.; Lincoln AJ.; Pizzo S.; Schreibman L.; Haas RH.; Akshoomoff NA.; Courchesne RY. 2001. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology* 57:245-254. DOI: 10.1212/01.wnl.0000399191.79091.28.
 36. Courchesne E.; Redcay E.; Kennedy DP. 2004. The autistic brain: birth through adulthood. *Curr Opin Neurol* 56:269-278.
 37. Courchesne E.; Pierce K. 2005. Brain overgrowth in autism during a critical time in development: implications for frontal pyramidal neuron and interneuron development and connectivity. *Int J Dev Neurosci* 23:153-170.
 38. Courchesne, E.; Pierce, K. 2005. Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15:225–230. DOI: 10.1016/j.conb.2005.03.001.
 39. Courchesne, E.; Mouton, P.; Calhoun, M.; Semendeferi, K.; Ahrens-Barbeau, C.; Hallet, M.; Barnes, C.; Pierce, K. 2011. Neuron Number and Size in Prefrontal Cortex of Children With Autism. *JAMA*; 306(18):2001-2010. DOI: 10.1001/jama.2011.1638.
 40. Craig, A.M.; and Banker, G. 1994. Neuronal Polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 267–310.
 41. Davidovitch M.; Patterson B.; Gartside P. 1996. Head circumference measurements in children with autism. *J Child Neurol* 11: 389-393. DOI: 10.1177/088307389601100509.
 42. Dawson, G.; Ashman, S.; Carver, L. 2000. The role of early experience in shaping behavioral and brain development and its implications for social policy. *Dev. Psychopathol.* 12: 695-712. DOI: 10.1017/S0954579400004089.
 43. Dehmelt, L.; Halpain, S. 2004. Actin and microtubules in neurite initiation: Are MAPs the missing link? *J Neurobiol.* 58(1), 18-33. DOI: 10.1002/neu.10284.
 44. Delahanty, RJ.; Kang, JQ.; Brune, CW.; Kistner, EO.; Courchesne, E.; Cox, NJ.; Cook Jr, EH.; Macdonald, RL.; Sutcliffe, JS. 2011. Maternal transmission of a rare GABRB3 signal peptide variant is associated with autism. *Mol. Psychiatry.* 16: 86-96. DOI:10.1038/mp.2009.118.
 45. Díaz-Nido, J.; Ulloa, L.; Sánchez, C.; Ávila, J. 1996. The role of the cytoskeleton in the morphological changes occurring during neuronal differentiation. *Cell Dev Biol* 7: 733-739. DOI:10.1006/scdb.1996.0090
 46. DiCicco-Bloom, E.; Lord, C; Zwaigenbaum, L; Courchesne, E.; Dager, S.; Schmitz, C.; Schultz, R.; Crawley, J.; Young, L. 2006. The Developmental Neurobiology of Autism Spectrum Disorder. *J. Neurosci.* 26(26):6897-6906. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1712-06.2006.
 47. Durand, CM.; Perroy, J.; Loll, F.; Perrais, D.; Fagni, L.; Bourgeron, T.; Montcouquiol, M; Sans, N. 2011. SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol. Psychiatry.* 1-14. DOI: 10.1038/mp.2011.57.
 48. Dutta, S.; Das, S.; Guhathakurta, S.; Sen, B.; Sinha, S.; Chatterjee, A.; Ghosh, S.; Ahmed, S.; Ghosh, S.; Usha, R. 2007. Glutamate Receptor 6 Gene (GluR6 or GRIK2) Polymorphisms in the Indian Population: A Genetic Association Study on Autism Spectrum Disorder. *Cell Mol Neurobiol* 27:1035-1047. DOI: 10.1007/s10571-007-9193-6.
 49. Duvernoy, H.; Cattin, F.; Risold, P. 2013. *The Human Hippocampus Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI.* 4ta Edición. Springer. 242p. DOI 10.1007/978-3-642-33603-4

-
50. Egaas, B.; Courchesne, E.; Saitoh, O. 1995. Reduced size of corpus callosum in autism. *Arch Neurol.* 52, 794–801. DOI: 10.1001/archneur.1995.00540320070014.
 51. Ellegood, J.; Crawley, J. 2015. *Neurotherapeutics*. Springer. DOI: 10.1007/s13311-015-0360-z.
 52. Ey, E.; Leblond, C.; Bourgeron, T. 2011. Behavioral Profiles of Mouse Models for Autism Spectrum Disorders. *Autism Res.* 4: 5-16. DOI: 10.1002/aur.175.
 53. Fatemi, SH.; Aldinger, K.; Ashwood, P.; Bauman, M.; Blaha, C.; Blatt, G.; Chauhan, A.; Chauhan, V.; Dager, S.; Dickson, P.; Estes, A.; Goldowitz, D.; Heck, D.; Kemper, T.; King, B.; Martin, L.; Millen, K.; Mittleman G.; Mosconi, M.; Persico, A.; Sweeney, J.; Webb, S.; Welsh, J. 2012. Consensus Paper: Pathological Role of the Cerebellum in Autism. *Cerebellum* 11:777-807. DOI: 10.1007/s12311-012-0355-9.
 54. Fatemi, SH.; Snow, A.; Stry, J.; Araghi-Niknam, M.; Reutiman, T.; Lee, S.; Brooks, A.; Pearce, D. 2005. Reelin Signaling Is Impaired in Autism. *Biol Psychiatry* 57:777-787. DOI:10.1016/j.biopsych.2004.12.018.
 55. Franklin, K.; Paxinos G. 2008. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3ra Edición. Elsevier. Academic Press. 360p.
 56. Fregozo, CS.; Pérez, MI. 2012. Participación de las proteínas de unión a la actina y vías de señalización asociadas a la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas. *Neurología* 27(7):421-431. DOI: 10.1016/j.nrl.2011.10.005.
 57. Frith, C. 2004. Is autism a disconnection disorder? *Lancet Neurol.* 3: 577. DOI: 10.1016/S1474-4422(04)00875-0.
 58. Fuster, JM. 1988. *Prefrontal Cortex*. Springer. 107-109. DOI: 10.1007/978-1-4899-6776-3_43.
 59. Geschwind, DH. 2011. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends Cogn Sci.* 15(9). DOI:10.1016/j.tics.2011.07.003.
 60. Gilbert, J.; Cuccaro, M.; Pericak-Vance, M.; Martin, E. 2009. Association and Gene–Gene Interaction of SLC6A4 and ITGB3 in Autism. *Am J Med Genet Part B* 153B:477:483. DOI: 10.1002/ajmg.b.31003.
 61. Glasson, E.; McDermott, S.; Dixon, G.; Cook, H.; Chauvel, P.; Maley-Berg, A.; Wray, J. 2008. Management of assessments and diagnoses for children with autism spectrum disorders: The Western Australian Model. *MJA.* 188:288-329.
 62. Goedert, M.; Crowther, RA.; Garner, CC. 1991. Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci.* 14(5):193-9. DOI: 10.1016/0166-2236(91)90105-4.
 63. González-Arenas, A.; Piña-Medina, A.; González-Flores, O.; Gómora-Arratib, P.; Carrillo-Martínez, G.; Balandrán-Ruiz, M.; Camacho-Arroyo, I., 2012. Expression pattern of Tau in the rat brain during pregnancy and the beginning of lactation. *Brain Res. Bull.* 89: 108-114. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2012.07.011.
 64. Hall, A., 1998. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* 279:509-514. DOI: 10.1126/science.279.5350.509.
 65. Hanger, D.P., Anderton, B.; Noble, W. 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* 15 (3): 112-119. DOI: 10.1016/j.molmed.2009.01.003.
 66. Hansberg-Pastor, V.; González-Arenas, A.; Piña-Medina, A.; Camacho-Arroyo. 2015. Sex Hormones Regulate Cytoskeletal Proteins involved in Brain Plasticity. *Front. Psychiatry* 6:165. DOI: 10.3389/fpsy.2015.00165.
 67. Happe, F.; Ehlers, S.; Fletcher, P.; Frith, U.; Johansson, M.; Gillberg, C. 1996: “Theory of mind” in the brain. Evidence from a PET scan study of Asperger syndrome. *Neuroreport* 8:197–201. DOI: 10.1097/00001756-199612200-00040.

-
68. Harada, A.; Oguchi, K.; Okabe, S.; Kuno, J.; Terada, S.; Ohshima, T.; Sato-Yoshitake, R.; Takei, Y.; Noda, T.; Hirokawa, N. 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature Lett* 369: 488-491. DOI:10.1038/369488a0
 69. Harden, AY.; Minshew, N. J.; Keshavan, M. S. 2000. Corpus callosum size in autism. *Neurology*, 55, 1033-1036.
 70. Hazlett, H.; Poe, M.; Gerig, G.; Smith, R.; Piven, J. 2006. Cortical Gray and White Brain Tissue Volume in Adolescents and Adults with Autism. *Biol Psychiatry*;59:1-6. DOI:10.1016/j.biopsych.2005.06.015.
 71. Herbert, MR.; Ziegler, D. A.; Deutsch, C. K.; O'Brien, L. M.; Lange, N.; Bakardjiev, A.; Hodgson, J.; Adrien, K. T.; Steele, S.; Makris, N.; Kennedy, D.; Harris, G.; Caviness Jr. 2003. Dissociations of cerebral cortex, subcortical and cerebral white matter volumes in autistic boys. *Brain* 126: 1182-1192. DOI: 10.1093/brain/awg110.
 72. Hering, H.; Sheng, M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 880-888. DOI: :10.1038/35104061.
 73. Horwitz B.; Rumsey JM.; Grady CL.; Rapoport SI. 1988. The cerebral metabolic landscape in autism. Intercorrelations of regional glucose utilization. *Arch Neurol.* 45(7):749-55. DOI: 10.1001/archneur.1988.00520310055018.
 74. Huguet, G.; Ey, E; Bourgeron, T. 2013. The Genetic Landscapes of Autism Spectrum Disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* DOI: 14:191-213.10.1146/annurev-genom-091212-153431.
 75. Hutsler, JJ.; Zhang, H. 2009. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res.* 1309: 83-94. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.09.120.
 76. Hyams, JS; Lloyd, CW. 1993. *Microtubules*. New York: Wiley-Liss.
 77. Idring, S.; Rai, D.; Dal, H.; Dalman, C.; Sturm, H.; Zander, E.; Lee, B.; Serlachius, E.; Magnusson, C. 2012. Autism spectrum disorders in the Stockholm Youth Cohort: design, prevalence and validity. *PLoS One* 7(7):e41280. DOI:10.1371/journal.pone.0041280.
 78. Jacob, S.; Brune, C.; Carter, C.; Leventhal, B.; Lord, C.; Cook Jr, E. 2007. Association of the oxytocin receptor gene (OXTR) in Caucasian children and adolescents with autism. *Neuroscience Lett.* 417: 6-9. DOI:10.1016/j.neulet.2007.02.001.
 79. Jamain, S.; Betancur, C; Quach, H.; Philippe, A.; Fellous, M.; Giros, B.; Gillberg, C.; Leboyer, M.; Bourgeron, T.; The Paris Autism Research International Sibpair (PARIS). 2002. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol. Psychiatry* 7:302-310. DOI: 10.1038/sj/mp/4000979.
 80. Jaworski, J.; Kapitein, L.; Montenegro Gouveia, S.; Dortland, B.; Wulf, P.; Grigoriev, I.; Camera, P.; Spangler, S.; Di Stefano, P.; Demmers, J.; Krugers, H.; Defilippi, P.; Akhmanova, A.; Hoogenraad, C. 2009. Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron* 61:85-100. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.11.013.
 81. Junqué, C.; Barroso, J. 2009. *Manual de Neuropsicología*. España: Ed. Síntesis. 346p.
 82. Kaech, S.; Ludin, B.; Matus, A. 1996. Cytoskeletal Plasticity in Cells Expressing Neuronal Microtubule-Associated Proteins. *Neuron* 17:1189-1199.
 83. Kalcheva, N.; Rockwood, J.; Kress, Y.; Steiner, A; Shafit-Zagardo, B. 1998. Molecular and Functional Characteristics of MAP-2a: Ability of MAP-2a Versus MAP-2b to Induce Stable Microtubules in COS Cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 40:272-285.
 84. Kandel, E.; Schwartz, J.; Jessell, T. 2000. *Principles of Neural Science*. 4ta Edición. Nueva York: McGraw-Hill. 1230p.
 85. Kanner, L. 1943. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 2:217-250.

-
86. Kaufmann, WE.; Moser, H.W. 2000. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb. Cortex* 10, 981-991. DOI: 10.1093/cercor/10.10.981.
 87. Kemper TL.; Bauman M. 1998. Neuropathology of infantile autism. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:645-652. DOI: 10.1097/00005072-199807000-00001.
 88. Kennedy, MB.; Beale, H.C.; Carlisle, H.J.; Washburn, L.R., 2005. Integration of biochemical signalling in spines. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 423-434. DOI:10.1038/nrn1685.
 89. Kessels, MM; Schwintzer, L.; Schlobinski, D.; Qualmann, B. 2011. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis. *Eur. J. Cell Biol* 90: 926-933. DOI:10.1016/j.ejcb.2010.08.011.
 90. Kim, YS.; Leventhal, B.; Koh, Y.; Fombonne, E.; Laska, E.; Lim, E.; Cheon, K.; Kim, S.; Kim, Y.K.; Lee, H.; Song, D.; Grinker, R. 2011. Prevalence of Autism Spectrum Disorders in a Total Population Sample. *Am J Psychiatry* 168:904-912. DOI: 10.1176/appi.ajp.2011.10101532.
 91. Koenderink, M.; Uylings, H. 1995. Postnatal maturation of layer V pyramidal neurons in the human prefrontal cortex. A quantitative Golgi analysis. *Brain Res.* 678: 233-243. DOI: 10.1016/0006-8993(95)00206-6.
 92. Kolb, B.; Whishaw I. 2008. *Fundamentals of Human Neuropsychology*. 6ta Edición. New York: Worth Publishers. 912p.
 93. Korey, CA.; Van Vactor, D. 2000. From the growth cone surface to the cytoskeleton: one journey, many paths. *J Neurobiol*, 44(2), 184-193. DOI: 10.1002/1097-4695(200008)44:2<184::AID-NEU8>3.0.CO;2-N.
 94. Lai, MC; Baron-Cohen, S.; Buxbaum, JD. 2015. Understanding autism in the light of sex/gender. *Mol. Autism* 6: 1-5. DOI: 10.1186/s13229-015-0021-4.
 95. Lai, MC.; Lombardo, M.; Baron-Cohen, S. 2014. Autism. *Lancet* 383: 896–910. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61539-1.
 96. Lainhart JE.; Piven J.; Wzorek M.; Landa R.; Santangelo SL.; Coon H. 1997. Macrocephaly in children and adults with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*; 36: 282-290. DOI: 10.1097/00004583-199702000-00019.
 97. Langen, M.; Durston, S; Kas, M; Van Engeland, H.; Staal, W. 2011. The neurobiology of repetitive behavior: ...and men. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35: 356-365. DOI:10.1016/j.neubiorev.2010.02.005.
 98. Lapuente, F.; Sánchez López, M.; Rabadán Pardo, M. Tema 8. El lóbulo frontal y sus disfunciones: funciones ejecutivas. *Neuropsicología*. Disponible en: ocw.um.es/cc-sociales/neuropsicologia/material.../tema-8.-funciones-ejecutivas.pdf.
 99. Lauritsen, MB.; Pedersen, C; Mortensen, P. 2005. Effects of familial risk factors and place of birth on the risk of autism: a nationwide register-based study. *J Child Psychol Psychiatry* 46 (9):963-971. DOI: 10.1111/j.1469-7610.2004.00391.x.
 100. Leekam, SR.; Uljarevic, M.; Prior, M. 2011. Restricted and Repetitive Behaviors in Autism Spectrum Disorders: A Review of Research in the Last Decade. *Psychol. Bull.* 137 (4): 562-593. DOI: 10.1037/a0023341.
 101. Lepagnol-Bestel, A.; Maussion, G.; Boda, B.; Cardona, A.; Iwayama, Y.; Delezoide, A.; Moalic, J.; Muller, D.; Dean, B.; Yoshikawa, T.; Gorwood, P.; Buxbaum, J.; Ramoz, N.; Simonneau, M. 2008. SLC25A12 expression is associated with neurite outgrowth and is upregulated in the prefrontal cortex of autistic subjects. *Mol. Psychiatry* 13, 385–397. DOI: 10.1038/sj.mp.4002120
 102. Lewis, M.; Kim, SJ. 2009. The pathophysiology of restricted repetitive behavior. *Neurodevelop Disord* 1:114-132. DOI: 10.1007/s11689-009-9019-6.

-
103. Lotter, V. 1966. Epidemiology of autistic conditions in young children. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 1: 124-35. DOI: 10.1007/BF00584048.
104. Lyons, V.; Fitzgerald, Michael. 2007. Asperger (1906–1980) and Kanner (1894–1981), the two pioneers of autism. *J Autism Dev Disord* 37: 2022-2023. DOI: 10.1007/s10803-007-0383-3.
105. Ma, DQ.; Rabionet, R.; Konidari, I.; Jaworski, J.; Cukier, H.; Wright, H.; Abramson, R.; Gilbert, J.; Cuccaro, M.; Pericak-Vance, M.; Martin, E. 2009. Association and Gene–Gene Interaction of SLC6A4 and ITGB3 in Autism. *Am J Med Genet Part B* 153B:477–483. DOI 10.1002/ajmg.b.31003.
106. Macrae, TH. 1997. Tubulin post-translational modifications. Enzymes and their mechanisms of action *Eur. J. Biochem.* 244. 265-278.
107. Matas-Guadix, OB. 2005. Dinámica de la actina y tráfico de membranas asociado al complejo de Golgi: Papel regulador de RhoA, Rac1 y Cdc42. Universitat de Barcelona. Facultat de Medicina. 64p. Disponible en: www.tdx.cat/bitstream/10803/886/9/08.OMG_ANEXOS.pdf.
108. Mattila, P.; Lappalainen, P. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 446-454. DOI:10.1038/nrm2406.
109. Matus, A. 1988. Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Ann. Rev. Neurosci.* 11, 29-44.
110. McKean, PG.; Vaughan, S.; Gull, K. 2001. The extended tubulin superfamily. *J. Cell Sci.* 114: 2723-2733.
111. Miles, JH. 2011. Autism spectrum disorders- A genetics review. *Genet Med.* 13 (4):78-294. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba
112. Miller, EK.; Cohen, JD. 2001. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:167–202. DOI: 10.1146/annurev.neuro.24.1.167.
113. Miller, V.; Gupta, D.; Neu, N.; Cotroneo, A.; Boulay, C.; Seegal, R. 2013. Novel inter-hemispheric white matter connectivity in the BTBR mouse model of autism. *Brain Res.* 1513: 26-33. 10.1016/j.brainres.2013.04.001.
114. Moy, SS.; Nadler, J.; Magnuson, T.; Crawley, J. 2006. Mouse Models of Autism Spectrum Disorders: The Challenge for Behavioral Genetics. *Am J Med Genet C (Semin. Med. Genet.)* 142C:40-51. DOI: 10.1002/ajmg.c.30081.
115. Moy, SS.; Riddick, N.; Nikolova, V.; Teng, B.; Agster, K.; Nonneman, R.; Young, N.; Baker, L.; Nadler, J.; Bodfish, J. 2014. Repetitive behavior profile and supersensitivity to amphetamine in the C58/J mouse model of autism. *Behav. Brain Res.* 259: 200-214. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.10.052.
116. Moy, SS; Nadler, J.; Young, N.; Nonneman, R.; Segall, S.; Andrade, G.; Crawley J.; Magnuson, T. 2008. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behav. Brain Res.* 191:118-129. DOI:10.1016/j.bbr.2008.03.015.
117. Muehlmann, AM.; Edington, G.; Mihalik, AC.; Buchwald, Z; Koppuzha, D.; Korah, M; Lewis, MH. 2012. Further characterization of repetitive behavior in C58 mice: Developmental trajectory and effects of environmental enrichment. *Behav Brain Res.* 235(2): 143-149. DOI:10.1016/j.bbr.2012.07.041.
118. Munson, J.; Dawson, G; Abbott, R; Faja, S; Webb, S; Friedman, S; Shaw, D; Artru, A; Dager, S. 2006. Amygdalar Volume and Behavioral Development in Autism. *Arch Gen Psychiatry* 63:686-693. DOI: 10.1001/archpsyc.63.6.686.
119. Nacewicz, BM.; Dalton, K; Johnstone, T; Long, M; McAuliff, E; Oakes, T; Alexander, A; Davidson, R. 2006. Amygdala Volume and Nonverbal Social Impairment in Adolescent and Adult Males With Autism. *Arch Gen Psychiatry* 63:1417-1428. DOI: 10.1001/archpsyc.63.12.1417.
120. National Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov.

-
121. Newey, SE.; Velamoor, V.; Govek, E.E.; Van Aelst, L. 2005. Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J. Neurobiol.* 64, 58-74. DOI: 10.1002/neu.20153.
122. Ouellette-Kuntz H.; Coo, H.; Yu, CT.; Chudley, AE.; Noonan, A.; Breitenbach, M.; Ramji, N.; Prosick, T.; Bedard, A.; Holden, J. 2006. Prevalence of pervasive developmental disorders in two Canadian providences. *J Policy Pract Intellect Disabil* 3(3):164–172. DOI: 10.1111/j.1741-1130.2006.00076.x.
123. Pagnamenta, A.; Khan, H.; Walker, S.; Gerrelli, D.; Wing, K.; Bonaglia, M.; Giorda, R.; Berney, T.; Mani, E.; Molteni, M.; Pinto, D.; Le Couteur, A.; Hallmayer, J.; Sutcliffe, J.; Szatmari, P.; Paterson, A.; Scherer, S.; Vieland, V.; Monaco, A. 2011. Rare familial 16q21 microdeletions under a linkage peak implicate cadherin 8 (CDH8) in susceptibility to autism and learning disability. *J Med Genet* 48:48-54. DOI:10.1136/jmg.2010.079426.
124. Palmen, SJ.; Van Engeland, H.; Hof, P.; Schmitz, C. 2004. Neuropathological findings in autism. *Brain* 127:2572–2583. DOI:10.1093/brain/awh287.
125. Peça, J.; Feliciano, C.; Ting, J.; Wang, W.; Wells, M.; Venkatraman, T.; Lascola, C.; Fu, Z.; Feng, G. 2011. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472: 437-446. DOI:10.1038/nature09965.
126. Persico, AM.; Napolionia, V. 2013. Autism genetics. *Behav. Brain Res.* 251: 95-112. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.06.012.
127. Pierce, K.; Muller, RA.; Ambrose, J.; Allen, G.; Courchesne, E. 2001. Face processing occurs outside the fusiform “face area” in autism: Evidence from functional MRI. *Brain* 124:2059-2073. DOI: 10.1093/brain/124.10.2059.
128. Pisula, E.; Ziegart-Sadowska, K. 2015. Broader Autism Phenotype in Siblings of Children with ASD - A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 13217-13258; DOI:10.3390/ijms160613217.
129. Piven J.; Arndt S.; Bailey J.; Haverkamp S.; Andreasen NC.; Palmer P. 1995. An MRI study of brain size in autism. *Am J Psychiatry* 152:1145-1149. DOI: 10.1176/ajp.152.8.1145.
130. Purves; A.; Fitzpatrick; Hall; LaMantia; McNamara; Williams, 2007. *Neurociencia*. 3era Edición. Buenos Aires: Médica Panamericana. 891p.
131. Raymond, GV.; Bauman, M; Kemper, T. 1996. Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathol* 91:117–119. DOI: 10.1007/s004010050401.
132. Robinson-Agramonte, MA. 2015. *Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder*. Suiza: Springer International Publishing. 222p. DOI 10.1007/978-3-319-16321-5.
133. Ryan, BC.; Young, N.; Crawley, J.; Bodfish, J.; Moy, S. 2010. Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain. *Behav. Brain Res.* 208:178-188. DOI:10.1016/j.bbr.2009.11.031.
134. Saemundsen, E.; Magnusson, P.; Georgsdóttir, I.; Egilsson, E.; Rafnsson, V. 2013. Prevalence of autism spectrum disorders in an Icelandic birth cohort. *BMJ Open* 3(6). DOI:10.1136/bmjopen- 2013-002748.
135. Samaco, RC.; Hogart, A.; LaSalle, J. 2005. Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum. Mol. Gen.* 14 (4): 483-492. DOI:10.1093/hmg/ddi045.
136. Sánchez, C.; Díaz-Nido, J.; Ávila, J. 1995. Variations in in vivo phosphorylation at the proline-rich domain of the microtubule-associated protein 2 (MAP2) during rat brain development. *Biochem. J.* 306: 481-487.
137. Schaafsma, SM.; Pfaff, Donald W. 2014. Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. *Front Neuroendocrinol.* 35: 255–27. DOI: 10.1016/j.yfrne.2014.03.006.

-
138. Schumann, CM; Hamstra, J.; Goodlin-Jones, B.; Lotspeich, L.; Kwon, H.; Buonocore, M.; Lammers, C.; Reiss, A.; Amaral, D. 2004. The Amygdala Is Enlarged in Children But Not Adolescents with Autism; the Hippocampus Is Enlarged at All Ages. *J. Neurosci.* 24(28):6392-6401. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1297-04.2004.
139. Secretaría de Salud. 2015. Boletín Epidemiológico. México. 32(12). 1-60. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>.
140. Shahania, N.; Brandt, R. 2002. Functions and malfunctions of the tau proteins. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1668–1680.
141. Shafit-Zagardo, B.; Kalcheva, N., Dickson; D., Davies, P.; Kress, Y. 1997: Distribution and subcellular localization of high molecular weight microtubule-associated protein-2 expressing exon 8 in brain and spinal cord. *J. Neurochem.* 68:862-873.
142. Sharma, JR; Arieff, Z.; Gameeldien, H.; Davids, M.; Kaur, M.; Van der Merwe, L. 2013. Association Analysis of Two Single-Nucleotide Polymorphisms of the RELN Gene with Autism in the South African Population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 17 (2):93-98. DOI: 10.1089/gtmb.2012.0212.
143. Sheng, M.; Hoogenraad, CC. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823-847. DOI: 10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029.
144. Silk, T.; Rinehart, N.; Bradshaw, J.; Tonge, B.; Egan, G.; O'Boyle, M.; Cunnington, R. 2006. Visuospatial Processing and the Function of Prefrontal-Parietal Networks in Autism Spectrum Disorders: A Functional MRI Study. *Am J Psychiatry.* 163:1440–1443.
145. Silverman, JL.; Smith, D.; Sukoff Rizzo, S.; Karras, M.; Turner, S.; Tolú, S., Bryce, D.; Smith, D.; Fonseca, K.; Ring, R.; Crawley, J. 2012. Negative Allosteric Modulation of the mGluR5 Receptor Reduces Repetitive Behaviors and Rescues Social Deficits in Mouse Models of Autism. *Sci. Transl. Med* 4 (131ra51):1-11. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003501.
146. Silverman, JL.; Yang, M.; Lord, C.; Crawley, J. 2010. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat. Rev. Neurosci.* 11: 490-502. DOI:10.1038/nrn2851.
147. Snell RS. 2007. *Neuroanatomía Clínica*. 6ta Edición. Madrid: Médica Panamericana. 572p.
148. Squire, L.; Berg, D.; Bloom, F.; du-Lac, S.; Ghosh, A.; Spitzer, N. 2008. *Fundamental neuroscience*. 3ra Edición. Canadá: Elsevier Inc. 1255p.
149. Tanaka, EM.; Kirschner, M. 1991. Microtubule behaviour in the growth cones of living cells during axon elongation. *J. Cell Biol.* 115, 345-363.
150. Teng, BL.; Nonneman, R.; Agster, K.; Nikolova, V.; Davis, T.; Riddick, N.; Baker, L.; Pedersen, C.; Jarstfer, M.; Moy, S. 2013. Prosocial effects of oxytocin in two mouse models of autism spectrum disorders. *Neuropharmacology* 72: 187-196. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.038.
151. The British Neuroscience Association. 2003. *Neuroscience: the Science of the Brain*. Liverpool. 60p. Versión en línea: https://www.bna.org.uk/static/docs/BNA_English.pdf.
152. The Jackson Laboratory. Disponible en: <https://www.jax.org/strain/000669>.
153. Treves, A.; Rolls, E. 1994 Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus* 4 (3):374-391. DOI:10.1002/hipo.450040319
154. Trottier, G.; Srivastava, Lalit; Walker, CD. 1999. Etiology of infantile autism: a review of recent advances in genetic and neurobiological research. *J. Psychiatry Neurosci.* 24 (2):103-115.

-
155. Turner KC.; Frost L.; Linsenbardt D.; McIlroy JR.; Muller RA. 2006. Atypically diffuse functional connectivity between caudate nuclei and cerebral cortex in autism. *Behav Brain Funct.* 2:34. DOI: 10.1186/1744-9081-2-34.
156. Walker, S.; Scherer, S. 2013. Identification of candidate intergenic risk loci in autism spectrum disorder. *BMC Genomics* 2013, 14:499. DOI: 10.1186/1471-2164-14-499.
157. Wang, L. ; Jia, M.; Yue, W.; Tang, F.; Qu, M.; Ruan, Y.; Lu, T.; Zhang, H.; Yan, H.; Liu, J.; Guo, Y.; Zhang, J; Yang, X.; Zhang, D. 2008. Association of the ENGRAILED 2 (EN2) Gene With Autism in Chinese Han Population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 147B:434-438. DOI: 10.1002/ajmg.b.30623.
158. Wegiel, J.; Kuchna, I.; Nowicki, K.; Imaki, H.; Wegiel, J., Marchi, E.; Yong Ma, S.; Chauhan, A.; Chauhan, V.; Bobrowicz, T.; De Leon, M.; Saint Louis, L.; Cohen, I.; London, E.; Brown, W.; Wisniewski, T. 2010. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol.* 119:755-770 DOI: 10.1007/s00401-010-0655-4.
159. World Health Organization. 2013. Autism spectrum disorders & other developmental disorders. From raising awareness to building capacity. Meeting Report. Geneva, Switzerland. 1-40.
160. Zilbovicius, M.; Garreau, B.; Samson, Y.; Remy, P.; Barthélémy, C.; Syrota, A.; Lelord, G. 1995. Delayed maturation of the frontal cortex in childhood autism. *Am J Psychiatry* 1995; 152:248-252. DOI: 10.1176/ajp.152.2.248.

Apéndice.

Tabla i. Clasificación del autismo en diferentes ediciones del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales.

DSM-III 1987	DSM-IV 1994	DSM-V 2014
<u>Trastornos generalizados del desarrollo</u>	<u>Trastornos generalizados del desarrollo</u>	<u>Trastornos del neurodesarrollo</u>
-Trastorno autista	-Trastorno autista	-Discapacidad intelectual
-Trastorno generalizado del desarrollo	-Trastorno de Rett	-Trastornos de la comunicación
	-Trastorno desintegrativo infantil	-Trastorno del espectro autista:
	-Trastorno de Asperger	<i>*Trastorno autista</i>
	-Trastorno generalizado del desarrollo no especificado	<i>*Síndrome de Asperger</i>
		<i>*Trastorno desintegrativo de la infancia</i>
		<i>*Trastorno generalizado del desarrollo no especificado</i>
		-Trastorno por déficit de atención/hiperactividad
		-Trastorno específico del aprendizaje
		-Trastornos motores

Nota: En el DSM-V sólo se hace mención del síndrome de Rett en el apartado de diagnóstico diferencial del TEA.

Referencias.

- *American Psychiatric Association. 2014. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-V. 5ta Edición. México: Médica Panamericana.
- *American Psychiatric Association. 1994. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-IV. 4ta Edición. Barcelona: Masson.
- *American Psychiatric Association. 1987. Diagnostical and Statistical Manual of Mental Disorders-Revised. DSM-III-R. 3ra Edición Revisada. Washington, DC: American Psychiatric Association.
