



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO CEREBRAL Y SÉRICO DE PROTEÍNAS
PROINFLAMATORIAS EN UNA CEPA MURINA CON FENOTIPO AUTISTA
DURANTE EL DESARROLLO.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BIÓL. JUAN FRANCISCO DUARTE CAMPOS

TUTOR PRINCIPAL
DRA. ALIESHA A. GONZÁLEZ ARENAS
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. ANAHÍ CHAVARRÍA KRAUSER
Facultad de Medicina, UNAM

DRA. GOHAR GEVORGYAN
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México. Noviembre, 2022



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.



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

***A mi padre, Luis Raúl Duarte,
gracias por todo.***

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca nacional para estudios de posgrado (CVU 1082612) durante mi estancia en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímica de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Marisol de la Fuente Granada (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), a la M. en C. Sandra Vázquez Guzmán (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) y al Q.F.B. Ricardo Jair Ramírez Carreto (Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM) por su apoyo técnico a lo largo de la realización de este proyecto.

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

A la Dra. Aliesha A. González Arenas (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), tutora principal de este trabajo de tesis, por su constante supervisión y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

A mi comité tutor conformado por la Dra. Anahí Chavarría Krauser (Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM) y la Dra. Gohar Gevorgyan (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por sus valiosos comentarios y orientación para el enriquecimiento del proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico brindado para la asistencia a Congresos.

Índice

I.	LISTA DE FIGURAS.....	I
II.	LISTA DE TABLAS.....	II
III.	ABREVIATURAS	III
1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	1
4.	ANTECEDENTES	3
4.1	TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA).....	3
4.1.1	<i>Definición</i>	3
4.1.2	<i>Diagnóstico</i>	4
4.1.3	<i>Epidemiología.....</i>	5
4.1.4	<i>Etiología.....</i>	6
4.2	HIPOCAMPO.....	7
4.2.1	<i>Anatomía y estructura histológica.....</i>	7
4.2.2	<i>Funciones del hipocampo.....</i>	9
4.2.3.	<i>Alteraciones hipocampales asociadas al TEA.....</i>	11
4.3	POBLACIONES DE CÉLULAS INMUNOLÓGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	12
4.3.1.	<i>Células de origen mieloide</i>	12
4.3.1.1	<i>Microglía.....</i>	14
4.3.1.2	<i>Macrófagos perivascuales (PVM)</i>	18
4.3.1.3	<i>Macrófagos menínges (MGM).....</i>	19
4.3.1.4	<i>Macrófagos de los plexos coroideos (ChPM).....</i>	19
4.3.1.5	<i>Células dendríticas (DC)</i>	19
4.4	ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS ASOCIADAS AL TEA.....	20
4.4.1	<i>Neuroinflamación</i>	21
4.4.2	<i>Alteraciones de la microglía asociadas al TEA.....</i>	23
4.5	MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL TEA	24
4.5.1	<i>Alteraciones neuroinmunológicas en modelos murinos para el estudio del TEA.....</i>	25
4.5.2	<i>La cepa murina C58/J como modelo de estudio para el TEA.....</i>	27
5.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
6.	HIPÓTESIS.....	29
7.	OBJETIVOS.....	29
	OBJETIVO GENERAL	29
	OBJETIVOS PARTICULARES	29
8.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	29
8.1	ANIMALES	29
8.2	OBTENCIÓN DE TEJIDOS FRESCOS Y DE SUERO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS Y DE PROTEÍNAS PROINFLAMATORIAS	30
8.2.1	<i>ELISA</i>	30
8.2.2	<i>Electroforesis en gel y Western blot.....</i>	31

8.3	ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO EN LA CEPA C58/J	32
9.	RESULTADOS	33
9.1	MEDICIÓN DE LA MASA CEREBRAL DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN CEREBROS TOTALES DE FETOS Y EN EL SUERO DE HEMBRAS GESTANTES EN EL E18	33
9.2	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LAS ENZIMAS iNOS Y ARG1 EN CEREBROS TOTALES DE FETOS EN EL E18	35
9.3	CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN EL HIPOCAMPO Y EN EL SUERO DE LOS RATONES ADULTOS ..	36
9.4	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LAS ENZIMAS iNOS Y ARG1 EN EL HIPOCAMPO DE LOS RATONES CON FENOTIPO AUTISTA	38
9.5	LA CEPA MURINA C58/J CON FENOTIPO AUTISTA PRESENTA POLIMORFISMOS EN GENES RELEVANTES PARA LA IDENTIDAD DE LA MICROGLÍA Y LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA	39
10.	DISCUSIÓN	45
	LA CEPA MURINA C58/J CON FENOTIPO AUTISTA MUESTRA CAMBIOS EN LA MASA CEREBRAL A LO LARGO DEL DESARROLLO	45
	LOS RATONES MACHO ADULTOS DE LA CEPA C58/J CON FENOTIPO AUTISTA TIENEN UN CONTENIDO AUMENTADO DE IFN- γ Y MCP-1 EN EL HIPOCAMPO, CON UNA TENDENCIA DE TNF-A A AUMENTAR	46
	LOS RATONES DE LA CEPA MURINA C58/J CON FENOTIPO AUTISTA PRESENTAN UNA DISMINUCIÓN EN EL CONTENIDO CEREBRAL DE TNF-A E IFN- γ EN EL E18	50
	LAS HEMBRAS GESTANTES DE LA CEPA MURINA C58/J PRESENTAN UN AUMENTO EN EL CONTENIDO SÉRICO DE IFN- γ	52
	TNF-A MUESTRA UNA TENDENCIA A AUMENTAR EN EL SUERO DE RATONES MACHO ADULTOS DE LA CEPA C58/J	53
	LA CEPA C58/J PRESENTA SNPs EN GENES RELEVANTES PARA LA IDENTIDAD DE LA MICROGLÍA Y LA RESPUESTA INMUNE	54
11.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	56
12.	CONCLUSIONES	57
	CONCLUSIÓN GENERAL	57
	CONCLUSIONES PARTICULARES	57
13.	PERSPECTIVAS	58
14.	REFERENCIAS.....	59
IV.	ANEXOS.....	82

I. Lista de figuras

- Figura 1.** Ubicación anatómica e histología del hipocampo en humanos y en ratones.
- Figura 2.** Principales conexiones intrínsecas en el hipocampo.
- Figura 3.** Localización de las principales poblaciones de células mieloides en el sistema nervioso central.
- Figura 4.** Patrones de migración de la microglía hacia el SNC durante el desarrollo.
- Figura 5.** Marcadores proteicos asociados a los perfiles M1/M2 de la microglía
- Figura 6.** Los ratones con fenotipo autista muestran un aumento en la masa cerebral y una disminución en el contenido de TNF- α e IFN- γ en el E18
- Figura 7.** Las hembras gestantes con fenotipo autista presentan alteraciones sistémicas en el contenido de citocinas proinflamatorias en el E18.
- Figura 8.** Cuantificación del contenido de las enzimas iNOS y ARG1 en cerebros totales de ratones con fenotipo autista en el E18.
- Figura 9.** Los ratones macho adultos de la cepa C58/J presentan una disminución de la masa cerebral, y aumento en el contenido hipocampal de IFN- γ y MCP-1, y una tendencia al aumento de TNF- α .
- Figura 10.** Los ratones con fenotipo autista muestran una tendencia al aumento en el contenido sérico de TNF- α .
- Figura 11.** Los ratones con fenotipo autista presentan una disminución en el contenido hipocampal de la enzima antiinflamatoria ARG1.
- Figura 12.** Análisis de enriquecimiento GO de los genes relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmune con SNPs en la cepa C58/J.
- Anexo II** Cuantificación de IFN- γ , TNF- α y MCP-1 en los cerebros totales de fetos en el E18 y en el hipocampo de ratones macho adultos de ambas cepas utilizando la cantidad (mg) de proteína para normalizar el contenido de citocinas.

II. Lista de tablas

- Tabla 1.** Criterios diagnósticos para los trastornos del espectro autista (TEA) especificados por la Asociación Americana de Psiquiatría.
- Tabla 2.** Cambios en el contenido de factores solubles pro- y antiinflamatorios en el SNC y en el suero de sujetos con TEA.
- Tabla 3.** Análisis de enriquecimiento de genes con polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en la cepa C58/J que son relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmunitaria.
- Anexo I** Lista de anticuerpos utilizados.
- Anexo III** Lista de polimorfismos de nucleótido único identificados en genes relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmunitaria a partir del conjunto de datos Sanger4 (MPD:388).

III. Abreviaturas

ANKD11	Proteína con dominios repetidos de anquirina 11 (<i>Ankyrin repeat domain-containing protein 11</i>)
APA	Asociación estadounidense de psiquiatría (<i>American Psychiatric Association</i>)
APC	Célula presentadora de antígenos (<i>Antigen-presenting cell</i>)
ApoE	Apolipoproteína E
ARG1	Arginasa 1 (<i>Arginase 1</i>)
BAM	Macrófagos asociados a los bordes (<i>Border-associated macrophages</i>)
BCL-2	Linfoma de células B 2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
BHE	Barrera hematoencefálica
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CE	Corteza entorrinal
ChPM	Macrófagos de los plexos coroideos (<i>Choroid plexus macrophages</i>)
CNTNAP2	Proteína tipo 2 asociada a contactina (<i>Contactin Associated Protein 2</i>)
CPF	Corteza prefrontal
CRMP1/2	Proteínas mediadoras de la respuesta a la colapsina 1/2 (<i>Collapsin Response Mediator Proteins 1/2</i>)
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DC	Células dendríticas (<i>Dendritic cells</i>)
DCX	Doblecortina (<i>Doublecortin</i>)
DIV	Día <i>in vitro</i>
E	Día embrionario
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
GAD	Guanina desaminasa (<i>Guanine deaminase</i>)
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar (<i>Glial fibrillar acidic protein</i>)
hiPSC	Células troncales pluripotentes inducidas de humanos (<i>human induced Pluripotent Stem Cells</i>)
IFN-γ	Interferón gamma (<i>Interferon gamma</i>)
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1 (<i>Insulin-like growth factor 1</i>)
IL	Interleucina (<i>Interleukin</i>)
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (<i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
IRF (1-9)	Factores reguladores de interferón (<i>Interferon regulatory factors</i>)
ISRE	Elementos de respuesta a la estimulación por interferón (<i>Interferon-stimulated response elements</i>)
JAK1	Cinasa Janus 1 (<i>Janus kinase 1</i>)
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal (<i>Jun N-Terminal Kinase</i>)
KO	<i>Knockout</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LRP1	Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>)
LTP	Potenciación a largo plazo (<i>Long-term potentiation</i>)
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>)
MBP	Proteína básica de la mielina (<i>Myelin basic protein</i>)
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1

	(<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>)
MCPIP1	Proteína 1 inducida por la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (<i>Monocyte chemotactic protein-1-induced protein-1</i>)
MGM	Macrófagos meníngeos (<i>Meningeal macrophages</i>)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MIA	Activación inmune materna (<i>Maternal immune activation</i>)
NF1	Neurofibromina 1 (<i>Neurofibromin 1</i>)
NF-κB	Factor nuclear kappa B (<i>Nuclear factor-kappa B</i>)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve growth factor</i>)
NK	<i>Natural killer</i>
NPC	Célula progenitora neural (<i>Neural progenitor cell</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
Para	Parasubículo
PET	Tomografía de emisión de positrones (<i>Positron-emission tomography</i>)
Poli-I:C	Ácido poliinosínico-policitidílico (<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>)
Pre	Presubículo
PVM	Macrófagos perivascuales (<i>Perivascular macrophages</i>)
S1P1	Receptor a esfingosina-1-fosfato (<i>Sphingosine 1-phosphate receptor 1</i>)
SHH	Sonic hedgehog
sl	<i>Stratum lacunosum</i>
slm	<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (<i>Single nucleotide polymorphisms</i>)
so	<i>Stratum oriens</i>
sp	<i>Stratum pyramidale</i>
sr	<i>Stratum radiatum</i>
STAT1	Factor transductor de señales y activador de la transcripción 1 (<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>)
Sub	Subículo
TEA	Trastorno del espectro autista
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-beta (<i>Transforming growth factor-beta</i>)
TLR	Receptor tipo toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TM9SF4	Proteína 4 de la superfamilia de 9 dominios transmembranales (<i>Transmembrane 9 superfamily member 4</i>)
TNFR1/2	Receptor a factor de necrosis tumoral 1/2 (<i>Tumor necrosis factor receptor 1/2</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa (<i>Tumor necrosis factor-alfa</i>)
VPA	Ácido valproico (<i>Valproic acid</i>)

1. Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA) es un conjunto de alteraciones del neurodesarrollo cuya etiología es multifactorial. En estos trastornos se conocen una variedad de rasgos neurobiológicos entre los que destaca una respuesta inmune exacerbada. No obstante, la relación entre estos cambios en la activación inmune y las alteraciones neuronales sigue sin ser descrita en su totalidad.

La cepa murina endogámica C58/J ha sido validada como un modelo de autismo idiopático que presenta una disminución en la preferencia social, conductas repetitivas y deficiencias en la memoria. Nuestro laboratorio previamente ha descrito que los ratones macho de diez semanas de edad de esta cepa en la región CA1 del hipocampo, además de un aumento en la densidad de la microglía en la misma área, indicando una posible relación entre un estado neuroinflamatorio y los cambios neuronales y conductuales observados en la cepa.

Para determinar un posible perfil inflamatorio, cuantificamos el contenido de la quimiocina MCP-1, así como de las citocinas proinflamatorias TNF- α IFN- γ en el hipocampo y en el suero de ratones macho adultos de la cepa C58/J y los comparamos con una cepa neurotípica (C57BL/6J). Para analizar posibles cambios en la polarización de la respuesta inmune determinamos el contenido de las enzimas óxido nítrico sintasa (iNOS) y arginasa 1 (ARG1) en la misma región. También, analizamos el contenido de estas mismas citocinas y enzimas en los cerebros totales de fetos en el día 18 embrionario (E18). Adicionalmente, determinamos el contenido sérico de TNF- α y de IFN- γ en el suero de las hembras gestantes en el E18.

Obtuvimos mediciones de la masa cerebral en ambas edades analizadas y observamos que existe un aumento de la masa cerebral en los fetos de la cepa C58/J en el E18, con un posterior descenso de ésta durante la etapa adulta, señalando la presencia de alteraciones en la trayectoria del desarrollo cerebral de la cepa con fenotipo autista. Observamos que existe un aumento basal en el contenido hipocampal de IFN- γ y de MCP-1, y una marcada tendencia de TNF- α a aumentar en los ratones macho adultos de la cepa C58/J; además de un menor contenido de la enzima ARG1 en esta misma región. De forma interesante, observamos que los fetos de la cepa C58/J presentan basalmente una reducción en el contenido de TNF- α y de IFN- γ en el cerebro total al E18. Por su parte, las hembras mostraron un aumento en el contenido sérico de IFN- γ , mientras que los machos adultos mostraron sólo una tendencia de TNF- α en suero a aumentar.

En conclusión, encontramos que existe una alteración en la trayectoria del desarrollo cerebral de los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista que podría relacionarse con la disminución en el contenido de TNF- α y de IFN- γ en el cerebro durante la etapa embrionaria en el E18 debido a las funciones que éstas cumplen durante el desarrollo. Más aún, confirmamos la presencia de un contenido aumentado de la citocina IFN- γ y de la quimiocina MCP-1 en el hipocampo de los ratones macho adultos de esta cepa, señalando una posible relación entre la expresión de estos mediadores inmunológicos y las alteraciones gliales que hemos observado, ofreciendo una vía posible adicional para explicar los cambios dendríticos y sinápticos reportados previamente en estos ratones.

2. Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) refers to a set of neurodevelopmental alterations with a highly complex etiology. A wide arrange of neurobiological traits have been identified in these disorders, including an overactive immune response. However, the relation between these changes in immunological activation and the observed neuronal impairments has not been fully elucidated.

The endogamic C58/J mouse strain has now been validated as a phenotypical animal model of ASD that displays a low social preference, along with repetitive behaviors and memory impairments. Our laboratory has previously reported that 10-week-old male mice of this strain have fewer dendritic spines with a mature-like morphology in the CA1 hippocampal region, besides an increase in the microglial density in the same region, indicating a likely relation between a neuroinflammatory state and the neuronal abnormalities observed in these mice.

To determine a neuroinflammatory profile, we quantified the content of chemokine MCP-1, along with the proinflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ in the hippocampi and the sera of adult male mice of the C58/J strain and we compared them to those of neurotypical mice (C57BL/6J). To analyze possible changes in immune polarization, we determined the content of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase 1 (ARG1) in the same region. Likewise, we analyzed the content of these cytokines and enzymes in the total brains of pups in the embryonic day 18 (E18). Additionally, we determined the serum content of TNF- α and IFN- γ in pregnant dams of both strains on E18.

We obtained brain weight measurements of mice from both developmental stages analyzed here and we observed there is an increase of brain mass in the C58/J pups on E18, compared to a neurotypical strain, with a later decrease of this parameter in the adult stage, indicating an altered developmental trajectory regarding brain mass in autistic-like mice. We observed a basal increase in the hippocampal content of IFN- γ and MCP1, with a marked trend of TNF- α to increase in adult male mice of the C58/J strain; besides a decreased content of ARG1 in this same region, without changes in the content of iNOS. Interestingly, we observed that embryos of the C58/J strain show basally a reduced brain content of both TNF- α and IFN- γ on E18. Furthermore, pregnant dams showed an increased serum content of IFN- γ , while adult male mice showed only a trend of serum TNF- α to increase.

In conclusion, we found there is an altered developmental brain trajectory in mice of the C58/J autistic-like strain, which could be related to a decreased brain content of TNF- α and IFN- γ in the embryonic stage due to their different functions during development. Moreover, we confirmed the presence of an augmented content of IFN- γ and MCP-1 in the hippocampi of adult male mice of this strain, pointing toward a possible relation between the expression of these immunological mediators and the glial alterations we have observed, further offering an alternative pathway to explain the dendritic and synaptic impairments previously reported in this strain.

3. Introducción

El trastorno del espectro autista (TEA) se refiere a un grupo de trastornos del neurodesarrollo en humanos que se detectan durante los primeros años de vida y persisten hasta la etapa adulta de los individuos. Estos se caracterizan por deficiencias en la comunicación social y verbal que se manifiestan a través de distintos contextos, así como por la presencia de conductas repetitivas y de intereses restringidos (American Psychiatric Association, 2013). La prevalencia de estos trastornos se encuentra entre 1-2% de la población a nivel mundial (Chiarotti & Venerosi, 2020; Fombonne, 2009), la cual ha crecido sostenidamente en las últimas décadas (Matson & Kozlowski, 2011; Wing & Potter, 2002).

La etiología del TEA es compleja y multifactorial, pues se han asociado a él tanto factores de riesgo genéticos como factores de riesgo ambientales (Deng et al., 2015; Lord et al., 2020). Las observaciones en gemelos monocigóticos con autismo señalan una concordancia del 60-92% para esta condición cuando uno de los dos gemelos lo presenta; mientras que, en gemelos dicigóticos, este factor se reduce a tan sólo el 0-10% (Colvert et al., 2015; Le Couteur et al., 1995; Lichtenstein et al., 2010). Asimismo, la tasa de ocurrencia para hermanos, cuando alguno de ellos presenta el trastorno, es del 12.9% (Sandin et al., 2014), siendo en los tres casos más alta que la prevalencia global estimada, sugiriendo fuertes implicaciones genéticas.

Sobre los factores ambientales se ha propuesto que la exposición prenatal a metales pesados (Arora et al., 2017) o a fármacos teratógenos como el ácido valproico (Nicolini & Fahnstock, 2018), la presencia de contaminantes en el aire (Becerra et al., 2013; Kalkbrenner et al., 2015) o infecciones durante los dos primeros trimestres del embarazo (Atladóttir et al., 2010), podrían asociarse con un riesgo aumentado de presentar TEA. En cuanto a este último factor, se ha especulado que la activación inmune materna (MIA) durante la gestación podría jugar un papel importante en la aparición del TEA (Patterson, 2011), pues también existen anticuerpos dirigidos contra epítomos del sistema nervioso central (SNC), como las proteínas mediadoras de la respuesta a la colapsina 1/2 (CRMP1/2), la guanina desaminasa (GDA) y la proteína de unión a microtúbulos 2 (MAP2), en el plasma de madres de sujetos con TEA (Abou-Donia et al., 2019; Ramirez-Celis et al., 2021); así como en el plasma de infantes con TEA, dirigidos contra epítomos del SNC como la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteína doblecortina (DCX) (Abou-Donia et al., 2019; Mazur-Kolecka et al., 2014). Todo lo anterior señala que una posible desregulación de los componentes inmunológicos puede estar presente en individuos con TEA desde la etapa prenatal y persistir hasta las etapas tempranas de la infancia.

Más aún, existen alteraciones en las funciones celulares del sistema inmunológico de los sujetos con TEA, tales como respuestas de activación atípicas y cambios en las subpoblaciones de linfocitos T (Ashwood, Krakowiak, et al., 2011a; Denney et al., 1996), aumento del número de

linfocitos T CD8+ y linfocitos B en sangre (López-Cacho et al., 2016), cambios en la expresión de genes y en la activación de linfocitos *natural killer* (NK) (Enstrom et al., 2009; López-Cacho et al., 2016), aumento de monocitos circulantes en sangre (Sweeten et al., 2003) y alteración en la secreción de citocinas por parte de monocitos estimulados mediante diversos receptores tipo Toll (TLR) (Enstrom et al., 2010), mostrando una posible relación entre una respuesta inmune exacerbada en los sujetos con TEA y la aparición de los cambios neuronales/conductuales observados.

Estudios *post mortem* en cerebros de individuos con TEA han demostrado la presencia de un extenso proceso neuroinflamatorio observado a través de un aumento en la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), asociado a microglía reactiva, y un aumento en el contenido de las citocinas interleucina (IL)-1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF- α), interferón-gamma (IFN- γ), factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF- β 1), entre otras; además de un aumento en el contenido de las quimiocinas: proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), IL-8 y eotaxina en diferentes regiones del SNC (Chez et al., 2007; Li et al., 2009; Vargas et al., 2005). Estudios posteriores han reportado que existen alteraciones en la densidad de la microglía en regiones del SNC de individuos con TEA que incluyen a la corteza prefrontal (CPF) dorsolateral y a las cortezas frontoinsular y visual (Morgan et al., 2010; Tetreault et al., 2012), así como alteraciones morfológicas que sugieren estados anómalos de reactividad celular (Lee et al., 2017; Morgan et al., 2010), señalando en conjunto una fuerte relación entre los fenómenos de activación inmune y el TEA. No obstante, la relación que existe entre los efectores celulares y moleculares del sistema inmune en el cerebro y las funciones neuronales en el contexto del TEA apenas comienza a ser dilucidado.

La cepa murina endogámica C58/J ha sido propuesta como un modelo animal para el estudio del autismo idiopático pues presenta una baja preferencia social, conductas repetitivas y alteraciones en la memoria y el aprendizaje (Blick et al., 2015; Ryan et al., 2010), además de polimorfismos de nucleótido único (SNP) en genes cuyos ortólogos en humanos han sido asociados con un riesgo aumentado de presentar TEA, tales como neurofibromina 1 (NF1) o la proteína tipo 2 asociada a contactina (CNTNAP2) (Barón-Mendoza et al., 2021; Moy et al., 2014).

Estudios realizados en nuestro laboratorio hallaron que los ratones macho adultos de la cepa C58/J presentan una reducción en la complejidad del árbol dendrítico de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (Barón-Mendoza et al., 2019), además de una reducción en la proporción de espinas dendríticas con fenotipo maduro en esa región (Barón-Mendoza et al., 2021). De forma interesante, hemos observado que existe un aumento en la densidad de la microglía en la misma región del hipocampo, además de cambios en los tipos morfológicos que presenta (Duarte-Campos, en preparación), señalando alteraciones en los procesos que regulan la activación y, posiblemente, la migración de esta población celular en los ratones con fenotipo

autista, sin embargo, resta por evaluar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen estos cambios.

Debido a todo lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo analizar la presencia de un proceso neuroinflamatorio en la cepa C58/J con fenotipo autista a través de determinar el contenido basal de la quimiocina MCP-1, así como de TNF- α y de IFN- γ , dos citocinas cuya elevación en el SNC de individuos con TEA ha sido consistentemente reportada (Matta et al., 2019), en el hipocampo de ratones macho adultos, comparándolos con una cepa control. Adicionalmente, como una forma inicial de determinar diferencias en la polarización de la respuesta inmune en los cerebros de estos ratones, evaluamos el contenido de las enzimas óxido nítrico inducible (iNOS) y arginasa 1 (ARG1). Además, dada la naturaleza del desarrollo del TEA, optamos por evaluar estos mismos marcadores en los cerebros totales de fetos en el día embrionario 18 (E18). Igualmente, con el fin de describir alteraciones periféricas en la respuesta inmune de estos ratones, evaluamos el contenido de TNF- α y de IFN- γ en el suero de los ratones macho adultos y de las hembras gestantes en el E18.

4. Antecedentes

4.1 Trastornos del Espectro Autista (TEA)

4.1.1 Definición

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

El TEA comprende un amplio rango de trastornos del desarrollo, los cuales incluyen el trastorno autismo, síndrome de Asperger, síndrome de Rett, trastorno desintegrativo infantil, y el trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otra manera (Dawson & Toth, 2015; National Collaborating Centre for Women's and Children's Health, 2011; Phetrasuwan, Miles, Mesibov, & Robinson, 2009). Estas afecciones son heterogéneas en sus manifestaciones clínicas, pero se encuentran relacionadas entre sí por la ocurrencia de déficits cualitativos en la conducta social y la comunicación; difiriendo, sin embargo, en el grado de penetrancia, severidad y edad de inicio (Lord et al., 2000).

4.1.2 Diagnóstico

La Asociación Estadounidense de Psiquiatría (APA) ha determinado cinco criterios diagnósticos para el TEA en el DSM-V (APA, 2013). Estos criterios se enlistan alfabéticamente de la A a la E y se basan en marcadores conductuales específicos. Estos criterios se muestran en la tabla 1, junto con algunas de las características que ayudan a su identificación.

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

	Criterio	Características
A	Déficits persistentes en la comunicación e interacción sociales a través de múltiples contextos.	Déficits en la reciprocidad social. Déficits en los comportamientos comunicativos no verbales usados para la interacción social. Déficits para desarrollar, mantener y entender relaciones interpersonales.
B	Conductas, intereses o actividades restringidas y repetitivas.	Uso de objetos, habla y motilidad estereotipados o repetitivos. Insistencia en la monotonía, apego inflexible a las rutinas o conductas verbales y no verbales ritualizadas. Intereses altamente restringidos y fijos, anormales en intensidad o en foco. Hiper- o hiporreactividad a estímulos sensoriales o interés inusual por los aspectos sensoriales del ambiente.
C	Los síntomas deben estar presentes en un periodo del desarrollo temprano.	
D	Los síntomas causan significativas discapacidades sociales, ocupacionales o en otras áreas funcionales importantes.	
E	Estas alteraciones no pueden ser explicadas por discapacidad intelectual o por retraso en el desarrollo global.	

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

De estos criterios, es necesario que el A y B se presenten de forma consistente para otorgar un diagnóstico de TEA. El resto de los criterios podrán encontrarse en menor o mayor medida dependiendo de la severidad del trastorno.

4.1.3 Epidemiología

El primer estudio de corte epidemiológico sobre el TEA fue conducido hace poco más de cincuenta años en el Reino Unido por Victor Lotter (Lotter, 1967). En éste se concluyó que 4 de cada 10,000 niños del condado de Middlesex de entre 8 y 10 años presentaban autismo. Posteriormente, en la década de los 1970 las estimaciones consideraban al autismo como una condición poco prevalente (2 casos por cada 10,000 niños) (Kawamura et al., 2008). Sin embargo, de manera interesante se ha observado que durante las últimas dos décadas ha aumentado la prevalencia del TEA (Sharma et al., 2018) probablemente debido a un progreso en el grado de conciencia sobre este grupo de trastornos, así como a la mejora de los instrumentos diagnósticos y a una detección más temprana en la vida de los sujetos con TEA (Elsabbagh et al., 2012; Fombonne, 2009; Isaksen et al., 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce una estimación global de la prevalencia de TEA de 1/100 personas en la población general (Zeidan et al., 2022). En Estados Unidos, dos de las encuestas nacionales más recientes reportaron la prevalencia de TEA en 24.7/1000 individuos de entre 3 y 17 años, durante el periodo 2014-2016 (Xu et al., 2018); y en 25/1000 individuos de las mismas edades pero en el año 2016, con un ligero incremento de la prevalencia (26.1/1000 individuos) en el grupo de edad de 6 a 11 años (Kogan et al., 2018).

En México no existen datos a nivel nacional sobre la prevalencia de TEA, sin embargo, una encuesta realizada en la ciudad de León, Guanajuato, con la participación de 12,116 niños de ocho años de escuelas generales y de educación especial, indicó una prevalencia de 8.7/1000, 86% de los cuales correspondían a varones (Fombonne et al., 2016).

A pesar de estas diferencias en la prevalencia reportadas en diferentes estudios, es claro que la prevalencia de hombres con TEA es mayor cuando se compara mujeres (Baio et al., 2018; Christensen et al., 2016). Al respecto, se sugiere que esta diferencia en la proporción de hombres y mujeres con TEA podría derivarse de sesgos en el diagnóstico, ya que los hombres tienden a externalizar mayor número de alteraciones conductuales como agresividad, hiperactividad y reducidas conductas sociales; mientras que las mujeres con TEA tienden a presentar mayor internalización de síntomas como ansiedad, depresión y otros síntomas emocionales. Lo anterior propiciaría un diagnóstico más inmediato para varones con TEA, mientras que la mayor parte de los casos en mujeres permanecerían sin diagnosticar, sobre todo aquellas con alto grado de funcionalidad (Werling & Geschwind, 2013).

Finalmente, algunas condiciones psiquiátricas ocurren en comorbilidad con el TEA, tal como la discapacidad intelectual (entre 45 y 63% de los niños con TEA) (Bertrand et al., 2001), y dificultades motoras y lingüísticas, que se detectan de forma temprana (Lord et al., 2018). El trastorno de déficit de atención e hiperactividad (ADHD, por sus siglas en inglés) es el trastorno del neurodesarrollo comórbido con el TEA más frecuentemente diagnosticado (Leitner, 2014; Simonoff et al., 2008).

4.1.4 Etiología

El TEA representa un grupo de condiciones del neurodesarrollo con una base biológica marcada (Yates & Couteur, 2016). El consenso general indica que el TEA no tiene una causa etiológica única, sino que es un grupo de trastornos complejos con componentes genéticos (Vorstman et al., 2017) y ambientales (Modabbernia et al., 2017; Posar & Visconti, 2017). La mayoría de las investigaciones se han enfocado en explicar los primeros, revelando que varios genes relacionados con el neurodesarrollo (Guilmatre et al., 2009), con la homeostasis sináptica (Etherton et al., 2011a; Etherton et al., 2011b; Toro et al., 2010) con vías de señalización celular (Kumar et al., 2019), con vías de degradación proteasomal (Khalil et al., 2018), entre otros, se encuentran alterados en el TEA. Sin embargo, el uso de estas condiciones genéticas como indicadores de alguna de las formas del trastorno resulta desafiante ya que, no sólo muchas han sido asociadas a algún TEA, sino que también muchas de estas variaciones se asocian al mismo tiempo con otras condiciones neuropsiquiátricas (Guilmatre et al., 2009), dificultando la claridad y la certeza de un diagnóstico basado en estos marcadores (Petrelli et al., 2016).

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

De éstas resalta la microglía, pues estas células intervienen en varios procesos relevantes para el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) (Reemst et al., 2016), además de que cumplen un papel preponderante en la vigilancia inmunológica del cerebro (Ransohoff & Brown, 2012). De manera interesante, se han hallado alteraciones en la microglía de cerebros *post mortem* e *in vivo* de sujetos con TEA (Liao et al., 2020), las cuales se detallan en la sección 4.4.2 de este trabajo.

4.2 Hipocampo

4.2.1 Anatomía y estructura histológica

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

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

Existen, además, características histológicas que permiten diferenciar a las regiones de la formación hipocampal. El hipocampo, fue dividido por Lorente de Nó en tres sectores basándose en las diferencias citoarquitectónicas: CA1, CA2 y CA3, que están conservadas filogenéticamente entre especies, aunque con sutiles diferencias en el grosor de las capas (**Fig. 1B**) (Amaral & Lavenex, 2007; Jacobson et al., 2018). Es de resaltar que la región CA1 del hipocampo muestra una vulnerabilidad selectiva a diversos de estímulos negativos como la hipoxia, la isquemia, el estrés oxidante y la hipoglicemia, que se observa a través de un daño neuronal tardío (Bartsch et al., 2015; Duvernoy et al., 2013) y cambios en las poblaciones astrocíticas (Ordy et al., 1993; Ouyang et al., 2007).

Las células piramidales representan la capa principal del hipocampo; sus dendritas se extienden hacia la capa molecular y sus axones se prolongan a través de los colaterales de Schaffer y forman contactos sinápticos con las dendritas de otras células piramidales en la capa molecular. Esta capa está densamente empaquetada en la región CA1 del hipocampo y aparece más laxa en las regiones CA2 y CA3 (**Fig. 1B**) (Amaral & Lavenex, 2007; Jacobson et al., 2018).

La franja angosta relativamente libre de células debajo la capa de células piramidales es el *stratum oriens*, y contiene las dendritas basales de las neuronas piramidales y diferentes tipos de interneuronas (**Fig. 1C**) (Amaral & Lavenex, 2007). La capa más superficial del hipocampo es el *stratum lacunosum-moleculare*, misma donde terminan las fibras provenientes de la corteza entorrinal, y es donde los ápices dendríticos de las células piramidales se ramifican; se continúa con la capa molecular del giro dentado (**Fig. 1C**) (Amaral & Lavenex, 2007).

Por otro lado, el GD es una región cortical trilaminar dorsalmente cóncava (en forma de V) que envuelve a la última porción de CA3 del hipocampo, reconocido como CA4 en algunos casos (**Fig. 1B**) (Duvernoy et al., 2013). Tiene una organización relativamente similar a la del hipocampo

(Amaral & Lavenex, 2007). En él se reconocen una capa molecular, que contiene dendritas de las células piramidales; una capa de células granulosas, compuesta por los somas de pequeñas neuronas que reemplazan a las células piramidales del hipocampo, son unipolares y proyectan sus dendritas hacia la capa molecular; y una capa polimórfica (**Fig. 1B**) (Jacobson et al., 2018).

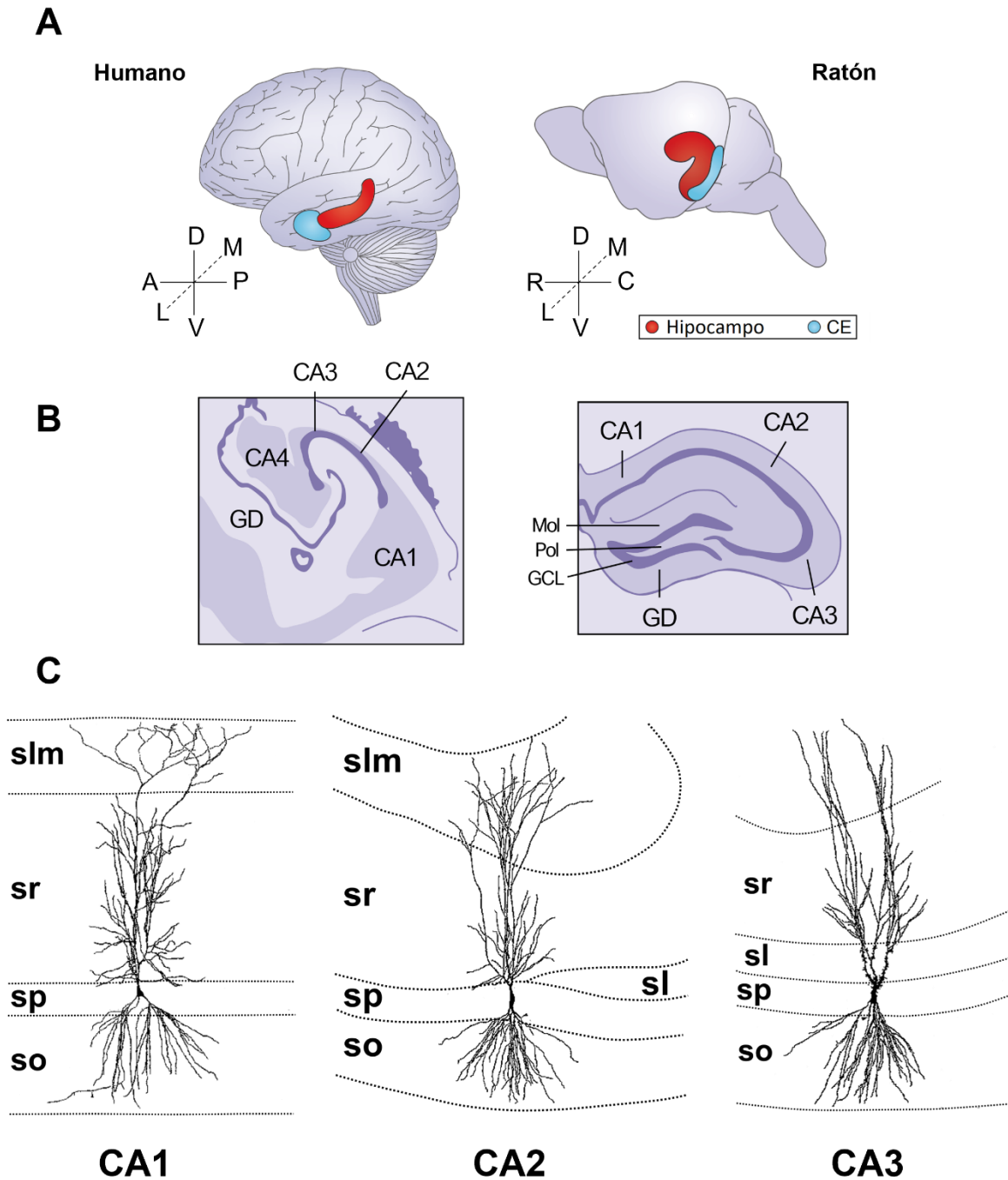


Figura 1. Ubicación anatómica e histología del hipocampo en humanos y en ratones. **A)** Diagramas representativos de la ubicación del hipocampo en el cerebro humano y de ratón. En el humano, la porción rostral de la formación hipocámpal corresponde en su mayoría a la corteza entorrinal. En ratones, esta corteza se encuentra rostral a la porción ventral del hipocampo. **B)** Diagrama representativo de la histología del hipocampo propiamente dicho en humanos y en ratones; se muestran la ubicación de las subregiones CA1-3 que conforman el hipocampo, y su posición con respecto al giro dentado en ambas especies. **C)** Organización histológica de las capas que conforman al *Cornu Ammonis* del hipocampo, tomando como referencia la posición del soma de las neuronas piramidales en esta región, y la distribución de sus neuritas a lo largo de la arquicorteza hipocámpal. *Cornu Ammonis* (1-4): **CA**; corteza entorrinal: **CE**; capa de células granulares del giro dentado: **GCL**; giro dentado: **GD**; capa molecular del giro dentado: **Mol**; capa polimórfica del giro dentado: **Pol**; *stratum oriens*: **so**; *stratum pyramidale*: **sp**; *stratum radiatum*: **sr**; *stratum lacunosum*: **sl**; *stratum lacunosum-moleculare*: **slm**. Modificado de Strange, Witter, Lein, & Moser, 2014 y Amaral & Lavenex, 2007.

4.2.2 Funciones del hipocampo

Inicialmente, un circuito trisináptico intrínseco y fundamentalmente unidireccional fue caracterizado en la formación hipocámpal. Este circuito está compuesto por fibras nerviosas que penetran desde la corteza entorrinal a través de la vía perforante hacia el giro dentado donde estimulan a las dendritas de las células granulares del GD (sinapsis 1), las cuales proyectan sus axones (fibras musgosas) hasta la subregión CA3 donde hacen contacto con las neuronas piramidales de esa región (sinapsis 2), que finalmente proyectan sus fibras a lo largo de los colaterales de Schaffer hasta la subregión de CA1 (**Fig. 2**) (sinapsis 3) (Amaral & Lavenex, 2007).

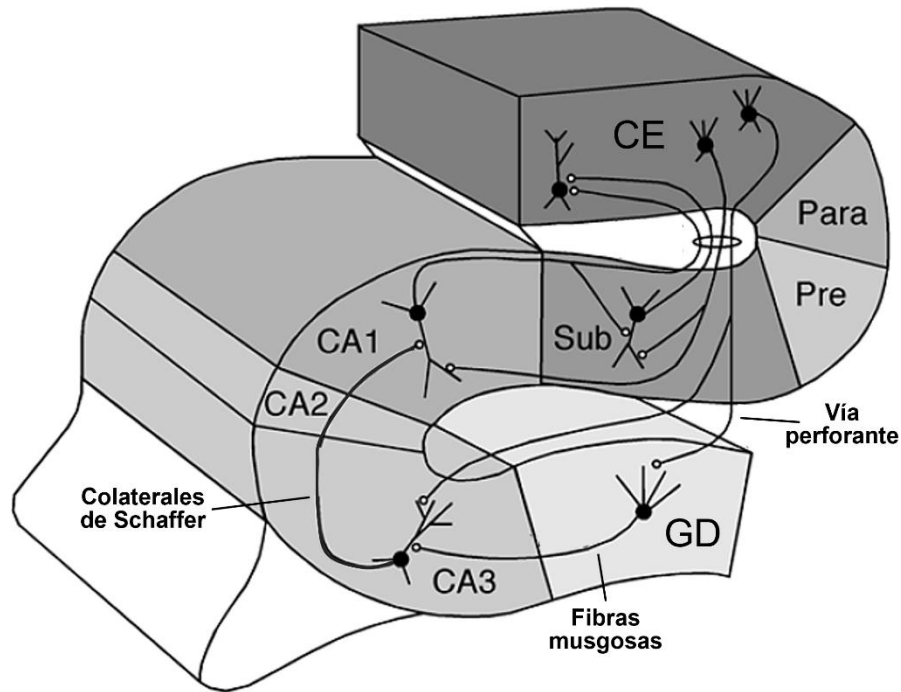


Figura 2. Principales conexiones intrínsecas en el hipocampo. Esquema representativo del circuito trisináptico descrito clásicamente para el hipocampo. El hipocampo recibe aferencias primordialmente de la corteza entorrinal a través de la vía perforante, cuyos axones hacen contacto con las células principales del giro dentado (células granulares). Posteriormente éstas proyectan sus axones a través de las fibras musgosas hacia la capa CA3 del *Cornu Ammonis*. Las neuronas piramidales de CA3 finalmente hacen sinapsis con las neuronas piramidales de la región CA1 a través de los colaterales de Schaffer. Éstas últimas envían proyecciones de regreso hacia la corteza entorrinal a través de axones que corren a lo largo del alveus. *Cornu Ammonis* (1-3): **CA**; Corteza entorrinal: **CE**; giro dentado: **GD**; parasubiculo: **Para**; presubiculo: **Pre**; subiculo: **Sub**. Modificado de Amaral & Lavenex, 2007.

Los primeros hallazgos sobre la implicación del hipocampo en la estructuración de ciertos tipos de memoria provienen del estudio del paciente H.M. (Eichenbaum, 2012), en el cual se practicó una cirugía de resección del lóbulo temporal medial en busca de aliviar los severos episodios de epilepsia que sufría. Subsecuentemente, este paciente experimentó grandes dificultades para adquirir memorias nuevas (amnesia anterógrada) y ligera pérdida de recuerdos previos (amnesia retrógrada) sugiriendo que el hipocampo podía estar implicado en la adquisición de nuevos recuerdos, pero no como repositorio permanente de la memoria (Craig, 2009).

De esta forma, el hipocampo está involucrado en la adquisición y en la consolidación de algunos tipos de memoria (Duvernoy et al., 2013; Squire & Wixted, 2011), concretamente, de la memoria declarativa o semántica, que se refiere a la memoria de hechos y conceptos; así como de la memoria episódica, que permite la recolección de eventos y establecer relaciones entre ellos,

misma en la que interviene la corteza prefrontal (CPF) de manera conjunta y relevante (Eichenbaum, 2017); y de la memoria espacial, que involucra el reconocimiento de una ubicación o un objeto en el espacio físico (Duvernoy et al., 2013; Jeye et al., 2018). Adicionalmente, la formación hipocampal no está involucrada en la adquisición de la memoria inmediata (o “de trabajo”) así como en el aprendizaje de una variedad de tareas no declarativas (o “implícitas”) de largo plazo (Craig, 2009).

Además de la implicación del hipocampo en la adquisición o codificación de nuevos recuerdos, se demostró su papel en la recuperación – evocación presente– de recuerdos previos (Kirwan & Stark, 2004; Stark & Okado, 2003). Más aún, es posible diferenciar el rol de diferentes subregiones del hipocampo en cada una de estas actividades. Por ejemplo, Zeineh y colaboradores (2003) observaron que las regiones de CA2, CA3 y el giro dentado muestran un aumento de actividad durante la fase de codificación en una tarea de asociación de nombres con rostros, pero no durante la fase de recuperación, mientras que la porción del subículo mostró picos de actividad durante esta última fase (Zeineh et al., 2003), sugiriendo la segmentación estructural de cada una de estas tareas en diferentes áreas de la formación hipocampal.

De igual forma, existe una división funcional del hipocampo de forma longitudinal, ya que los polos ventral y dorsal del hipocampo cumplen funciones diferenciales en las respuestas emocionales y en procesos relacionados con la cognición, respectivamente (Fanselow & Dong, 2010). Además, se sugiere que la porción anterior del hipocampo puede estar vinculada a procesos de percepción e imaginación (Zeidman & Maguire, 2016). Experimentalmente se ha demostrado que, mientras el hipocampo ventral se relaciona tanto con la adquisición como con la recuperación de la memoria espacial, el hipocampo dorsal es necesario para la formación de la memoria espacial de trabajo, sugiriendo una división dorsoventral de la actividad en el hipocampo durante una tarea de navegación espacial (Hauser et al., 2020).

Finalmente, el GD en roedores, una subregión íntimamente asociada con las regiones del *Cornu Ammonis*, puede tener un papel fundamental en la diferenciación de dos contextos o situaciones muy parecidas entre sí –separación de patrones– la cual podría vincularse con la formación de nuevas neuronas en este nicho celular particular del cerebro adulto (Aimone et al., 2011; Sahay et al., 2011), sin embargo, la evidencia directa de que algo similar ocurra en humanos es escasa.

4.2.3. Alteraciones hipocampales asociadas al TEA

Como se mencionó anteriormente, el hipocampo está implicado en la consolidación a largo plazo de memorias recién formadas, sin embargo, funciones adicionales le son atribuibles debido a su alto grado de interconexión con otras áreas del SNC (Duvernoy et al., 2013). El desarrollo de conductas socioemocionales adecuadas depende de la integridad funcional y estructural de las regiones cerebrales que median la percepción y la regulación de las emociones (Amaral, 2002) como es el caso del hipocampo ventral (Strange et al., 2014).

Se ha postulado que el hipocampo puede jugar un papel fundamental en el desarrollo normal de un niño en cuanto a su sintaxis lingüística, semántica, pragmática y para la integración de estados motivacionales con la experiencia y el aprendizaje (DeLong, 1992). En ese sentido, la memoria episódica estaría fundamental y selectivamente afectada durante el autismo, misma que depende del hipocampo y de la CPF (Shalom, 2003).

En niños y adolescentes altamente funcionales con TEA, el hipocampo y otras áreas de la corteza límbica poseen un volumen reducido en comparación con controles de la misma edad (Saitoh et al., 2001), mientras que existe información contradictoria que sugiere que hay un incremento en el volumen hipocampal de personas adolescentes con TEA (Groen et al., 2010) o en cualquier punto del desarrollo (Geuze et al., 2005; Schumann et al., 2004), señalando que no existen alteraciones globales de la morfología cerebral que puedan asociarse al TEA con entera certeza.

En tejidos *post mortem*, Kemper y Bauman (1993) describieron la presencia de neuronas de menor tamaño, con mayor proximidad entre sí y con arborizaciones dendríticas de complejidad reducida (Raymond et al., 1995) en varias estructuras del sistema límbico, incluido el hipocampo. Weigel y colaboradores (2010) analizaron los cerebros *post mortem* de trece sujetos con TEA, hallando una distorsión citoarquitectónica local de la corteza entorrinal en dos de ellos, del hipocampo en cuatro, y del giro dentado en dos más; comparándolos con cerebros de sujetos neurotípicos de edades similares (Wegiel et al., 2010). En este estudio concluyeron que existen irregularidades citoarquitectónicas debidas a un fenómeno de displasia laminar en el hipocampo de algunos individuos con TEA, sugiriendo anomalías en la migración neuronal durante el desarrollo (Wegiel et al., 2010). Cabe resaltar, sin embargo, que los estudios en tejidos *post mortem* continúan siendo escasos.

Por otro lado, no existen estudios que hayan evaluado a las poblaciones de la microglía en el hipocampo de sujetos con TEA.

4.3 Poblaciones de células inmunológicas en el sistema nervioso central

4.3.1. Células de origen mieloide

El compartimento de células mieloides en el SNC es ampliamente heterogéneo, pues además de contener a la microglía en el parénquima cerebral, existen macrófagos asociados a los bordes (BAM) que pueden subdividirse por su localización en macrófagos perivasculares, macrófagos meníngeos y macrófagos de los plexos coroideos; además de células dendríticas (**Fig. 3**) (F. J. Quintana, 2019; T. Yang et al., 2019).

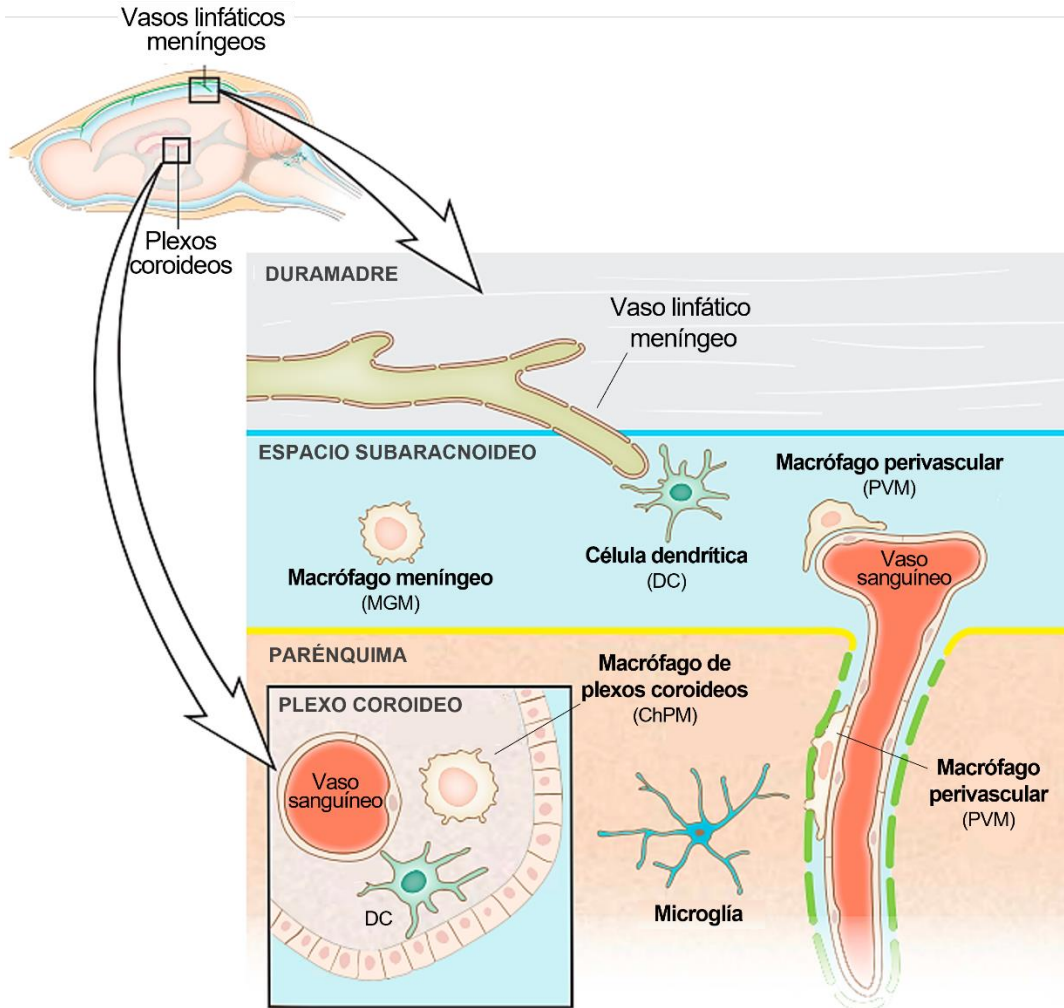


Figura 3. Localización de las principales poblaciones de células mieloides en el sistema nervioso central. El cerebro posee una compleja red de células de origen mieloides que se distribuyen en compartimentos específicos del SNC, permitiéndoles ejercer sus acciones de vigilancia inmunológica y escaneo del ambiente. Por ejemplo, los macrófagos pueden hallarse asociados a las meninges (MGM), a los espacios perivasculares (PVM) que se localizan entre la membrana basal del endotelio vascular y la barrera formada por los pies de los astrocitos y a los plexos coroideos (ChPM) donde la barrera hematoencefálica se hace menos conspicua y las células pueden sondear tanto el ambiente cerebral como la periferia. La microglía por su parte es una población de macrófagos especializada que se instala en el parénquima cerebral durante el desarrollo y se mantiene una población estable a lo largo de la vida del animal. Modificada de Herz et al., 2017.

4.3.1.1 Microglía

La microglía constituye el conjunto de células fagocíticas mononucleares más abundante del SNC, representando hasta el 10% del total de las células en éste (Colonna & Butovsky, 2017). Estas células en roedores se originan a partir de precursores eritromieloides (EMP) en el saco vitelino alrededor del día embrionario (E) 8, y comienzan su migración para colonizar el cerebro en desarrollo a partir del día el E9.5 (Ginhoux et al., 2010; Smolders et al., 2019). En humanos, la colonización del SNC por parte de la microglía derivada del saco vitelino puede detectarse de forma temprana a las 3 semanas de gestación estimadas (Hutchins et al., 1990) mostrando un aumento en la densidad de células alrededor de las 4.5-5.5 semanas de gestación, con un mayor influjo de células hacia el cerebro a las 16 semanas (Menassa & Gomez-Nicola, 2018; Rezaie et al., 2005; Verney et al., 2010). Ahí persisten a lo largo de la vida del animal y mantienen su densidad constante mediante tasas equilibradas de división y de muerte celular (**Fig. 4**) (Ajami et al., 2007; Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012).

En el caso de la microglía en roedores, la colonización del SNC se da en, por lo menos, tres fases: la primera entre el E10.5 y el E14.5 con un incremento gradual de células en el cerebro, la cual coincide con la consolidación de la barrera hematoencefálica (BHE) (Ginhoux et al., 2010, 2013); seguida de una segunda fase entre el E14.5 y E15.5 donde la densidad de la microglía aumenta dramáticamente debido a la proliferación local de estas células, y una tercera fase hasta el E17.5 donde el incremento de células es menos pronunciado (**Fig. 4**) (Swinnen et al., 2013), señalando los complejos patrones de migración y colonización que estas células siguen durante el desarrollo del SNC.

Evidencia experimental adicional obtenida de estudios en roedores sugiere la existencia de subpoblaciones de microglía con una ontogenia distinta. Por ejemplo, una población de células de microglía Hoxb8+ que se origina durante la segunda oleada de hematopoyesis en la región de la aorta-gónada-mesonefros y en el hígado fetal coloniza el SNC hacia el E12.5 (**Fig. 4**) (De et al., 2018), sugiriendo pueden existir subpoblaciones con funciones distintas en etapas tempranas del desarrollo.

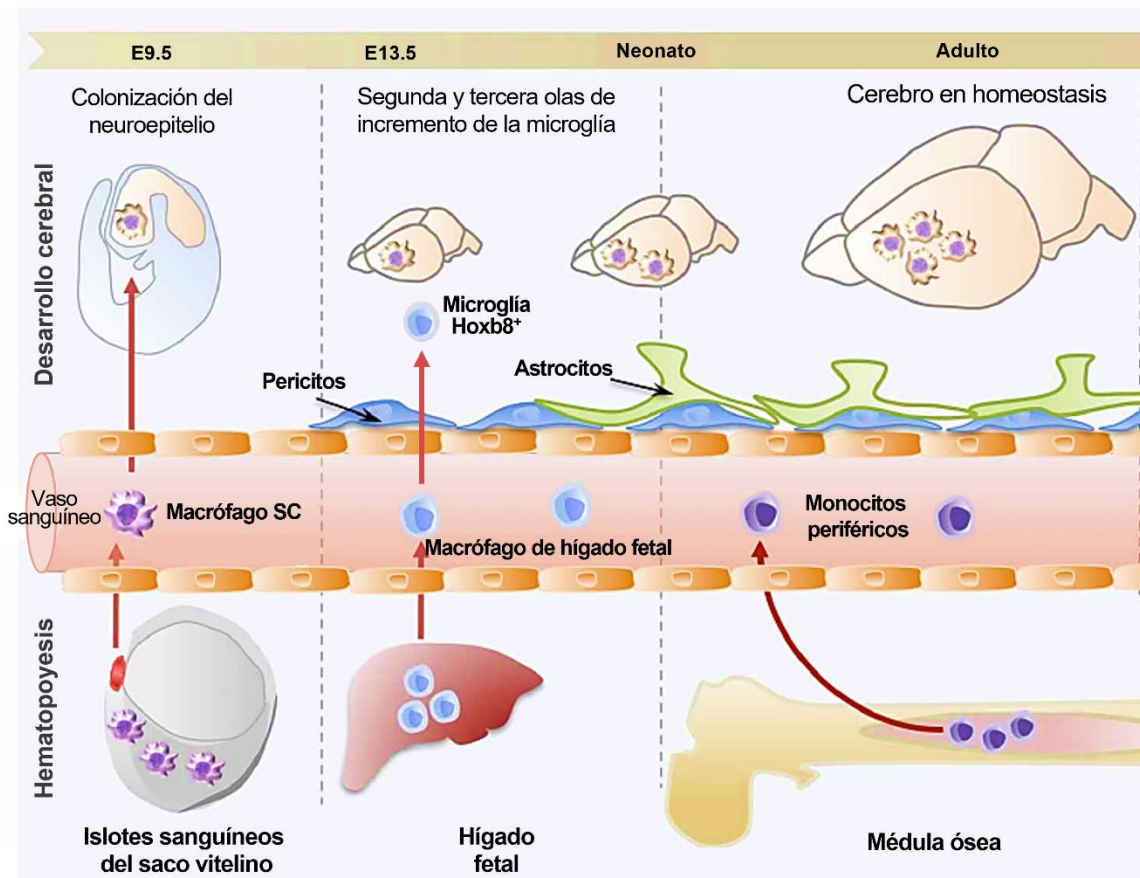


Figura 4. Patrones de migración de la microglía hacia el SNC durante el desarrollo. En roedores, la microglía se origina antes del día embrionario (E) 8 en el saco vitelino para migrar y colonizar el cerebro fetal a partir del E9.5. Existen dos olas posteriores de aumento en la densidad de microglía debidas a eventos de proliferación local y una contribución pequeña de las células periféricas, respectivamente. En el cerebro adulto en estado homeostático no existe contribución de monocitos circulantes derivados de la médula ósea a la poza de microglía. Modificada de Prinz et al., 2019.

La distribución de la microglía es ubicua a lo largo del SNC pero no uniforme, observándose una mayor densidad de estas células en regiones como el hipocampo y los ganglios basales, así como menor densidad en tractos nerviosos y en el tallo cerebral (Lawson et al., 1990).

Sobre las funciones de la microglía, clásicamente se ha descrito su capacidad para responder de forma rápida a estímulos de daño (Napoli & Neumann, 2009; Nimmerjahn et al., 2005) por lo que se les considera las principales mediadoras de la respuesta inmunológica innata del SNC (Kofler & Wiley, 2011; Streit et al., 2005). De manera análoga a lo que se ha establecido canónicamente para macrófagos periféricos, la microglía puede adquirir por lo menos dos perfiles de activación

distintos, el perfil M1 (activación clásica) y el perfil M2 (activación alternativa), cada uno con características fenotípicas y funciones secretoras distintas (Tang & Le, 2016).

El perfil M1 se asocia a respuestas vinculadas a infecciones y lesiones por trauma en el SNC debido a la estimulación de la microglía por productos de origen bacteriano o patrones moleculares asociados a daño celular (DAMP) (Colton, 2009), y se caracteriza por la secreción de citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interferón-gamma (IFN- γ), interleucina (IL)-6, IL-1 β e IL-12 (Colton & Wilcock, 2012) (**Fig. 5**); las cuales, de manera interesante, se encuentran elevadas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en diversas regiones del SNC de individuos con TEA (Chez et al., 2007; Li et al., 2009; Vargas et al., 2005), indicando una posible desregulación de este perfil de respuesta celular por parte de la microglía en estos sujetos. Adicionalmente, la microglía M1 se caracteriza por una expresión elevada de moléculas de superficie como el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, clúster de diferenciación 68 (CD68), CD16/32 y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Moehle & West, 2015) (**Fig. 5**).

Por su parte el perfil M2 puede tener diferentes subtipos que dependen del estímulo que activa a la microglía y del tipo de respuesta que se monta preferentemente (Martinez et al., 2008), pero en general se relaciona con la respuesta antiinflamatoria que implica la reparación del tejido afectado, la fagocitosis de los restos celulares y la desactivación de la respuesta inmunitaria M1/Th1 (Colton & Wilcock, 2012). La secreción de las citocinas IL-4, IL-10, IL-13 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β); así como de las quimiocinas CXCL13 y CXCL4; y la expresión aumentada del receptor de manosa tipo C1 (CD206) y la enzima arginasa 1 (ARG1) se asocian a este tipo de respuesta celular (Hamilton et al., 1999; Tang & Le, 2016) (**Fig. 5**).

Adicionalmente, una diversidad de subpoblaciones de la microglía se ha descrito a partir de técnicas de secuenciación de célula única. Hammond y colaboradores (2019) reportaron la existencia de por lo menos de nueve subpoblaciones de microglía distintas de acuerdo con firmas transcripcionales particulares (Hammond et al., 2019; Tan et al., 2020). Esta heterogeneidad entre subpoblaciones de microglía puede darse de maneras región- y tiempo-específica, pues existe una mayor diversidad de perfiles transcripciones durante las etapas tempranas del desarrollo, que disminuye en el cerebro adulto, pero se enriquece en el cerebro envejecido (Hammond et al., 2019; Masuda et al., 2019). A su vez, la presencia de enfermedades neurodegenerativas, como esclerosis múltiple, o lesiones del SNC, como se relacionan con la aparición de subtipos específicos de microglía en respuesta al proceso patológico particular (Masuda et al., 2019), señalando la enorme capacidad plástica de esta población, que es dependiente del microambiente y del contexto celular. De manera interesante, en el cerebro de los individuos con TEA, la microglía es una de las poblaciones celulares que muestra una mayor expresión diferencial de genes a nivel de la CPF, en comparación con sujetos neurotípicos, señalando una posible implicación de estas células en el desarrollo de este trastorno (Velmeshev et al., 2019).

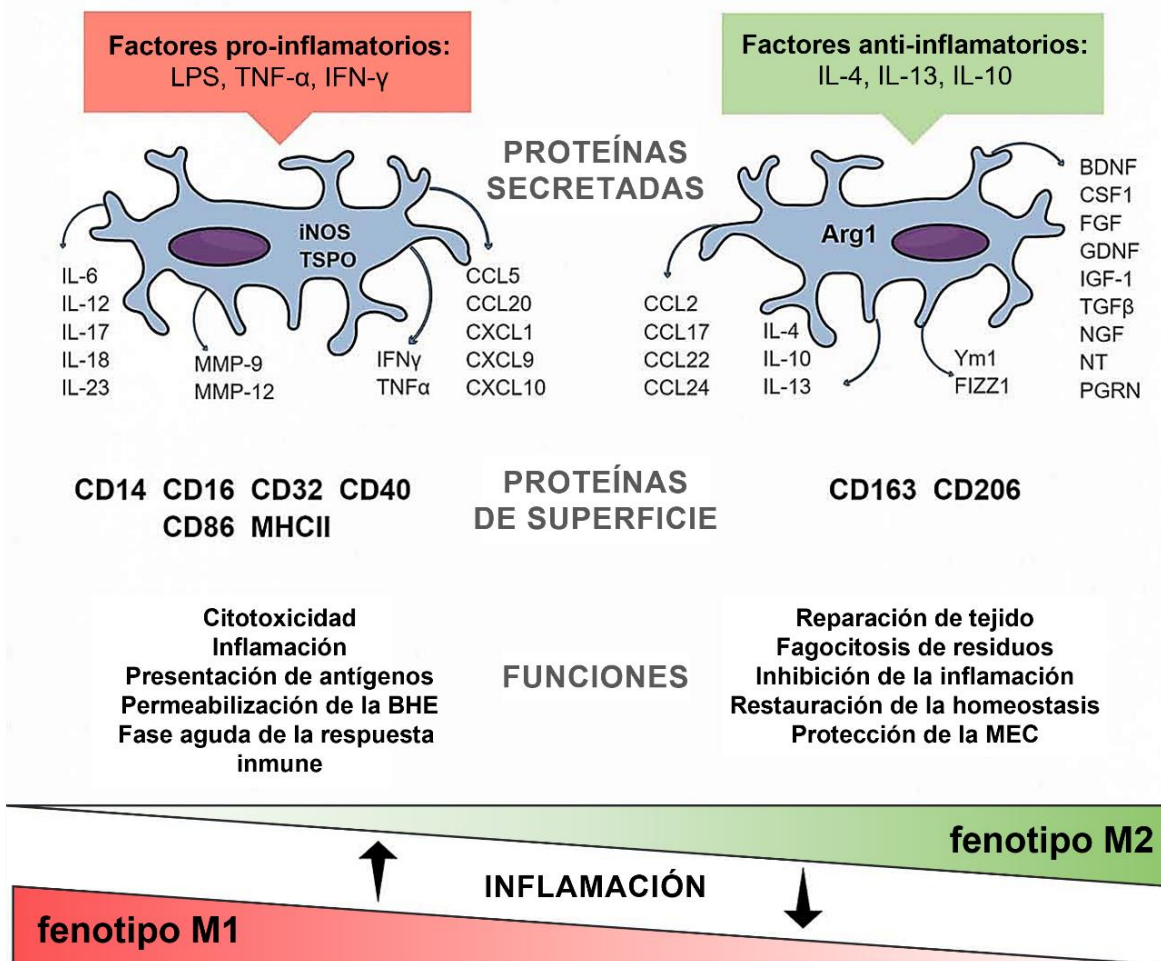


Figura 5. Marcadores proteicos asociados a los perfiles M1/M2 de la microglía. La microglía, como los macrófagos en tejidos periféricos, exhiben un espectro de activación inflamatorio que oscila entre los fenotipos M1/M2. El fenotipo M1 se asocia comúnmente a la estimulación por patógenos y DAMPs; es un conjunto de mecanismos celulares para la eliminación del patógeno o de la fuente de marcadores de daño, y evitar su diseminación. Por su parte el perfil M2 se asocia comúnmente a la resolución del perfil M1, así como la reparación del daño tisular tras un insulto inmunogénico. Cada uno de estos perfiles se asocia la producción de ciertas proteínas que cumplen funciones específicas en cada momento de un evento inflamatorio. La microglía puede exhibir perfiles de expresión génica que se localizan a lo largo de un espectro de activación, el cual pueden transitar según las necesidades del tejido. Modificada de Jurga et al., 2020.

En años recientes también se ha descrito la participación de la microglía en procesos relevantes para la fisiología del SNC en homeostasis (Kettenmann et al., 2013). En su estado basal, la microglía sondea el entorno neuronal mediante sus procesos celulares, cuya motilidad elevada

las capacita para hacer contacto con puntas sinápticas de forma constante (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). A su vez, esta motilidad se relaciona con su habilidad para eliminar sinapsis débiles mediante fagocitosis en el hipocampo posnatal en un proceso conocido como poda sináptica, y cuya deficiencia se asocia a alteraciones en la conectividad neuronal y a deficiencias en la conducta social en ratones (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014).

Evidencia adicional indica un papel relevante de la microglía en la ontogenia del SNC a través de la estimulación del crecimiento y del direccionamiento axonal (Pont-Lezica et al., 2014; Squarzone et al., 2014), la inducción de señales de supervivencia neuronal mediante factores solubles como el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) (Shigemoto-Mogami et al., 2014; Ueno et al., 2013), la inducción de apoptosis neuronal y la remoción de restos celulares por fagocitosis (Sierra et al., 2010; Wakselman et al., 2008), además de promover la formación de espinas dendríticas por contacto celular en la corteza somatosensorial posnatal (Miyamoto et al., 2016); lo anterior evidencia la importancia de la microglía y su función fagocítica en el desarrollo temprano y en el mantenimiento de las homeostasis del SNC adulto.

De forma constitutiva, la microglía expresa el marcador de superficie de macrófagos CD11b y posee un fenotipo en homeostasis que se caracteriza por una baja expresión de proteínas del MHC de clase II (Kreutzberg, 1996; Sedgwick et al., 1991) y una baja expresión de moléculas co-estimuladoras (Kaur et al., 2010; Menendez Iglesias et al., 1997; Satoh et al., 1995).

Se ha reportado que la morfología de la microglía puede servir como un indicador de su estado reactivo (Giulian, 1987; Suzumura et al., 1991). En el estado homeostático, estas células poseen una morfología altamente ramificada, con largos procesos cuyas terminaciones son bulbosas, posibilitando la vigilancia del microambiente circundante (Nimmerjahn et al., 2005). Más aún, estas proyecciones forman zonas de contacto con las terminales sinápticas *in vivo* a razón de una vez por hora en condiciones fisiológicas (Wake et al., 2009).

4.3.1.2 Macrófagos perivasculares (PVM)

Los macrófagos perivasculares (PVM) se localizan fuera del parénquima cerebral, entre los vasos sanguíneos que irrigan el SNC y los pies terminales de los astrocitos que conforman la barrera hematoencefálica (**Fig. 2**) (Herz et al., 2017), y tienen un origen embrionario, pues derivan del saco vitelino o del hígado fetal (Goldmann et al., 2016). Los PVM participan en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica en zonas de alta permeabilidad (Willis et al., 2007), además de que se ha sugerido su participación en la presentación de antígenos a linfocitos T en el contexto de un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Hickey & Kimura, 1988). Se reconoce su marcada actividad fagocítica (Faraco et al., 2017), y se sugiere que pueden facilitar el drenaje linfático a través de la vía glinfática, donde participan la glía del parénquima cerebral y la glía limitante (T. Yang et al., 2019), así como a través de la vía de drenaje perivascular intramural (Carare et al., 2008).

4.3.1.3 Macrófagos meníngeos (MGM)

Los macrófagos meníngeos (MGM) se encuentran asociados a la vasculatura de la piamadre y en el estroma del espacio subaracnoideo en el estado homeostático (**Fig. 2**) (Ransohoff & Cardona, 2010). Los MGM derivan de precursores embrionarios, sin la necesidad de un intermediario monocítico, y permanecen en las meninges hasta la adultez (Goldmann et al., 2016). Su localización los predispone para detectar una variedad de estímulos asociados a infecciones o daño tisular en el LCR del espacio subdural (Herz et al., 2017). De manera importante, pueden tener un papel importante en tareas cognitivas pues en ratones entrenados con la prueba del laberinto acuático de Morris se observó un aumento en el número de linfocitos T CD4+ con actividad secretora de IL-4, los cuales estimulan a los MGM para generar un ambiente antiinflamatorio (Derecki et al., 2011). En ratones inmunodeficientes se observó una disminución en la adquisición de la memoria espacial con la misma prueba conductual, la cual se rescata cuando se inoculan de manera intravenosa con macrófagos estimulados *in vitro* con IL-4 (Derecki et al., 2011), señalando la relevancia de esta población de células mieloides en procesos cognitivos.

4.3.1.4 Macrófagos de los plexos coroideos (ChPM)

Los plexos coroideos son estructuras compuestas por células epiteliales cúbicas ciliadas que delimitan un estroma con una alta densidad de vasos sanguíneos fenestrados, los cuales son responsables de la secreción de LCR hacia las cavidades ventriculares (Prinz et al., 2017). Los macrófagos de los plexos coroideos (ChPM) se ubican en el estroma de los plexos coroideos (**Fig. 2**) (Ransohoff & Cardona, 2010). Contrario a lo que se observa en las poblaciones de microglía, PVM y MGM, las poblaciones de ChPM reciben una contribución importante de monocitos circulantes en sangre, la cual depende del receptor quimiotáctico CCR2 (Goldmann et al., 2016). Aunque las funciones de los ChPM durante la homeostasis se conocen poco, se sabe que tienen la capacidad de presentar antígenos a linfocitos T (Schwartz & Baruch, 2014), además de que hay evidencia que sugiere que pueden ser fuente de IL-10 que favorece la generación de un ambiente antiinflamatorio en el SNC (Kunis et al., 2015). Se ha sugerido también que pueden tener una participación importante en la fagocitosis y eliminación de desechos celulares presentes en la interfase sangre-LCR (Baruch et al., 2015).

4.3.1.5 Células dendríticas (DC)

Las células dendríticas (DC) se diferencian a partir de células troncales hematopoyéticas que dan origen a células progenitoras mieloides comunes y, subsecuentemente, a células progenitoras de macrófagos y DC, de las cuales se origina el progenitor común de DCs (Colton, 2013). Este progenitor puede seguir dos vías para originar 1) células dendríticas plasmacitoides (pDC) o 2) precursores de células dendríticas (pre-DC) que egresan a la circulación para migrar a los tejidos y diferenciarse terminalmente a células dendríticas clásicas (cDC) (D'Agostino et al.,

2012; Liu et al., 2009). Las poblaciones de DCs en las meninges y los plexos coroideos reciben una contribución importante de monocitos derivados de la sangre (Chinnery et al., 2010), lo que indica que las DCs poseen un recambio constante en el SNC. En el cerebro sano, las DC se localizan en las meninges, en zonas con mayor permeabilidad de la BHE, como los plexos coroideos y los órganos circunventriculares, y en el LCR (**Fig. 2**) (Bulloch et al., 2008; De Graaf et al., 2011; E. Quintana et al., 2015). Por su localización, se piensa que en el estado homeostático pueden actuar como un puente de comunicación importante entre la periferia y el parénquima cerebral (Clarkson et al., 2012), sin embargo su participación en el equilibrio homeostático del cerebro sano permanece sin ser explorada.

Por otro lado, la contribución de las DC al estado patológico ha sido caracterizado más extensamente. En modelos experimentales murinos, las poblaciones de DC en el SNC son capaces de captar y de procesar antígenos como la proteína básica de mielina (MBP), migrar a nodos linfáticos a través de vías aferentes y presentarlos a linfocitos T en la periferia en un modelo murino de EAE (Dittel et al., 1999), además de mediar la invasión de células inmunes hacia el SNC, re-estimular e inducir la expansión de linfocitos T que han sido activados periféricamente, en un modelo de esclerosis múltiple (Greter et al., 2005; Paterka et al., 2016). De manera interesante, las DC tienden a acumularse en zonas donde ocurren lesiones debidas a esclerosis múltiple con mayor frecuencia, como el área periventricular y tractos nerviosos adyacentes (Proding et al., 2011), lo que señala el papel relevante de esta población de células mieloides en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas.

4.4 Alteraciones inmunológicas asociadas al TEA

Como se mencionó antes, existen una serie de factores ambientales que se relacionan con un riesgo aumentado de la aparición del TEA, entre los que destacan la presencia de metales pesados durante la gestación (Arora et al., 2017), contaminantes del aire (Becerra et al., 2013; Kalkbrenner et al., 2015) o infecciones virales durante las etapas tempranas del embarazo (Atladóttir et al., 2010). En cuanto a este último factor, se ha especulado que la activación inmune materna (MIA) durante la gestación podría jugar un papel importante en el desarrollo del TEA (Hanamsagar & Bilbo, 2017; Patterson, 2011) gracias a la presencia de anticuerpos dirigidos contra epítomos del SNC fetal en el suero de madres de niños con TEA (Singer et al., 2008); y en el suero de niños con TEA (Abou-Donia et al., 2019; Mazur-Kolecka et al., 2014; Singer et al., 2006), señalando que una desregulación de los componentes inmunológicos puede estar presente en las madres de individuos con TEA desde la etapa gestacional y persistir en el individuo con TEA hasta las etapas tempranas de la infancia.

De forma interesante, existen alteraciones periféricas en las funciones celulares del sistema inmunológico de lo sujetos con TEA, tales como respuestas de activación atípicas y cambios en las subpoblaciones de linfocitos T (Ashwood, Krakowiak, et al., 2011a; Denney et al., 1996), aumento del número de linfocitos T CD8+ y linfocitos B en sangre (López-Cacho et al., 2016),

aumento de monocitos circulantes en sangre (Sweeten et al., 2003), y un aumento en la expresión de la enzima iNOS en neutrófilos (Nadeem, Ahmad, Attia, et al., 2019) y en monocitos (Nadeem et al., 2018) aislados de niños con TEA; señalando la presencia de una fuerte desregulación de los componentes inmunológicos en estos sujetos.

4.4.1 Neuroinflamación

El concepto de neuroinflamación refiere a una serie de eventos biológicos que llevan a la actividad y a la proliferación sostenidas de las células gliales tras una lesión, una infección o durante una patología propia del SNC, y se ha propuesto que puede alterar las funciones cerebrales (Matta et al., 2019). De forma característica tanto la microglía como los astrocitos sufren cambios morfológicos y transcripcionales que llevan a la liberación de factores proinflamatorios en respuesta a estos estímulos deletéreos (Hanisch & Kettenmann, 2007; Parpura et al., 2012).

La presencia exacerbada de factores proinflamatorios en el contexto de la neuroinflamación puede producir alteraciones estructurales y funcionales de las redes neuronales. Por ejemplo, la producción *de novo* de TNF- α en el contexto de la neuroinflamación puede potenciar los eventos de excitotoxicidad neuronal a través de reducir la captura de glutamato por parte de los astrocitos, a la vez de aumentar la cantidad de receptores AMPA y NMDA en la membrana celular y reducir la cantidad de receptores GABA en neuronas inhibitorias, produciendo un desbalance en la tasa de excitación/inhibición en el cerebro (Olmos & Lladó, 2014), siendo éste último un rasgo propuesto como relevante para la aparición del TEA (Gao & Penzes, 2015).

Diversos reportes han hallado alteraciones en las concentraciones de citocinas y quimiocinas pro- y antiinflamatorias, tanto en la periferia (Ashwood, Krakowiak, et al., 2011b), como en el mismo sistema nervioso central (Vargas et al., 2005; Wei et al., 2011) de los individuos con TEA. Un metaanálisis realizado a partir de 17 estudios, que reunieron más de 700 individuos con TEA, arrojó que existe un aumento consistente en las concentraciones séricas de IL-1 β , IL-6, IFN- γ y MCP-1 en estos sujetos (Masi et al., 2015). Un resumen no exhaustivo sobre los hallazgos concernientes a estos factores solubles en el SNC de individuos con TEA, comparados con sujetos neurotípicos, se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Cambios en el contenido de factores solubles pro- y antiinflamatorios en el SNC y en el suero de sujetos con TEA (Modificado de Matta et al., 2019)

Citocina / Quimiocina	Muestra	Tamaño de la muestra	Hallazgo	Referencia
TNF- α	LCR:Suero	TEA: 10	Aumento de la tasa de TNF- α en LCR:suero	(Chez et al., 2007)
	Tejido cerebral	TEA: 8 NT: 8	Aumento en la CCF	(Li et al., 2009)
IL-6	Tejido cerebral	TEA: 6 NT: 6	Aumento en el CBL	(Wei et al., 2011)
	Tejido cerebral	TEA: 7 NT: 7	Aumento en la CCA	(Vargas et al., 2005)
	Tejido cerebral	TEA: 8 NT: 8	Aumento en la CCF	(Li et al., 2009)
IL-1 β	Tejido cerebral	TEA: 8 NT: 8	Sin cambios	(Li et al., 2009)
IFN- γ	Tejido cerebral	TEA: 8 NT: 8	Aumento en la CCF	(Li et al., 2009)
	LCR	TEA: 7 NT: 7	Aumento	(Vargas et al., 2005)
MCP-1 (CCL2)	Tejido cerebral	TEA: 7 NT: 7	Aumento en CCA y en CBL	(Vargas et al., 2005)
	LCR	TEA: 6 NT: 6	Aumento	
IL-8	Tejido cerebral	TEA: 8 NT: 8	Aumento en la CCF	(Li et al., 2009)
	LCR	TEA: 6 NT: 6	Aumento	(Vargas et al., 2005)
IL-10	Tejido cerebral	TEA: 7 NT: 7	Aumento en la CCA	(Vargas et al., 2005)
IL-4	Tejido cerebral	TEA: 8 NT: 8	Sin cambios	(Li et al., 2009)
IL-5	Tejido cerebral	TEA: 8 NT: 8	Sin cambios	(Li et al., 2009)

TEA Trastorno del espectro autista (sujetos)

NT Neurotípico (sujetos)

LCR Líquido cefalorraquídeo

CF Corteza cerebral frontal

CBL Cerebelo

CCA Corteza del cíngulo anterior

Por otro lado, no existen estudios que hayan evaluado posibles alteraciones en las poblaciones de células mieloides y linfoides asociadas a los bordes del SNC en el contexto del TEA, pues la mayor parte de los estudios se han enfocado en explorar los cambios asociados a los macrófagos del parénquima cerebral– la microglía– en este grupo de trastornos, como se describe a continuación.

4.4.2 Alteraciones de la microglía asociadas al TEA

Múltiples reportes describen alteraciones en la microglía de varias regiones del SNC de personas con TEA. Por ejemplo, uno de los reportes iniciales realizado en cerebros *post mortem* de personas con TEA halló un aumento en la inmuno-reactividad a la proteína HLA-DR, la cual forma parte del complejo principal de histocompatibilidad en humanos, en la sustancia gris y en la sustancia blanca del cerebelo, comparada con cerebros de individuos neurotípicos.

Posteriormente, un estudio evaluó la localización espacial de la microglía en la CPF dorsolateral de cerebros *post mortem* de personas con TEA, y halló una distribución anormalmente próxima de la microglía con los somas neuronales a 25, 75 y 100 μm , cuando se comparó con cerebros de individuos neurotípicos (Morgan et al., 2012). Un estudio adicional reportó de manera cualitativa la presencia de agrupamientos, o *clusters*, de microglías en la corteza temporal de individuos con TEA (Lee et al., 2017). Lo anterior señala que existen alteraciones en la localización de la microglía que sugieren un aumento en el grado de contacto entre ésta y las neuronas de la corteza cerebral.

También existe un aumento en la densidad de la microglía en la CPF dorsolateral (Morgan et al., 2010), y en las cortezas frontoinsular y visual (Tetreault et al., 2012) de los individuos con TEA, lo cual frecuentemente se correlaciona con un aumento en la reactividad de estas células (Kettenmann et al., 2011).

Los cambios morfológicos de la microglía que van de una forma ramificada, con soma reducido y procesos celulares finos hacia un soma y procesos celulares hipertróficos, reducidos en longitud y en número, se han correlacionado con la conversión de la microglía de un estado homeostático a un estado reactivo tras un estímulo aversivo en el SNC (Kettenmann et al., 2011; Kovacs, 2018).

En cerebros *post mortem* de individuos con TEA, existen alteraciones morfológicas en la microglía que se observaron a través de un aumento en el volumen del soma, con una retracción y ensanchamiento de los procesos celulares en la CPF dorsolateral (Morgan et al., 2010), en la corteza temporal (Lee et al., 2017) y en la amígdala de una proporción de los sujetos analizados (Morgan et al., 2014).

De manera interesante, un estudio realizado en cerebros *in vivo* de individuos con TEA a través de tomografías de emisión de positrones (PET) reveló que existe un aumento en la proporción de microglía reactiva a lo largo de varias regiones del SNC como el cerebelo, el mesencéfalo y la corteza orbitofrontal (Suzuki et al., 2013).

Finalmente, un estudio evaluó la expresión de genes gliales en la CPF de cerebros *post mortem* de individuos con TEA, hallando un aumento en la expresión de los genes *DAP12*, *TREM2* y *CX3CR1*, los cuales se expresan de manera preferencial pero no exclusiva por la microglía (Edmonson et al., 2014), indicando la presencia de alteraciones en el estado homeostático de las poblaciones de células fagocíticas del SNC, incluyendo a la microglía.

Lo anterior, en conjunto, señala la existencia de un fenotipo reactivo de la microglía en el SNC de los individuos con TEA, que puede observarse a través de cambios en la densidad de células, alteraciones en su morfología con respecto al estado homeostático y cambios en su expresión génica.

4.5 Modelos animales para el estudio del TEA

Los modelos animales representan una oportunidad única para integrar aspectos conductuales del TEA, con imagenología cerebral *in vivo* y con la caracterización celular y molecular del tejido *post mortem* en un mismo individuo (Bauman & Schumann, 2018).

A pesar de que ciertos componentes del TEA presentes únicamente en humanos no pueden ser reproducidos en su totalidad por los modelos animales, algunos de ellos con endofenotipos relevantes pueden ofrecer herramientas útiles para el estudio de este grupo de trastornos (Bauman, Crawley, & Berman, 2019; Homborg et al., 2016).

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

A la fecha se han desarrollado más de setenta modelos murinos para el TEA, creados a través de: (1) manipulaciones farmacológicas y ambientales, como el modelo en roedores de exposición prenatal a ácido valproico (VPA) (Nicolini & Fahnstock, 2018; Rodier et al., 1996), o por MIA inducida durante la gestación (Bergdolt & Dunaevsky, 2019); (2) mutaciones en genes vinculados a síndromes que aparecen en comorbilidad con el TEA, como el gen *Fmr1* que se asocia al síndrome de X frágil (Moy et al., 2006); (3) mutaciones en genes de riesgo relacionados con formas no sindrómicas del TEA, como los ratones *knockout* (KO) para los genes *Shank1* y *Nrxn1a* (Bey & Jiang, 2014).

No obstante, dado que una característica observada del TEA es su heterogeneidad genética y fenotípica, y dado que los casos de TEA asociados a genes de riesgo representan tan sólo 10-20% de todos los casos (Geschwind, 2011), el uso de modelos murinos monogénicos para su estudio limita la captación de la complejidad de este grupo de trastornos (Moy et al., 2006), por lo que la

crianza endogámica de cepas definidas conductualmente como “tipo autistas”, tales como las cepas BTBR T+ tf/J (BTBR) y C58/J, ha surgido como una alternativa relevante para definir aspectos experimentales del TEA en un modelo animal (Bauman et al., 2019; Bey & Jiang, 2014; Ellegood et al., 2015).

4.5.1 Alteraciones neuroinmunológicas en modelos murinos para el estudio del TEA

Como se mencionó antes, varios modelos murinos de autismo han sido ampliamente validados en cuanto a las alteraciones conductuales y sinápticas que presentan. De manera concordante con lo que se observa en sujetos con TEA, una diversidad de alteraciones inmunológicas y de la glía han sido identificadas en estos modelos animales.

En el modelo murino de exposición prenatal a VPA existe una elevación en el contenido de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α en el cerebro total (Hegazy et al., 2015); pero también de forma región específica en la CPF, el cerebelo, el hipocampo y en el núcleo estriado, comparado con los animales control (Luhach et al., 2021), así como una disminución en el contenido de la citocina antiinflamatoria IL-10 en esas mismas regiones (Luhach et al., 2021). También, los animales expuestos prenatalmente a VPA muestran un aumento en el contenido de la proteína Iba-1 en la corteza cerebral, acompañado de un incremento en la expresión de los genes *Ilb*, *Il6* y *Tnfa* (Gařsowska-Dobrowolska et al., 2020).

Por su parte, en los modelos de MIA se observan alteraciones conductuales en la descendencia que incluyen una baja preferencia social y deficiencias en la conducta de exploración (Shi et al., 2003), convirtiéndolos en modelos valiosos para el estudio del TEA. De manera muy consistente, este modelo presenta alteraciones en el contenido cerebral de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Meyer et al., 2007), así como un aumento en la expresión cerebral de la enzima iNOS (Paintlia et al., 2004) y de la quimiocina MCP-1 (Liverman et al., 2006). Además, la presencia de la IL-6 materna es crítica para inducir las alteraciones conductuales y transcripcionales en los productos (Smith et al., 2007).

La cepa murina endogámica BTBR ha sido validada como un modelo muy relevante para el estudio del TEA pues muestra cambios conductuales que indican una baja preferencia social, una disminución de la capacidad comunicativa y conductas repetitivas (McFarlane et al., 2008). En esta cepa de ratones existe una elevación en el contenido de inmunoglobulinas isotipo (IgG) en diversas regiones del SNC que incluyen la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo; además de un incremento en el contenido de las citocinas IL-1 β , IL-18 e IL-33 en homogenizados de cerebros totales, en comparación con una cepa control (Heo et al., 2011), y aumentos en el contenido de IL-6 e IL-12 de manera región específica (Careaga et al., 2015; Heo et al., 2011). Los ratones de esta cepa presentan una elevación en el número de células de la microglía en preparaciones de cerebro total, en comparación con una cepa control (Heo et al., 2011). También los niveles de expresión de la enzima iNOS se encuentran elevados en homogenizados de cerebro

total y de cerebelo de ratones adultos de la cepa BTBR (Ahmad et al., 2019; Nadeem, Ahmad, Al-Harbi, et al., 2019), señalando también la presencia de alteraciones relacionadas con el estrés oxidante en esta cepa de ratones.

Los datos anteriores señalan que los modelos murinos para el estudio del TEA representan una opción muy valiosa, no sólo por su capacidad para recapitular rasgos particulares de las conductas comúnmente asociadas al trastorno, sino porque además presentan alteraciones inmunológicas similares a las que se han reportado en sujetos humanos con TEA, brindando una oportunidad adicional para hallar explicaciones desde la perspectiva bioquímica y biomédica para estos cambios, y su relación con las deficiencias conductuales observadas.

En este sentido, varios reportes informan sobre la efectividad de los tratamientos con inmunomoduladores sobre las conductas asociadas al TEA en los modelos murinos antes mencionados. Por ejemplo, el uso del compuesto inmunomodulador VGX-1027, un inhibidor de las vías de señalización del factor nuclear (NF)- κ B y de p38 (perteneciente a la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos [MAPK]) en macrófagos tanto *in vitro* como *ex vivo* (Stojanovic et al., 2007), probó ser efectivo en la atenuación de las conductas repetitivas y ansiosas en ratones de la cepa BTBR de 6 a 7 semanas de edad, además de potenciar la interacción social entre los animales; con una reducción concomitante de la expresión de las citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ y de la enzima iNOS en tejido cerebral (Ahmad et al., 2019).

Efectos similares han sido reportados al utilizar otras drogas inmunomoduladoras como el fingolimod (FTY-720), un ligando no selectivo del receptor a esfingosina-1-fosfato (S1P1) comúnmente utilizado en la clínica para tratar los síntomas de la esclerosis múltiple. Este compuesto mostró efectividad para aumentar la interacción social y las respuestas vocales entre ratones machos y hembras de 8 semanas de edad de la cepa BTBR, con un aumento en la expresión hipocampal del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y neuregulina 1, además de restaurar el contenido hipocampal de la citocina IL-1 β (De Simone et al., 2020). Resultados comparables han sido reportados al utilizar este mismo compuesto en el modelo murino de TEA inducido por exposición gestacional a VPA (Wu et al., 2017), incluyendo una recuperación en la densidad de células Iba-1⁺ en la región CA1 del hipocampo, además de una reducción en el contenido de IL-6 en esa misma región (Wu et al., 2017).

Finalmente, como se mencionó anteriormente, IL-6 es una citocina crítica en la inducción de los cambios conductuales observados en los modelos de MIA (Smith et al., 2007). En ese mismo estudio, Smith y colaboradores (2007) probaron que al coadministrar un estímulo de ácido poliinosínico-policitidílico (poli-I:C)–análogo funcional de una infección viral–y un anticuerpo anti-IL-6 durante la gestación, se pueden bloquear los cambios conductuales y transcripcionales inducidos por la MIA en la progenie, señalando que el antagonizar vías proinflamatorias

específicas puede ser relevante en la atenuación de las conductas alteradas en el contexto del TEA.

4.5.2 La cepa murina C58/J como modelo de estudio para el TEA

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

Sobre el perfil genético de la cepa, un estudio halló la presencia de polimorfismos de nucleótido único (SNP) en 97 genes de la cepa C58/J tales como *CACNA1C*, *GABRA5* y *GABRB1*, que se relacionan primordialmente con funciones neuronales; y cuyos ortólogos en humanos se han asociado al TEA como factores de riesgo (Moy et al., 2014). En nuestro laboratorio se halló que, en adición a los ya reportados por Moy y colaboradores (2014), existen SNPs en 454 genes en la cepa C58/J en genes que codifican productos relevantes en una gran diversidad de procesos celulares y del neurodesarrollo (Barón-Mendoza et al., 2021). De forma interesante, las variaciones en ortólogos humanos de algunos de estos genes han sido reportados como genes de riesgo para presentar TEA según la base de datos de Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI), tales como neurofibromina 1 (*NF1*), la proteína con dominios repetidos de anquirina 11 (*ANKRD11*) o la proteína tipo 2 asociada a contactina (*CNTNAP2*) los cuales codifican proteínas con funciones en la remodelación del citoesqueleto neuronal y la estabilización de las sinapsis, o el represor transcripcional capicua (*CIC*) que participa regulando la expresión de una cantidad de genes durante el desarrollo embrionario (Barón-Mendoza et al., 2021).

Un estudio de Wilkes y colaboradores (2019) mostró por imágenes de resonancia magnética que los ratones de la cepa C58/J exhiben una disminución del volumen cerebral total. También demostraron que el volumen aumentado en los núcleos estriado y subtalámico, así como en la región crus II del cerebelo, se correlaciona positivamente con el número de actividades motoras repetitivas (saltos verticales y piruetas) (Wilkes et al., 2019). También se halló que el hipocampo de estos ratones posee un mayor volumen relativo en comparación con la cepa C57BL/6J (Wilkes et al., 2019), tal como en humanos con TEA de distintas edades (Groen et al., 2010; Schumann et al., 2004; Sparks et al., 2002).

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

Recientemente, hemos evaluado la microglía en la región CA1 del hipocampo de la cepa murina C58/J, encontrando un aumento en la densidad de estas células. Además, describimos la diferencia en la morfología de la microglía en esta cepa de ratones, basada principalmente en la longitud y en el número total de ramificaciones (Duarte-Campos, 2020).

5. Planteamiento del problema

La etiología del TEA es compleja y multifactorial, y permanece sin ser descrita en su totalidad. Se ha postulado que algunas alteraciones inmunológicas, particularmente aquellas mediadas por la microglía en el SNC, pueden incidir de alguna forma en la aparición y en el mantenimiento del fenotipo del TEA; sin embargo, se requiere de más evidencia para establecer un vínculo concreto entre los aspectos inmunológicos y las pautas conductuales que caracterizan a estos trastornos.

El uso de modelos animales puede ayudar a entender rasgos biológicos particulares que se asocian a las conductas tipo autista. En particular, la cepa murina C58/J representa una opción relevante para el estudio del TEA idiopático, en oposición a la variedad de modelos murinos monogénicos que se han desarrollado para estudiar alteraciones genéticas específicas que se asocian a este trastorno. Esta cepa murina presenta una baja preferencia social, conductas repetitivas y deficiencias en la memoria y el aprendizaje, análogas a las que se observan en los humanos con TEA; además de cambios en la densidad y morfología de la microglía que podrían relacionarse con las alteraciones conductuales en esta cepa. De esta forma, resta por caracterizar las posibles alteraciones inmunológicas relacionadas con un proceso neuroinflamatorio que esta cepa murina pudiera presentar a lo largo del desarrollo, a fin de establecer paralelismos con lo que se ha reportado en humanos.

6. Hipótesis

Los ratones de la cepa C58/J presentarán un contenido elevado de proteínas proinflamatorias en comparación con una cepa neurotópica, en condiciones basales.

7. Objetivos

Objetivo general

Cuantificar el contenido de proteínas relacionadas con un proceso inflamatorio en el suero y en el hipocampo de adultos, y en cerebros embrionarios totales de ratones con fenotipo autista.

Objetivos particulares

- Determinar el contenido de las citocinas TNF- α e IFN- γ , así como de la quimiocina MCP-1 en el hipocampo de ratones adultos de la cepa C58/J y en cerebros totales de fetos de ratón en el E18.
- Determinar del contenido hipocampal y cerebral de las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y arginasa 1 (ARG1) en ratones adultos y fetos en el E18.
- Determinar el contenido de las citocinas TNF- α e IFN- γ en el suero de machos adultos y de madres gestantes.
- Identificar polimorfismos de nucleótido único en genes relacionados con la identidad de la microglía y la neuroinflamación en el genoma de los ratones de la cepa C58/J a través de un análisis *in silico*.

8. Procedimiento experimental

8.1 Animales

Las cepas de ratones C58/J (con fenotipo autista) y C57BL/6J (neurotópica, B6/J), adquiridas en The Jackson Laboratory (Maine, E.U.A), se mantuvieron en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) hasta su uso. Ahí permanecieron en sistemas de cajas ventiladas individualmente bajo condiciones estándar (temperatura media $22 \pm 2^\circ \text{C}$; $40 \pm 10\%$ de humedad relativa; ciclo de luz:oscuridad 12:12), sobre una cama de aserrín estéril (ENVIGO). Los ratones fueron amamantados durante las tres primeras semanas de vida, y recibieron una dieta comercial peletizada (TG Rodent Diet T2018S.15, ENVIGO) y agua *ad libitum* durante las siete semanas posteriores.

El mantenimiento y uso de animales se realizó bajo las especificaciones dictadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio). La realización de este proyecto está avalada por el Comité Institucional del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL; ID: 189).

8.2 Obtención de tejidos frescos y de suero para la cuantificación de citocinas y de proteínas proinflamatorias

Para obtener el suero de las madres gestantes y de los ratones macho de diez semanas de edad de las cepas B6/J y C58/J, se realizó una punción en la vena facial y se colectó la sangre total (~ 0.5 ml). Se dejó reposar la sangre en hielo durante 2 h para permitir la formación del coágulo; posteriormente, se separó el paquete celular por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se colectó el suero y se mantuvo a -70 °C hasta su uso.

Se obtuvo el peso de cada ratón macho de diez semanas de edad previo a su sacrificio. Para obtener el tejido hipocampal de los ratones macho de diez semanas de edad de ambas cepas, se extrajo quirúrgicamente el cerebro y se disecaron el hipocampo (bilateral), el bazo y el hígado tras haber sido anestesiados y sacrificados de acuerdo con los Lineamientos para la Eutanasia en Animales de la Asociación Médica Veterinaria de Estados Unidos (Leary et al., 2013). Se obtuvieron los pesos en seco de los tejidos y se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento.

Para obtener los cerebros totales de fetos en el E18 de ambas cepas, las hembras fueron sacrificadas por dislocación. Posteriormente, los fetos fueron removidos quirúrgicamente.

Los hipocampos de los ratones de ambas cepas se homogenizaron en 500 µl de amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas (RIPA; Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, SDS 0.1%) o en 300 µl de amortiguador de lisis para ELISA (Tris-HCl 20 mM, sacarosa 0.25 M, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM, Triton X-100 1%) adicionado con inhibidores de proteasas. Las proteínas se obtuvieron por centrifugación a 14,000 rpm, a 4 °C durante 30 minutos. Las proteínas totales de cada homogenizado se cuantificaron por el método colorimétrico de Bradford en un espectrofotómetro EPOCH para microplacas (Biotek; Winooksi, VT, E.U.A.). Los homogenizados se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

8.2.1 ELISA

El contenido de TNF- α , IFN- γ y MCP-1 se determinó en el hipocampo de los ratones de diez semanas de edad de ambas cepas (n = 6) por el método de ELISA de sándwich según las instrucciones del fabricante, utilizando 50 µl de muestra por pozo (dilución 1:2) (DuoSet® ELISA Development Systems, R&D Systems). Adicionalmente, TNF- α e IFN- γ se cuantificaron en el suero de los ratones macho de diez semanas de edad de ambas cepas por el mismo método, así como en los sueros de las hembras gestantes en el E18, utilizando 25 µl de muestra por pozo (dilución 1:4). Las placas de 96 pozos fueron sensibilizadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos

de captura correspondientes. Las muestras se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en placas previamente bloqueadas (PBS-Tween 20® 0.05%, BSA 0.5%). Posteriormente, las placas se incubaron con los anticuerpos de detección correspondientes durante toda la noche a 4°C. Después se incubaron las placas con el complejo HRP-estreptavidina durante 30 min a temperatura ambiente. Los complejos antígeno-anticuerpo-HRP se detectaron mediante una reacción colorimétrica utilizando una solución de revelado (TMB:H₂O₂, 1:1). Se dejó proceder la reacción durante 30 min. Finalmente se añadió la solución de paro (H₂PO₄ 2 N) y se cuantificaron las muestras por densidad óptica a 450 nm y a 570 nm en un espectrofotómetro EPOCH para microplacas (Biotek; Winooksi, VT, E.U.A.).

Entre cada paso, posterior a la adición del anticuerpo de captura, se realizaron 3 lavados con 200 µl por pozo usando una solución de lavado (PBS-Tween 20® 0.05%). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Las sensibilidades de detección fueron de 31.25 pg/ml para las muestras de suero (dilución 1:4) y 15.62 pg/ml para las muestras de tejido (dilución 1:2).

8.2.2 Electroforesis en gel y *Western blot*

Los homogenizados de hipocampo (n = 6) o de cerebros totales de embrión (n=3) fueron adicionados con buffer de Laemmli y se incubaron a 100 °C durante 5 minutos. Se agregó homogenizado de bazo como control positivo para el contenido de iNOS. Las proteínas (200 µg) fueron separadas por SDS-PAGE en geles de 10% para la cuantificación de iNOS a 90 mV durante 4 h. Se incluyó el marcador de peso molecular preteñido Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, California, E.U.A.). El contenido del gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia semiseca, durante 7 horas a 40 mA.

Posteriormente, la membrana se bloqueó con albúmina 2% y leche descremada 5%, durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con los anticuerpos primarios IgG monoclonal de ratón anti-iNOS (1:500; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) a 4 °C durante 48 h.

Finalmente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón (1:20,000; abcam, Reino Unido) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), durante 60 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate; Thermo Scientific; Massachusetts, E.U.A) y la membrana se reveló por autorradiografía.

Para evaluar el control de carga, los complejos antígeno-anticuerpo presentes en la membrana se disociaron a través de un cambio de pH, incubando la membrana con amortiguador ácido de glicina (pH 2.5) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloqueó la membrana como se indicó previamente y se incubó con IgG monoclonal de ratón anti-Tubulina α (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) a 4 °C durante toda la noche. Luego se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón (1:20,000; abcam, Reino Unido) conjugado a

peroxidasa de rábano (HRP), durante 60 minutos a temperatura ambiente, y se reveló como se mencionó previamente.

Entre cada paso del proceso posterior a la electrotransferencia, la membrana se lavó 3 veces, 5 minutos por vez, con TBS-Tween 20 0.1% en agitación y a temperatura ambiente.

8.3 Análisis *in silico* de polimorfismos de nucleótido único en la cepa C58/J

Se realizó un escaneo del genoma completo a partir de la información recuperada de la base de datos pública de Mouse Phenome Database (MPD; <https://phenome.jax.org/>) (RRID:SCR_003212) utilizando como referencia el conjunto de datos UCLA1 (Eskin E. SNP data, 132,000+ locations for 248 inbred and RI strains of mice. MPD:UCLA1. Mouse Phenome Database web resource (RRID:SCR_003212), The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. <https://phenome.jax.org>). Se obtuvieron los genes con polimorfismos nucleótido único (SNP), conservando sólo aquellos sitios con una anotación funcional

Con los datos obtenidos, se realizó un tamizaje con los chips de genes propuestos por Butovsky y colaboradores (Butovsky et al., 2014), y por Madore y colaboradores (Madore et al., 2014), los cuales contienen 400 genes (MG400) responsables de dar identidad a la microglía en humanos y en ratones, y 150 genes adicionales (MG550) que son relevantes para la respuesta inflamatoria, respectivamente. Para verificar la presencia de estos SNP, se analizaron los *loci* de los genes identificados originalmente a partir del conjunto de datos de UCLA1, que además presentan un enriquecimiento en la microglía, utilizando el conjunto de datos de Sanger4 (Wellcome Trust Sanger Institute. Sanger SNP and indel data, 89+ million locations, 37 inbred strains of mice. MPD:Sanger4. Mouse Phenome Database web resource (RRID:SCR_003212), The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. <https://phenome.jax.org>).

Con los genes identificados a partir de la comparación con MG400 y MG550, se realizó un análisis de ontología de genes utilizando la herramienta GOnet (<https://tools.dice-database.org/>) (Pomaznoy et al., 2018) para identificar los procesos biológicos en los que participan los genes con SNPs identificados. Se mostraron sólo aquellos procesos biológicos con un valor de significancia de $q \leq 0.05$.

Finalmente, aquellos genes relevantes para la identidad de la microglía que contienen polimorfismos en la cepa murina C58/J con fenotipo autista fueron ingresados en la base de datos de Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI; <https://gene.sfari.org/>) para obtener coincidencias sobre el riesgo asociado de cada gen con la aparición de alguna forma de TEA.

9. Resultados

9.1 Medición de la masa cerebral durante el desarrollo embrionario y cuantificación de citocinas proinflamatorias en cerebros totales de fetos y en el suero de hembras gestantes en el E18

Previamente se ha reportado que los sujetos con autismo exhiben un sobrecrecimiento cerebral durante las etapas posnatales tempranas seguido de un marcado declive de la masa encefálica hacia la adolescencia y la adultez temprana (Courchesne et al., 2011), por lo cual se buscó obtener mediciones de la masa cerebral de los ratones con fenotipo autista en el E18 junto con la masa corporal para obtener una tasa comparativa entre estas dos medidas morfométricas. Se observó que existe un aumento del 44.1% en la tasa masa cerebral/masa corporal en los ratones con fenotipo autista en el E18, cuando se le compara con ratones neurotípicos en el mismo día embrionario (B6/J: 0.0544 ± 0.0129 , C58/J: 0.0784 ± 0.0055 ; $p = 0.0006$) (**Fig. 6A**).

Para identificar alteraciones inmunológicas en las etapas prenatales del desarrollo, se obtuvieron cerebros totales de fetos en el E18 de ambas cepas y se homogenizaron para obtener extractos de proteínas. Se observó que existe una disminución en el contenido de TNF- α (B6/J: 0.5029 ± 0.0704 , C58/J: 0.4071 ± 0.0657 pg/mg de tejido; $p = 0.0220$) (**Fig. 6B**) y de IFN- γ (B6/J: 0.2946 ± 0.0632 , C58/J: 0.2270 ± 0.0226 pg/mg de tejido; $p = 0.0207$) (**Fig. 6C**) en los cerebros totales de los fetos de la cepa con fenotipo autista en esta etapa del desarrollo, cuando se utiliza la masa del tejido para normalizar el contenido de citocinas. Por otra parte, observamos que sólo el contenido de IFN- γ presenta una disminución en el cerebro total de los fetos de la cepa C58/J, en comparación con la cepa control, cuando se normaliza la cantidad de citocinas con relación a la cantidad de proteínas totales en las mismas muestras (**Anexo II**).

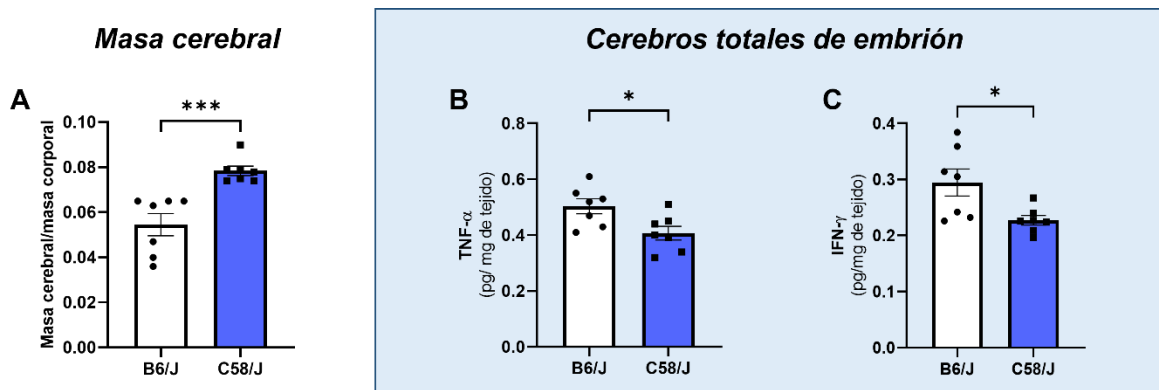


Figura 6. Los ratones con fenotipo autista muestran un aumento en la masa cerebral y una disminución en el contenido de TNF- α e IFN- γ en el E18. **A)** Comparación de la masa cerebral contra la masa corporal en ratones neurotípicos (B6/J) y con fenotipo autista (C58/J) en el día embrionario 18 (E18). El análisis estadístico se realizó empleando una prueba U de Mann-Whitney. *** $p = 0.0006$. Cuantificación del contenido cerebral de las citocinas **B)** TNF- α e **C)** IFN- γ . El análisis estadístico se realizó empleando una prueba t de Student de dos colas, para muestras no pareadas. * $p < 0.05$. Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; $n = 7$ en cada cepa.

Debido a que observaciones epidemiológicas (Atladóttir et al., 2010) y en modelos animales (Careaga et al., 2017; Knuesel et al., 2014) han reportado una relación entre la activación inmune materna y la aparición de trastornos del neurodesarrollo, incluido el TEA, decidimos analizar el contenido de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ en el suero de las hembras gestantes con fenotipo autista en el E18, y se le comparó con hembras gestantes neurotípicas.

Los resultados indican que el contenido sérico de TNF- α en la mayoría de las hembras gestantes de ambas cepas mostró ser indetectable con la técnica empleada en el E18 (límite de detección: 31.25 pg/ml) (**Fig. 7A**). Por su parte, se observó que existe un ligero pero significativo aumento en el contenido sérico de IFN- γ en las hembras gestantes con fenotipo autista en el E18, comparadas con hembras neurotípicas (B6/J: 69.24 ± 0.3486 , C58/J: 70.10 ± 0.4412 pg/ml; $p = 0.0092$) (**Fig. 7B**).

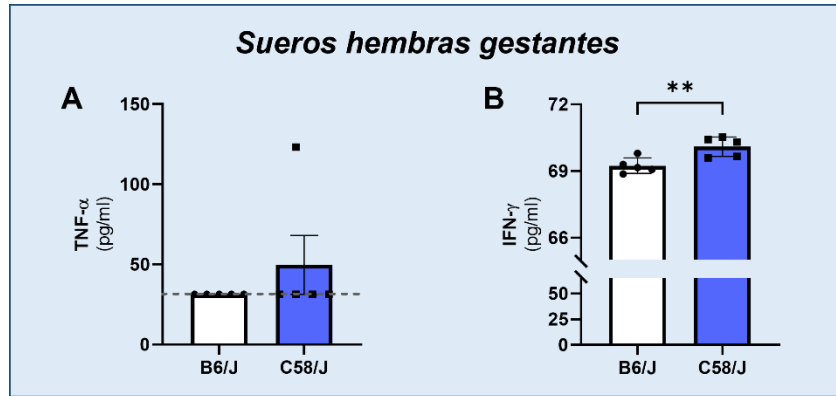


Figura 7. Las hembras gestantes con fenotipo autista presentan alteraciones sistémicas en el contenido de citocinas proinflamatorias en el E18. Cuantificación de la concentración sérica de las citocinas **A**) TNF- α e **B**) IFN- γ en hembras gestantes neurotípicas (B6/J) y con fenotipo autista (C58/J) en el día embrionario 18 (E18). Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; $n = 5$. La línea punteada representa el límite de detección para este ensayo (31.25 pg/ml). El análisis estadístico se realizó empleando una prueba t de Student de dos colas, para muestras no pareadas. * $p = 0.0092$.

9.2 Determinación del contenido de las enzimas iNOS y Arg1 en cerebros totales de fetos en el E18

Para conocer si existen posibles alteraciones en el balance del estado homeostático y el estado inflamatorio en los cerebros de los ratones con fenotipo autista durante el desarrollo embrionario, se determinó el contenido de las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y arginasa 1 (ARG1) a partir de homogenizados de cerebros totales.

Se observó que no existen diferencias en el contenido de la enzima iNOS (B6/J: 1.770 ± 1.027 , C58/J: 1.763 ± 1.230 ; $p = 0.8571$) (Fig. 8A y 8B), así como en el contenido de la enzima ARG1 (B6/J: 0.8977 ± 0.7786 , C58/J: 0.9646 ± 0.8384 ; $p > 0.99$) (Fig. 8A y 8C) en los cerebros de los ratones con fenotipo autista en el E18.

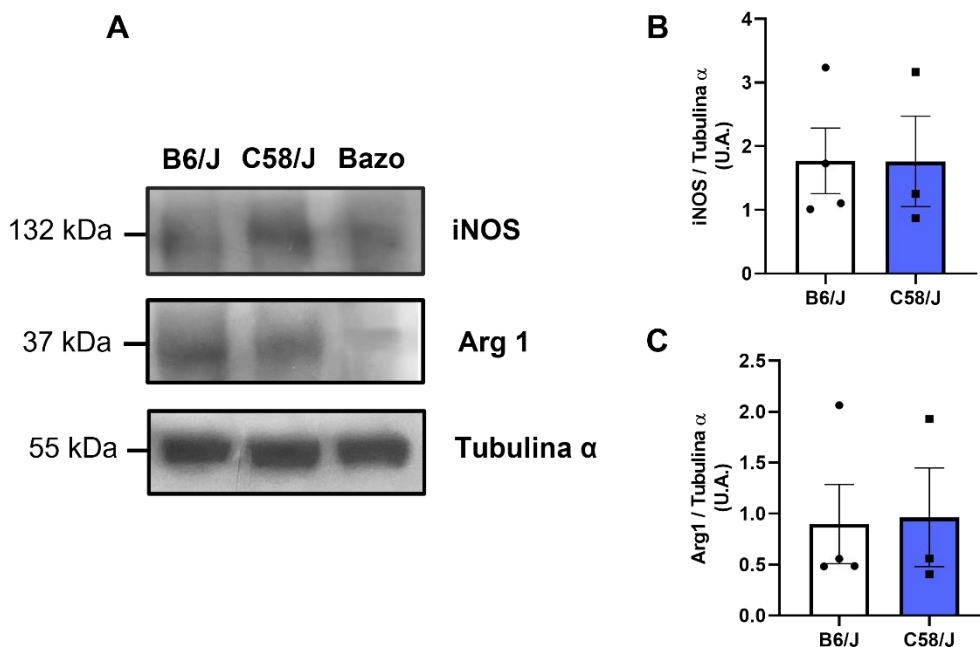


Figura 8. Cuantificación del contenido de las enzimas iNOS y ARG1 en cerebros totales de ratones con fenotipo autista en el E18. Imágenes representativas de *Western blot* de las enzimas **A**) iNOS (132 kDa) y **C**) ARG1 (37 kDa) en cerebros totales de los ratones neurotípicos (B6/J) y con fenotipo autista (C58/J) en el día embrionario 18 (E18). Se utilizaron homogenizados de bazo de ratones macho adultos como control positivo para la expresión de las enzimas y se usó a la proteína tubulina α (55 kDa) como control de carga. Análisis densitométricos de los *Western blots* para las enzimas **B**) iNOS y **D**) ARG1. Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; $n = 4$ (B6/J), $n = 3$ (C58/J). El análisis estadístico se realizó empleando una prueba U de Mann-Whitney.

9.3 Cuantificación de citocinas proinflamatorias en el hipocampo y en el suero de los ratones adultos

Con el fin de determinar si las características de neuroinflamación se conservaban o no en los adultos, se colectaron los cerebros de ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista, así como de la cepa B6/J como control neurotípico, a las diez semanas de edad. Utilizando una balanza analítica, se obtuvo la masa de los cerebros completos, así como del hipocampo con la finalidad de normalizar la cantidad de citocinas en relación con el peso del tejido. Se observó que los ratones de la cepa C58/J presentan una disminución significativa en la masa cerebral, comparados con la cepa control (B6/J: 440.6 ± 22.42 , C58/J: 388.44 ± 9.762 mg; $p = 0.0014$) (**Fig. 9A**), lo que se refleja en la tasa de la masa cerebral/masa corporal (B6/J: 0.0187 ± 0.0009 , C58/J: 0.0172 ± 0.0007 ; $p = 0.0387$) (**Fig. 9B**), sin efectos en la tasa de la masa hipocampal/masa cerebral (B6/J: 0.1078 ± 0.0323 , C58/J: 0.0907 ± 0.0366 ; $p = 0.4568$) (**Fig. 9C**).

Se diseccionó el hipocampo a partir de los cerebros de ambas cepas, y en estos se cuantificó el contenido de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IFN- γ , así como de la quimiocina MCP-1 (CCL2). Se observó que existe un aumento significativo en el contenido hipocampal de IFN- γ (B6/J: 0.6320 ± 0.2050 , C58/J: 0.9540 ± 0.2123 pg/mg de tejido; $p = 0.0406$) (Fig. 9E) y de MCP-1 (B6/J: 0.4240 ± 0.1438 , C58/J: 0.6780 ± 0.1494 pg/mg de tejido; $p = 0.0255$) (Fig. 9F), mientras que existe una tendencia a aumentar en el contenido de TNF- α (B6/J: 0.5300 ± 0.1840 , C58/J: 0.7980 ± 0.1988 pg/mg de tejido; $p = 0.0579$) cuando se utiliza la masa del tejido para normalizar el contenido de citocinas (Fig. 9D). Por otra parte, observamos que no existen diferencias en el contenido hipocampal de TNF- α , de IFN- γ o de MCP-1 cuando se normaliza en relación con la cantidad de proteínas totales en las mismas muestras analizadas (Anexo II).

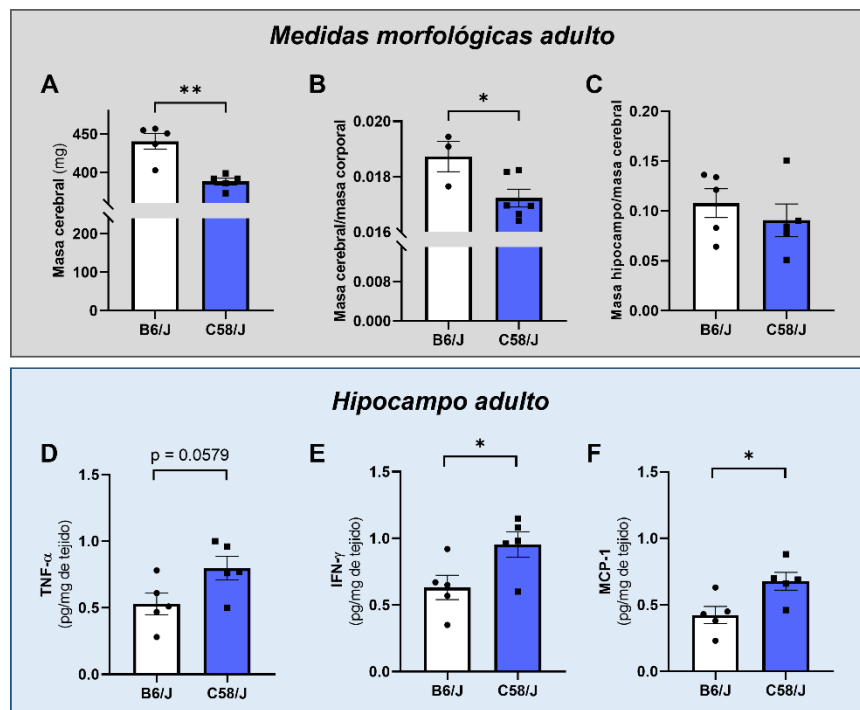


Figura 9. Los ratones macho adultos de la cepa C58/J presentan una disminución de la masa cerebral, y aumento en el contenido hipocampal de IFN- γ y MCP-1, y una tendencia al aumento de TNF- α . Comparación de **A)** la masa cerebral, **B)** la tasa de la masa cerebral/masa corporal y **C)** la tasa de la masa hipocampal/masa cerebral de los ratones macho neurotípicos (B6/J) y con fenotipo autista (C58/J) a las diez semanas de edad. Cuantificación del contenido de **D)** TNF- α , **E)** IFN- γ y **F)** MCP-1 en el hipocampo de los ratones de ambas cepas a las diez semanas de edad. Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; $n = 5$ ($n = 3$, B6/J en masa cerebral/masa corporal). El análisis estadístico se realizó empleando la prueba t de Student de dos colas, para muestras no pareadas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Por otra parte, se determinó el contenido de las citocinas TNF- α e IFN- γ en el suero de ratones macho de diez semanas de edad con el fin de detectar un fenómeno inflamatorio de forma sistémica en los ratones con fenotipo autista. Se observó una tendencia a aumentar en el contenido de TNF- α en el suero de los ratones con fenotipo autista cuando se les compara con los ratones neurotípicos (B6/J: 192.6 ± 8.744 , C58/J: 204.1 ± 8.482 pg/ml; $p = 0.0678$) (Fig. 10A), mientras que los niveles séricos de IFN- γ se encuentran por debajo del límite de detección del ensayo empleado para ambas cepas (límite de detección: 31.25 pg/ml) (Fig. 10B).

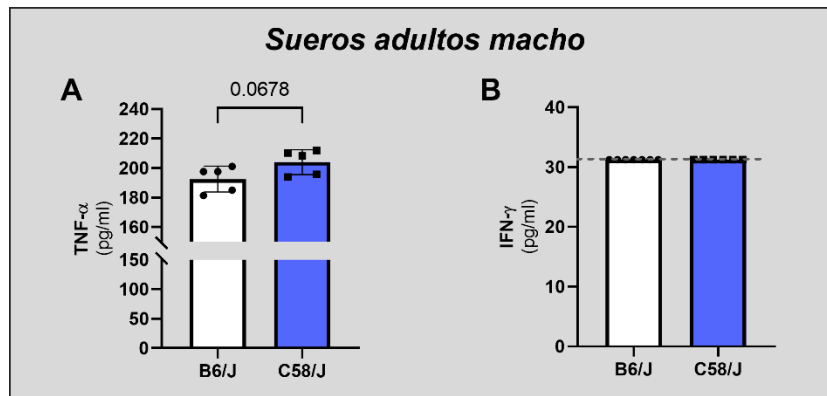


Figura 10. Los ratones con fenotipo autista muestran una tendencia al aumento en el contenido sérico de TNF- α . Cuantificación del contenido sérico de las citocinas **A)** TNF- α e **B)** IFN- γ en los ratones macho neurotípicos (B6/J) y con fenotipo autista (C58/J) a las diez semanas de edad. La gráfica representa la media \pm E.E.M.; $n = 5$. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba t de Student de dos colas, para muestras no pareadas.

9.4 Determinación del contenido de las enzimas iNOS y ARG1 en el hipocampo de los ratones con fenotipo autista

De la misma forma que se hizo para los ratones en el E18, y con el fin de trazar una trayectoria en el desarrollo de un posible proceso inflamatorio en los ratones con fenotipo autista, particularmente en el hipocampo, se determinó el contenido de las enzimas iNOS y ARG1 a partir de homogenizados de tejido.

No se observaron diferencias en el contenido hipocampal de iNOS en los ratones macho adultos con fenotipo autista, comparados con los ratones neurotípicos (B6/J: 0.5084 ± 0.0846 , C58/J: 0.6216 ± 0.1032 ; $p = 0.1407$) (Fig. 11A y 11B).

Por otro lado, se observó que existe una disminución en el contenido hipocampal de la enzima ARG1 en los ratones macho adultos de la cepa con fenotipo autista, comparada con la cepa neurotípica (B6/J: 3.958 ± 0.3996 , C58/J: 3.373 ± 0.3360 ; $p = 0.0367$) (Fig. 11C y 11D).

Hipocampo adulto

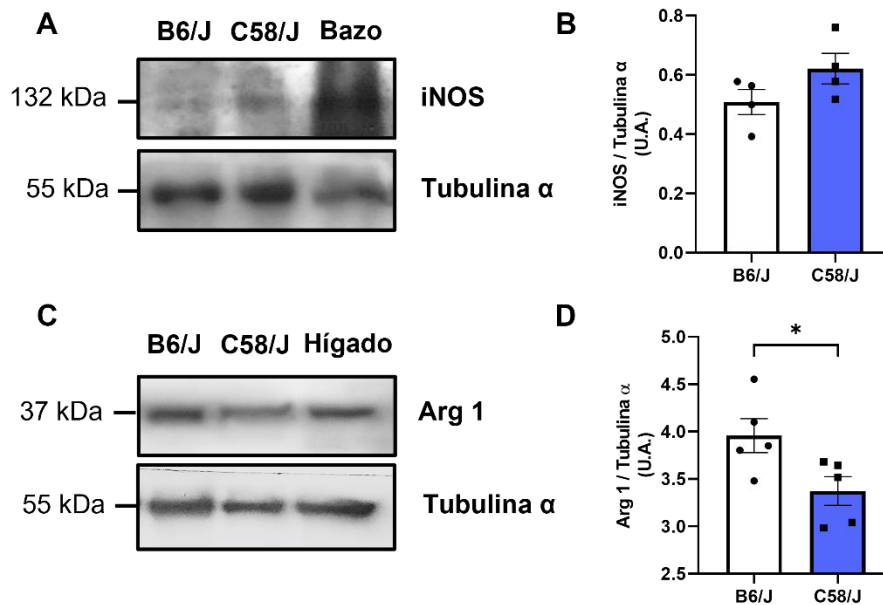


Figura 11. Los ratones con fenotipo autista presentan una disminución en el contenido hipocampal de la enzima antiinflamatoria ARG1. Imágenes representativas de *Western blot* de las enzimas **A)** iNOS y **C)** ARG1 en el hipocampo de los ratones macho neurotípicos (B6/J) y con fenotipo autista (C58/J) a las diez semanas de edad. Se utilizaron homogenizados de bazo e hígado de ratones macho adultos como control positivo para la expresión de iNOS y ARG1, respectivamente. Se usó a la proteína tubulina α (55 kDa) como control de carga. Análisis densitométricos de los *Western blots* para las enzimas **B)** iNOS y **D)** ARG1. Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; $n = 4$, en por lo menos dos ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba t de Student de dos colas, para muestras no pareadas. * $p < 0.05$.

9.5 La cepa murina C58/J con fenotipo autista presenta polimorfismos en genes relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmunológica

Resultados previos de nuestro laboratorio hallaron que existen polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en 454 genes cuando se compara el genoma de forma global entra la cepa con fenotipo autista (C58/J) y una cepa neurotípica como control (B6/J) (Barón-Mendoza et al., 2021). Para ello, se realizó un escaneo general del genoma de ambas cepas de ratones en busca de SNPs utilizando el conjunto de datos UCLA1 (MPD:624; <https://phenome.jax.org/>).

Para identificar cuáles de estos genes son relevantes para la identidad y la fisiología de la microglía, así como en procesos inflamatorios, se realizó un tamizaje de aquellos genes que presentan SNPs en la cepa, tomando como referencia los chips MG400 y MG550 propuestos con anterioridad (Butovsky et al., 2014; Madore et al., 2014). Se identificaron once genes que son relevantes para la identidad de la microglía que poseen SNPs cuando se compara la cepa C58/J

con la cepa neurotópica B6/J (**Tabla 3**). Además, se identificaron nueve genes que participan en la respuesta inmunológica que contienen SNPs en la cepa murina C58/J (**Tabla 3**). La presencia de estos polimorfismos fue confirmada a través del conjunto de datos de Sanger4 (MPD:388; <https://phenome.jax.org/>), corroborando la presencia de más de un polimorfismo en algunos de los genes identificados (**Anexo I**).

Con el fin de conocer en qué procesos biológicos están involucrados los genes relevantes para la identidad de la microglía y la inflamación que contienen SNPs en la cepa murina C58/J con fenotipo autista, se realizó un análisis de enriquecimiento de términos de *gene ontology* (GO).

Observamos que algunos de los genes con SNPs en esta cepa participan en procesos regulatorios importantes como la regulación del transporte de proteínas, la regulación de la secreción de la producción y secreción de citocinas, así como la regulación de la secreción de citocinas y de la migración celular (**Fig. 12A y 12B**), todos procesos muy relevantes en la iniciación y el mantenimiento de la respuesta inmune.

De manera interesante, algunos de estos genes mostraron estar relacionados también con procesos vinculados al neurodesarrollo como la guía axonal, la dirección de proyecciones neuronales, la diferenciación neuronal y la neurogénesis (**Fig. 12C**), sugiriendo posibles vías convergentes para las alteraciones inmunológicas y los cambios de la citoarquitectura neuronal previamente reportados en la cepa murina C58/J por nuestro grupo (Barón-Mendoza et al., 2021).

Tabla 3. Análisis de enriquecimiento de genes con polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en la cepa C58/J que son relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmunitaria.

<i>Término GO Biological process</i>	<i>Uniprot ID</i>	<i>Símbolo del gen</i>	<i>Nombre del gen</i>	<i>Gen ortólogo en humanos</i>	<i>Uniprot ID</i>	<i>SFARI score</i>
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25	Q91ZX7	Lrp1	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	<i>LRP1</i>	Q07954	2
6, 7, 11	Q8BH24	Tm9sf4	Transmembrane 9 superfamily member 4	<i>TM9SF4</i>	Q92544	1
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 21, 24	P51682	Ccr5	C-C chemokine receptor type 5	<i>CCR5</i>	P51681	
1, 2, 3, 4, 8, 10, 13, 16, 17, 19, 20, 22, 23	P70206	Plxna1	Plexin-A1	<i>PLXNA1</i>	Q9UIW2	
1, 2, 3, 4, 8, 10, 13, 16, 19, 20, 22, 23	P28828	Ptpm	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu	<i>PTPRM</i>	P28827	
1, 2, 3, 4, 8, 13, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 24	Q8K0S5	Rtn4rl1	Reticulon-4 receptor-like 1	<i>RTN4RL1</i>	Q86UN2	
1, 2, 3, 4, 8, 17	Q9ER74	Sall1	Sal-like protein 1	<i>SALL1</i>	Q9NSC2	
1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 10, 14, 15, 18, 21	P05480	Src	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	<i>SRC</i>	P12931	
1, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 18, 21, 25	P06684	Hc	Complement C5	<i>C5</i>	P01031	
1, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 15	O70394	Il27ra	Interleukin-27 receptor subunit alpha	<i>IL27RA</i>	Q6UWB1	
2, 3, 4, 8, 16	O55106	Strn	Striatin	<i>STRN</i>	Q9NRL3	
5	P25799	Nfkb1	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	<i>NFKB1</i>	P19838	

26	O35149	<i>Slc30a4</i>	Zinc transporter 4	<i>SLC30A4</i>	O14863
*	Q8BIZ6	<i>Snip1</i>	<i>Smad nuclear-interacting protein 1</i>	<i>SNIP1</i>	Q8TAD8
*	Q8K2I4	<i>Manba</i>	Beta-mannosidase	<i>MANBA</i>	O00462
*	Q6QLQ4	<i>Clec7a</i>	C-type lectin domain family 7 member A	<i>CLEC7A</i>	Q9BXN2
*	Q6PDK0	<i>Zbtb39</i>	Zinc finger and BTB domain-containing 39	<i>ZBTB39</i>	O15060
*	Q8BIZ6	<i>Snip1</i>	<i>Smad nuclear-interacting protein 1</i>	<i>SNIP1</i>	Q8TAD8
*	Q8K088	<i>Zbtb6</i>	Zinc finger and BTB domain-containing protein 6	<i>ZBTB6</i>	Q15916
*	Q14AE4	<i>Wfdc3</i>	WAP four-disulfide core domain protein 3	<i>WFDC3</i>	Q14508
*	Q9QUS9	<i>Reg3d</i>	Reg III delta	n.d.	-
*	B1B213	<i>H60c</i>	Histocompatibility antigen 60c	n.d.	-

Lista de términos GO. Biological processes. **1:** regulation of developmental process, **2:** nervous system development, **3:** generation of neurons, **4:** neurogenesis, **5:** regulation of cytokine production, **6:** regulation of protein transport, **7:** regulation of peptide transport, **8:** neuron differentiation, **9:** regulation of cytokine secretion, **10:** regulation of cell migration, **11:** positive regulation of protein transport, **12:** positive regulation of cytokine production, **13:** chemotaxis, **14:** regulation of protein secretion, **15:** regulation of peptide secretion, **16:** neuron projection development, **17:** regulation of neuron differentiation, **18:** positive regulation of cytokine secretion, **19:** axon guidance, **20:** neuron projection guidance, **21:** positive regulation of protein secretion, **22:** axogenesis, **23:** cell morphogenesis involved in neuron differentiation, **24:** negative regulation of neuron projection development, **25:** regulation of chemokine secretion, **26:** ion homeostasis.

Puntaje SFARI. 1: alta confianza para desarrollar TEA; 2: candidato fuerte.

* Genes sin enriquecimiento en términos GO de procesos biológicos relacionados con la activación inmune y la homeostasis cerebral.

n.d. Genes ortólogos en humanos no identificados.

Finalmente, identificamos que dos de los genes relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inflamatoria con SNPs en la cepa murina C58/J poseen ortólogos en humanos cuyas mutaciones se han relacionado con un riesgo aumentado de presentar TEA.

El gen *Lrp1*, que codifica para un receptor a múltiples ligandos endógenos que se encuentra involucrado en la degradación de moléculas extracelulares a través de la vía endolisosomal (Strickland & Holtzman, 2019), presenta el mayor número de interacciones, pues se relaciona con 25 términos GO de procesos biológicos en el análisis realizado (**Tabla 3**). Al hacer un cruce con la base de datos de SFARI (<https://gene.sfari.org/>), se observó que el gen *LRP1* en humanos (ortólogo de *Lrp1* en ratones) posee un puntaje de riesgo para presentar TEA de 2 (candidato fuerte) (**Tabla 3**).

Asimismo, el gen *Tm9sf4*, cuyo producto actúa como una proteína chaperona que regula la localización membranal de proteínas con dominios ricos en glicina durante la vía secretora temprana (Perrin et al., 2015; Vernay et al., 2018), mostró estar enriquecido en tres procesos biológicos que incluyen regulación del transporte de proteínas (GO:0051223) y péptidos (GO:0090087). Al analizar la base de datos de SFARI, se halló que el gen *TM9SF4* posee un puntaje de riesgo para presentar TEA de 1 (alta confianza) (**Tabla 3**), indicando que posee una fuerte asociación con la aparición de algunas formas de TEA según la evidencia en la literatura (De Rubeis et al., 2014; Satterstrom et al., 2020).

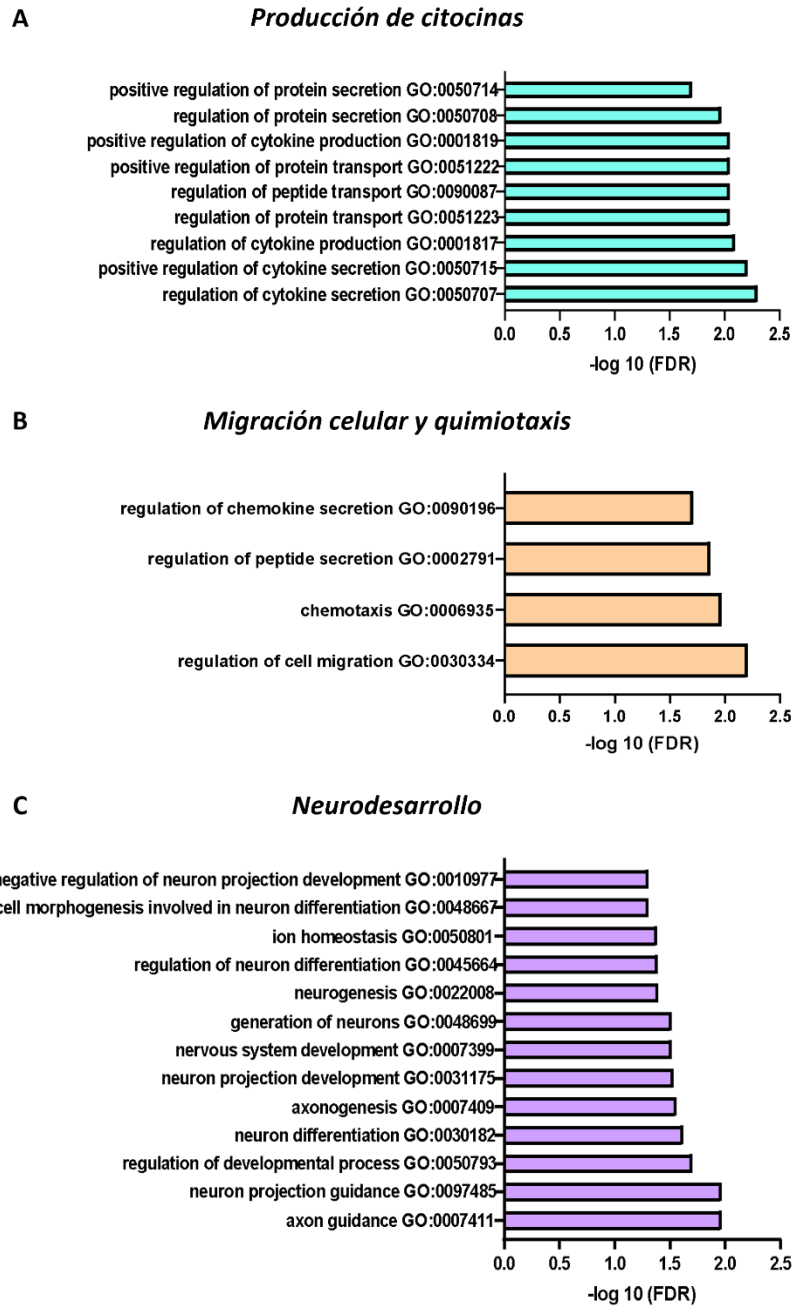


Figura 12. Análisis de enriquecimiento GO de los genes relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmune con SNPs en la cepa C58/J. Tras filtrar los 454 genes que presentan SNPs en la cepa C58/J utilizando los chips MG400 y MG550 se recuperaron 22 genes con funciones relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmune. Estos genes se analizaron usando la plataforma GOnet (<https://tools.dice-database.org/>) (Pomaznoy et al., 2018) para obtener enriquecimientos de procesos biológicos vinculados con la migración y el reclutamiento celular, la producción y la liberación de citocinas, la comunicación celular, la quimiotaxis, el desarrollo del SNC y la homeostasis celular. Los resultados del enriquecimiento se expresan como $-\log_{10}$ del valor ajustado de P, FDR.

10. Discusión

Las alteraciones inmunológicas son un fenómeno ampliamente documentado en sujetos con TEA (Ashwood, Corbett, et al., 2011; Onore et al., 2012; Pardo et al., 2005; Vargas et al., 2005). Se ha propuesto que estas alteraciones inmunológicas, junto con factores ambientales y factores genéticos de riesgo, pueden subyacer la etiología de un porcentaje de casos de TEA idiopático (Heidari et al., 2021), por lo que conocer la interacción entre estos múltiples factores es clave para el entendimiento de los cambios cerebrales y conductuales observados en los sujetos con estos trastornos.

Los mediadores inmunológicos pueden modular las funciones de poblaciones celulares relevantes para la fisiología del SNC, como los astrocitos y la microglía (Matta et al., 2019; Zeidán-Chuliá et al., 2014). Sin embargo, también se conoce que ciertas citocinas tienen la propiedad de modular de forma directa la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica en diferentes regiones del SNC (Janach et al., 2020; Pati & Kash, 2021), así como de regular procesos de plasticidad sináptica (Maggio & Vlachos, 2018), e incluso de potenciar fenómenos de muerte neuronal por excitotoxicidad (Bliss et al., 2011), señalando su relevancia en el estudio de trastornos psiquiátricos y del neurodesarrollo.

El SNC tiene la capacidad de detectar los procesos inflamatorios en la periferia a través de varias vías que incluyen la estimulación del nervio por citocinas, a través de la circulación en los órganos circunventriculares y a través del transporte de citocinas producidas periféricamente hacia el cerebro (Dantzer et al., 2008), pero también pueden ser producidas localmente por células de la glía como astrocitos y microglía (Guzmán-Ruiz et al., 2022; Shabab et al., 2017), por lo cual es importante resaltar su estudio tanto en la periferia como en el SNC para conocer sus respectivas contribuciones a las alteraciones observadas en los modelos animales de autismo idiopático.

La cepa murina C58/J con fenotipo autista muestra cambios en la masa cerebral a lo largo del desarrollo

Como se mencionó anteriormente, los sujetos con TEA muestran una trayectoria alterada del desarrollo del SNC que se manifiesta a través de un aumento del 5-10% del volumen cerebral durante la niñez temprana (Amaral et al., 2008), que se normaliza durante la adolescencia (8-16 años) pero comienza a declinar rápidamente en la adultez temprana, en comparación con sujetos neurotípicos de las mismas edades (Courchesne et al., 2011). Nuestras observaciones muestran que los ratones de la cepa murina C58/J presenta un aumento en la masa cerebral en el E18 (**Fig. 6A**).

Algunos estudios en sujetos con TEA han hipotetizado que este aumento en el tamaño del volumen se relaciona con un aumento en el número de neuronas debido a deficiencias en la activación de vías apoptóticas durante el refinamiento estructural del cerebro en etapas

posnatales tempranas (Courchesne et al., 2011). Si bien no se tiene evidencia directa de este fenómeno, el análisis histológico en la subplaca cortical, una estructura esencial para la formación de las primeras neuronas durante el neurodesarrollo, en muestras *post mortem* de sujetos adolescentes y adultos con TEA mostró una mayor densidad de neuronas en esta región (Avino & Hutsler, 2021); señalando dos posibilidades no mutuamente excluyentes: 1) una densidad neuronal de por sí aumentada, o 2) una disminución en la tasa de apoptosis de estas neuronas en los sujetos con TEA. No obstante, se requieren más estudios para profundizar en las causas y los mecanismos de los cambios que observamos en la cepa C58/J en este trabajo.

Por su parte, nosotros reportamos que los ratones macho de la cepa C58/J de 10 semanas de edad, exhiben una disminución en la masa cerebral comparados con una cepa neurotípica (**Fig. 9A**). Un estudio previo analizó el volumen cerebral de ratones de la cepa C58/J de entre 9-10 semanas de edad, hallando diferencias región-específicas en comparación con la cepa control (Wilkes et al., 2019). De manera interesante, se reportó que los ratones C58/J presentan un aumento volumétrico en regiones como la comisura anterior, el cuerpo calloso y el hipocampo; mientras que presentan una disminución en el volumen de la corteza orbital, la corteza motora primaria, el giro dentado y en los ganglios basales en general (Wilkes et al., 2019).

Se ha propuesto que las vías moleculares que regulan la apoptosis podrían estar involucradas en los cambios del volumen cerebral observados en los sujetos con TEA durante la adultez (Wei et al., 2014). Por ejemplo, varios estudios han identificado consistentemente una reducción en el contenido de la proteína anti-apoptótica linfoma de células B2 (BCL-2) en muestras de diferentes regiones del SNC en sujetos con TEA (Fatemi et al., 2001; Fatemi & Halt, 2001), acompañada de una reducción en el contenido de BDNF, una proteína clave para regular la sobrevivencia y diferenciación neuronal, en la corteza frontal de sujetos con TEA (Sheikh et al., 2010).

Nuestro laboratorio ha reportado que existe una disminución en el contenido hipocampal de BDNF en los ratones macho de diez semanas de edad de la cepa C58/J (Barón-Mendoza et al., 2021), señalando que un aumento en la activación de vías apoptóticas puede estar involucrado en la reducción del tamaño cerebral que hallamos en los ratones macho adultos de esta cepa; sin embargo, resta por determinar si las deficiencias en vías de señalización que promueven la sobrevivencia y la muerte neuronal se encuentran igualmente alteradas en los ratones adultos de la cepa C58/J.

Los ratones macho adultos de la cepa C58/J con fenotipo autista tienen un contenido aumentado de IFN- γ y MCP-1 en el hipocampo, con una tendencia de TNF- α a aumentar

Tanto TNF- α como IFN- γ presentan una elevación de su contenido en el LCR y en la corteza frontal en los sujetos con TEA (Chez et al., 2007; Li et al., 2009). Es de resaltar que no existen estudios que hayan evaluado estas proteínas en el hipocampo de humanos con TEA.

Por lo anterior, decidimos analizar el contenido de las citocinas TNF- α e IFN- γ en homogenizados de hipocampo de los ratones macho adultos de la cepa C58/J, y los comparamos con los de una cepa neurotípica. Observamos que IFN- γ muestra un aumento significativo de contenido en los ratones con fenotipo autista (**Fig. 9E**), mientras que TNF- α muestra una marcada tendencia a aumentar en esa misma región (**Figs. 9D**), señalando una regulación al alta de las vías proinflamatorias en el hipocampo de estos ratones.

IFN- γ es el único miembro de la familia de los interferones tipo II y sus funciones clásicamente se asocian a la estimulación de células presentadoras de antígenos (APC) y a la activación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4⁺, principalmente con un perfil Th1 (Deczkowska et al., 2016). IFN- γ señala a través de su receptor IFN γ R, que se compone de dos cadenas de unión al ligando IFN γ R1 que se asocian con dos cadenas transductoras de la señal IFN γ R2 (Schroder et al., 2004). IFN γ R1/2 carecen de actividad enzimática intrínseca, y canónicamente ejercen sus efectos intracelulares activando a la tirosina cinasa Janus 1 (JAK1) y al factor transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1), el cual, tras ser activado, puede formar homodímeros o heterodímeros con otras STAT para translocarse al núcleo y promover o inhibir la expresión de genes regulados por interferón (Schroder et al., 2004). IFN- γ regula la expresión de genes que participan en la misma vía de señalización que activa, como los factores reguladores de interferón (IRF) 1-9, los cuales a su vez son factores de transcripción que regulan la expresión de genes secundarios que contienen elementos de respuesta a la estimulación por interferón (ISRE) (Paludan & Paludan, 1998) como los genes que codifican para iNOS y ARG1 (Endo et al., 2022).

La presencia de IFN- γ puede impactar de forma negativa en las funciones y en el desarrollo del SNC. Por ejemplo, en experimentos *in vitro* utilizando células progenitoras neurales (NPC) derivadas de células troncales pluripotentes inducidas de humanos (hiPSC) neurotípicos se observó que la estimulación transitoria con IFN- γ promueve una mayor longitud de las neuritas al día *in vitro* (DIV) 30, con una mayor ramificación de las neuritas, de forma análoga a lo que los autores observan en neuronas diferenciadas a partir de hiPSC de sujetos con TEA (Warre-Cornish et al., 2020). La estimulación con IFN- γ en estas neuronas recién diferenciadas además promueve la expresión de genes de riesgo que se asocian con el TEA (Warre-Cornish et al., 2020), trazando una correlación positiva entre la presencia de IFN- γ y un fenotipo neuronal característico del TEA.

Nuestro grupo, sin embargo, ha descrito un fenómeno opuesto en los ratones macho adultos de la cepa C58/J, pues estos presentan un árbol dendrítico de menor longitud en el hipocampo (Barón-Mendoza et al., 2019), indicando que IFN- γ puede no estar ejerciendo un efecto similar, por lo menos en esta etapa de la vida de los animales. Por otra parte, al analizar cultivos primarios de neuronas hipocampales derivadas de los ratones C58/J en el E18, nuestro grupo ha observado que éstas presentan basalmente una mayor longitud promedio de las neuritas en comparación con neuronas de una cepa neurotípica (Guzmán-Vázquez, en preparación), indicando que un

mecanismo similar al que fue descrito por Warre-Cornish y colaboradores (2021) puede estar actuando en estos ratones durante la etapa gestacional, por lo cual son necesarios futuros experimentos que analicen la abundancia de IFN γ R1/2 y sus efectos sobre las neuronas de estos ratones durante el desarrollo.

De manera interesante, un desbalance entre la señalización de interferones tipo I e IFN- γ en la interfase cerebro-periferia, como lo plexos coroideos, se ha propuesto como uno de los mecanismos que vinculan a la neuroinflamación crónica con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Deczkowska et al., 2016), señalando la relevancia de la señalización por estas citocinas para la homeostasis del SNC; sin embargo, su relación con en el TEA es menos clara.

Nosotros, además, buscamos identificar diferencias en el perfil de activación inmune en el hipocampo de los ratones de la cepa C58/J a través del contenido de iNOS y de ARG1, dos enzimas que se regulan de la mano con las respuestas M1/M2 (Th1/Th2). Observamos que mientras no existen cambios en el contenido de iNOS en el hipocampo de los ratones macho adultos de la cepa C58/J (**Figs. 11A y 11B**), existe una disminución en el contenido de ARG1 esa misma región (**Fig. 11C y 11D**). Al respecto, la presencia de IL-4, una citocina antiinflamatoria con una potente actividad antagonista de IFN- γ (Paludan & Paludan, 1998), puede regular negativamente la expresión de iNOS en líneas celulares de macrófagos, aún en presencia de IFN- γ (Endo et al., 2022), indicando un posible mecanismo por el cual no observamos cambios en los niveles de iNOS a pesar de tener un contenido hipocampal de IFN- γ aumentado.

Además, la presencia simultánea de IL-4 como de IFN- γ modulan sinérgica y positivamente la expresión de ARG1 en esa misma línea celular de macrófagos (Endo et al., 2022). Asumiendo que IL-4 de hecho se encuentra aumentada en el hipocampo de estos ratones, nosotros observamos un efecto contrario al que se ha reportado *in vitro* al tener un contenido reducido de ARG1. No obstante, cabe resaltar que la complejidad de las interacciones *in vivo* juega un papel importante en los desenlaces que observamos a nivel de la expresión de genes en células individuales, por lo cual se requieren experimentos adicionales para determinar si existe un contenido basalmente aumentado de IL-4 y de otras citocinas antiinflamatorias en el cerebro de estos ratones que pudiera explicar los cambios que reportamos a nivel de la expresión de iNOS y ARG1.

TNF- α es una proteína homotrimérica de 157 aminoácidos que puede hallarse en su forma soluble (sTNF- α) o unida a la membrana celular (mTNF- α) (Jang et al., 2021). La citocina TNF- α puede señalizar a través de los receptores a factor de necrosis tumoral 1 y 2 (TNFR1/2), los cuales se expresan diferencialmente en las células, siendo TNFR1 expresado de forma ubicua en todas las células del cuerpo, mientras que TNFR2 se expresa sobre células del sistema inmune y células epiteliales (Chu, 2013). La señalización a través de estos receptores tiene efectos múltiples como

inducir apoptosis, la producción de citocinas o dar señales de sobrevivencia pues podría activar tanto la vía intracelular de I-kappa B (Ik-B)/NF- κ B como la de vía de las MAPK/AP-1 (Chu, 2013).

La citocina TNF- α participa en el escalamiento de sinapsis excitatorias en el hipocampo a través de incrementar la localización de receptores AMPA en la superficie celular al mismo tiempo que reduce la inserción de receptores GABA_A en la membrana celular (Stellwagen et al., 2005; Stellwagen & Malenka, 2006), señalando que TNF- α puede fortalecer la transmisión sináptica a través de favorecer las interacciones glutamatérgicas, pero también puede promover el daño neuronal por excitotoxicidad (Stellwagen et al., 2005). Por lo anterior, es necesario determinar si el contenido aparentemente elevado de TNF- α en el hipocampo de estos ratones tiene efectos sobre la expresión de receptores sinápticos y sobre la potenciación a largo plazo (LTP).

Hemos observado que la microglía presenta un aumento de densidad en la región CA1 del hipocampo de los ratones macho adultos de la cepa C58/J (Duarte-Campos, en preparación), además de que se agregan con mayor densidad en la capa piramidal en esa misma región del hipocampo (Vázquez-Moreno, 2022), lo cual plantea la posibilidad de 1) un incremento en la proliferación de estas células, o 2) un fenómeno de quimiotaxis celular que contribuye a la agregación que observamos en esta región del cerebro.

MCP-1 (o CCL2), un miembro de la familia de quimiocinas C-C, es un péptido de 76 aminoácidos y 13 kDa de masa molecular con una potente actividad reclutadora de macrófagos y otras células mieloides (K. Zhang & Luo, 2019). Esta quimiocina ejerce sus efectos a través de su receptor acoplado a proteínas G, CCR2, el cual tras ser activado transduce su señal principalmente a través de la proteína 1 inducida por la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCPIP1) que puede regular la transcripción de MCP-1, TNF- α e IL-1 β (K. Zhang & Luo, 2019).

Por lo anterior, decidimos evaluar el contenido hipocampal de MCP-1 con el fin de explorar la posibilidad de que exista un fenómeno de migración aumentada de la microglía en esta región. Observamos que existe un aumento significativo de la proteína MCP-1 en el hipocampo de los ratones macho adultos de la cepa C58/J (**Fig. 9F**).

En el caso de sujetos con TEA, se ha reportado que MCP-1 se encuentra aumentado en regiones como la corteza del cíngulo anterior y el cerebelo y en el LCR en individuos con TEA (Vargas et al., 2005), señalando similitudes entre estos y la cepa murina C58/J.

Es de resaltar que estudios en tejidos *post mortem* de individuos con TEA han descrito un arreglo espacial más próximo de la microglía con neuronas piramidales de la CPF (Morgan et al., 2012), y la formación de clústeres de microglía en la corteza temporal de estos individuos (Lee et al., 2017) de manera similar a lo que observamos en el hipocampo de los ratones de la cepa C58/J.

Una dieta materna alta en calorías durante la gestación conlleva a un aumento de la respuesta inmune en los productos, además de cambios volumétricos en el cerebelo y en la corteza

somatosensorial primaria, favoreciendo a su vez el desarrollo de conductas sociales atípicas y de ansiedad (Maldonado-Ruiz et al., 2022). Este efecto parece estar mediado, en parte, por MCP-1 pues la administración sistémica de anticuerpos neutralizadores de esta quimiocina restaura los parámetros antes mencionados a niveles comparables con los controles (Maldonado-Ruiz et al., 2022), sugiriendo que esta quimiocina puede tener una robusta implicación en los cambios cerebrales y conductuales en la cepa C58/J.

Finalmente, la inducción de un estado inflamatorio en contextos patogénicos tiene la capacidad de reducir la expresión de moléculas neurotróficas como BDNF y de inducir cambios conductuales en los animales, los cuales se recuperan tras suprimir las señales inflamatorias mediante manipulaciones genéticas o mediante tratamientos farmacológicos (Mangano et al., 2012; C. Zhang et al., 2019). De manera interesante, nuestro laboratorio ha descrito que los ratones macho adultos de la cepa C58/J muestran una disminución en el contenido hipocampal de BDNF (Barón-Mendoza et al., 2021), demostrando más aún la presencia de un proceso neuroinflamatorio que regula a la baja la expresión de moléculas relacionadas con la plasticidad y la sobrevivencia neuronal en los ratones macho adultos de esta cepa.

Los ratones de la cepa murina C58/J con fenotipo autista presentan una disminución en el contenido cerebral de TNF- α e IFN- γ en el E18

A pesar de que se conocen muy bien las funciones canónicas de las citocinas proinflamatorias en la periferia durante la respuesta inmunológica, se ha propuesto que pueden tener roles duales durante el desarrollo embrionario, dada su naturaleza pleiotrópica, abriendo la posibilidad de que desempeñen funciones fisiológicas de formas tiempo- y célula-específica (Estes & McAllister, 2016; Ferro et al., 2021).

En este trabajo determinamos el contenido de IFN- γ y de TNF- α en cerebros totales de los ratones de la cepa C58/J con fenotipo autista y de la cepa B6/J como control en E18. Observamos que existe una disminución en el contenido de ambas citocinas en el cerebro de los ratones con fenotipo autista (**Figs. 6B y 6C**).

En este sentido, el suprimir la señalización por IFN- γ durante los primeros días posnatales (P0-P4) en ratones, tiene la propiedad de alterar la neurogénesis hipocampal y causar deficiencias cognitivas en la adultez temprana al inducir el eje Sonic hedgehog (Shh)/BDNF en el hipocampo de ratón (G. Wang et al., 2021), señalando que la presencia de esta citocina en etapas tempranas del neurodesarrollo puede modular positivamente el establecimiento de los circuitos hipocampales. Evidencia adicional proviene de los ratones desnudos BALB/c, que poseen una inmunodeficiencia primaria de linfocitos T, pues exhiben alteraciones en la sociabilidad y conductas repetitivas complejas (Bauer-Negrini et al., 2022). En estos ratones además se observa una disminución en la expresión de IFN- γ en la CPF comparados con ratones control (Bauer-

Negrini et al., 2022), sugiriendo una relación de la expresión de esta citocina con el establecimiento de circuitos neuronales, y el desarrollo de conductas típicas en los animales.

De igual manera, TNF- α puede tener un papel relevante en el desarrollo fisiológico del SNC. Por ejemplo, en ratones *knockout* para TNF- α (*TNF^{-/-}*) y sus receptores (*TNFR1/2^{-/-}*) se ha reportado que existen deficiencias en la memoria espacial medida a través de la prueba del laberinto de Barnes (Camara et al., 2013). Al mismo tiempo, los ratones *TNF^{-/-}* y los ratones *TNFR2^{-/-}* muestran una disminución en el contenido del factor de crecimiento nervioso (NGF) en el hipocampo y en la CPF, sin cambios en la expresión de BDNF (Camara et al., 2013) indicando que la señalización basal por TNF- α /TNFR2 es necesaria para una la expresión de este factor de crecimiento en estas regiones del cerebro.

En este sentido, se ha propuesto el papel de TNFR2 como neuroprotector en patologías del SNC. La estimulación de TNFR2 en la microglía de ratón en cultivos primarios promueve la producción de factores solubles antiinflamatorios como el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) e IL-10 (Veroni et al., 2010), a su vez que este receptor tiene efectos protectores contra la excitotoxicidad *in vitro* e *in vivo* (Papazian et al., 2021), y el uso de un antagonista específico de TNFR2 mostró la capacidad de disminuir el depósito de péptidos de β -amiloide y mejorar la cognición en un modelo murino de Alzheimer (Ortí-Casañ et al., 2022), sin embargo, su participación en el contexto del TEA requerirá futuras y cuidadosas investigaciones.

Lo anterior demuestra que la presencia de TNF- α basalmente es necesaria para estimular la formación de circuitos y para el establecimiento de conductas típicas relacionadas con la memoria espacial en los animales. Al respecto, se conoce que la cepa C58/J tiene un pobre desempeño en la prueba del laberinto de T (Moy et al., 2008) que evalúa la memoria de trabajo y ciertos aspectos de la memoria espacial (McHugh & Bannerman, 2010) reforzando la idea de que las deficiencias en el contenido de TNF- α en el E18 pueden impactar la memoria, particularmente en esta cepa. Futuros estudios relacionando la baja expresión de TNF- α en esta etapa del desarrollo con las deficiencias en la memoria y el aprendizaje de la cepa C58/J son necesarios.

Mediante análisis *in silico* se ha determinado que el promotor del gen que codifica para EphB2, un receptor clave durante el desarrollo del SNC y para la plasticidad sináptica (Arvanitis & Davy, 2008), contiene varios elementos de respuesta al factor de transcripción NF- κ B, uno de los efectores intracelulares canónicamente activados por TNF- α , señalando un posible vínculo entre la señalización de TNF- α y su actividad como regulador del desarrollo neuronal (Pozniak et al., 2014).

Todo lo anterior en conjunto indica que las citocinas IFN- γ y TNF- α cumplen funciones fisiológicas durante el desarrollo y en la adultez que pueden relacionarse con la supervivencia y la diferenciación neuronal, así como la transmisión sináptica en el cerebro intacto. Esto indica que una disminución en su contenido cerebral durante la etapa embrionaria, como observamos en los ratones de la

cepa C58/J, puede tener efectos negativos sobre la conectividad neuronal, la actividad sináptica y la conducta de los animales en la vida adulta.

De forma interesante, observamos que, al normalizar el contenido de las citocinas contra el contenido de proteínas totales, sólo IFN- γ muestra la diferencia antes descrita en los cerebros de fetos en el E18 (**Anexo II**), resaltando la relevancia de esta citocina en esta etapa del desarrollo. Por otro lado, algunos estudios han señalado la importancia de utilizar la cantidad total de proteínas para normalizar el contenido de mediadores inflamatorios (Zhou et al., 2010); sin embargo, es de resaltar que utilizar este método de normalización puede eliminar la variación entre sujetos experimentales que puede ser valiosa cuando se intenta modelar fenómenos biológicos complejos (Marks et al., 2012), por lo cual, ampliar el número de sujetos experimentales de cada grupo puede ayudar a profundizar en el análisis de estas diferencias.

Además, analizamos el contenido de las enzimas iNOS y ARG1 como una aproximación inicial para conocer si existe una polarización del perfil de activación inmunológica en el cerebro embrionario de la cepa murina C58/J, hallando que no existen cambios en el contenido de éstas en el cerebro total de los ratones con fenotipo autista, por lo menos en el E18 (**Figs. 8A-8C**). Estos resultados sugieren, por un lado, que estos genes pueden estar regulados de forma diferente durante el desarrollo embrionario y su expresión puede no estar influenciada por mediadores inmunológicos clásicos en esta etapa; o que, de hecho, un tipo de respuesta antiinflamatoria puede estar activa y moderando la expresión de estas enzimas, así como de IFN- γ y TNF- α . De esta manera, resta por caracterizar la expresión de citocinas antiinflamatorias, como IL-4, IL-10 y TGF- β , en el cerebro de los ratones con fenotipo autista en esta etapa embrionaria.

Cabe señalar que es necesario determinar el contenido de estas citocinas y de estas enzimas de forma región-específica para conocer más a fondo sobre su papel particular en la regulación del desarrollo de distintas estructuras del SNC.

Las hembras gestantes de la cepa murina C58/J presentan un aumento en el contenido sérico de IFN- γ

Se ha propuesto que la MIA puede impactar de manera importante en la aparición de trastornos del neurodesarrollo. Esto se puede deducir a partir de datos epidemiológicos donde la presencia de infecciones virales durante el primer trimestre del embarazo se asocia positivamente con la incidencia de TEA en el producto (Atladóttir et al., 2010). Inducir un estado inflamatorio en las hembras gestantes experimentalmente tiene un efecto sobre la conducta y la expresión de genes relacionados con la inflamación en el cerebro de las crías (Carlezon et al., 2019).

Para evaluar si un fenómeno similar ocurre en la cepa murina C58/J con fenotipo autista, analizamos el contenido sérico de TNF- α e IFN- γ en el suero de las madres gestantes en el día E18. Hallamos que las hembras gestantes presentan un aumento ligero pero significativo en el

contenido sérico de IFN- γ , comparadas con hembras gestantes de la cepa neurotópica (**Fig. 7B**), mientras que el contenido de TNF- α no fue detectable a la dilución y con la técnica empleadas aquí (**Fig. 7A**).

La respuesta inmune tipo Th1 y la expresión de IFN- γ se regula a la baja de manera general durante la gestación, sin embargo, el contenido plasmático de esta citocina en estados perinatales próximos a la labor de parto disminuyen significativamente en comparación con otros momentos de la gestación (Veith & Rice, 1999). Nosotros, sin embargo, observamos que esta citocina se encuentra elevada en el suero de las hembras gestantes en una etapa muy próxima al término, señalando que estas hembras presentan una respuesta basalmente hiperactiva que persiste a lo largo de la gestación.

Curiosamente, un estado inflamatorio en la madre puede estimular a macrófagos de las membranas fetales, induciendo la producción de citocinas proinflamatorias, principalmente TNF- α e IL-1, conllevando a un parto prematuro (Ravanos et al., 2015). Nuestras observaciones cualitativas en los ratones de la cepa C58/J indican que las hembras presentan partos prematuros en la mayoría de los casos, en comparación con la cepa control, indicando una posible relación entre el estado inflamatorio de las ratonas gestantes y la biología de la cepa.

En modelos murinos experimentales, la administración de poli-I:C en el E12.5 ocasiona MIA e induce una reducción en la densidad de espinas dendríticas en la corteza cerebral de los productos, con una reducción de la transmisión sináptica en esa área, acompañado de conductas repetitivas (Coiro et al., 2015). En la cepa C58/J, nuestro laboratorio ha descrito que existe una reducción en la densidad de espinas dendríticas en la CPF, y en general una reducción en la proporción de espinas dendríticas con un fenotipo maduro en la CPF y el hipocampo (Barón-Mendoza et al., 2021), por lo que hipotetizamos inicialmente que el estado inflamatorio de las madres podría estar impactando en la citoarquitectura neuronal de los productos en la cepa C58/J. Nuestra evidencia, sin embargo, señala que existe una disminución en el contenido de TNF- α y de IFN- γ en el cerebro de los fetos en el E18 (**Figs. 6B y 6C**), indicando que existen mecanismos adicionales que se encuentran regulando la producción de estas citocinas en el cerebro de los fetos, por lo menos en el E18.

Futuros experimentos evaluando la concentración de citocinas tanto en el suero materno como en el cerebro de los fetos permitirá describir la cinética de la producción de éstas, para conocer a fondo su relación con el desarrollo cerebral de la cepa C58/J.

TNF- α muestra una tendencia a aumentar en el suero de ratones macho adultos de la cepa C58/J

Un porcentaje de los sujetos con TEA muestra alteraciones inmunológicas que son rastreables a través de citocinas y quimiocinas aumentadas en concentración en el suero y en el plasma (Ashwood, Krakowiak, et al., 2011b; Matta et al., 2019). Por ello, decidimos evaluar si los ratones de la cepa C58/J presentan alteraciones similares en muestras de suero. Observamos que

TNF- α presenta una tendencia a aumentar en el suero de los ratones macho con fenotipo autista (**Fig. 10A**), lo cual no se reflejó de igual forma para IFN- γ (**Fig. 10B**).

Aunque las implicaciones de una desregulación inmunológica en tejidos periféricos en el contexto del TEA aún no han sido descifradas por completo, existen varias líneas de evidencia sobre sus efectos deletéreos y su relación con otros componentes del TEA (Matta et al., 2019).

Por ejemplo, un contenido aumentado de citocinas puede modificar la permeabilidad de la BHE, un fenómeno que se ha descrito en los sujetos con TEA (Fiorentino et al., 2016). De igual forma, se sabe que una variedad de autoanticuerpos dirigidos contra epítomos del SNC se encuentran presentes en el plasma de niños con TEA (Mazur-Kolecka et al., 2014; Singer et al., 2006; Singh et al., 1997), además de aumentos en la cantidad de proteínas del SNC circulantes en sangre como S100 β (Shaker et al., 2016; Tomova et al., 2019) y GFAP (J. Wang et al., 2017), reforzando la idea de que la integridad de la BHE en estos individuos se encuentra comprometida como una posible consecuencia el aumento sistémico de citocinas.

Resultará de interés evaluar la integridad basal de la BHE, así como la presencia de autoanticuerpos en el plasma de los ratones de la cepa C58/J con el fin de trazar paralelismos entre esta cepa y las observaciones en humanos con TEA.

La cepa C58/J presenta SNPs en genes relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmune

Nuestro grupo previamente ha descrito la presencia de SNPs en 454 genes de la cepa C58/J que se relacionan con procesos biológicos diversos entre los que destacan la plasticidad sináptica, la dinámica del citoesqueleto neuronal y el neurodesarrollo (Barón-Mendoza et al., 2021). En este trabajo utilizamos los chips de genes MG400 y MG550 (Butovsky et al., 2014; Madore et al., 2020), que agrupan aproximadamente 500 genes únicos que se relacionan con la identidad de la microglía y la respuesta inmune, con el fin de conocer cuáles de los genes con SNPs en la cepa participan además en estos procesos.

Identificamos once genes que son relevantes para la identidad de la microglía y nueve genes que participan en la respuesta inmune (**Tabla 3**) que contienen SNPs en la cepa C58/J. Al realizar un enriquecimiento de términos de ontología de genes, observamos que estos participan en una diversidad de procesos que involucran la producción y secreción de citocinas y quimiocinas, y el neurodesarrollo (**Fig. 12A**).

De manera interesante, al comparar los veinte genes con SNPs en la cepa C58/J que participan en la diferenciación de la microglía y en la respuesta inmune con la base de datos de SFARI Gene, la cual reúne genes que se han reportado asociados al TEA, y les asigna un puntaje de confianza de acuerdo con el grado de evidencia que existe sobre su implicación en el trastorno (De Rubeis et al., 2014; Feliciano et al., 2019; Iossifov et al., 2014; Torricco et al., 2019), observamos que los

genes *Tm9sf4* y *Lrp1* poseen ortólogos en humanos (*TM9SF4* y *LRP1*, respectivamente) que han sido catalogados como genes de riesgo para desarrollar TEA.

La proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP1) es una proteína glicosilada transmembranal tipo I receptor conformada por una cadena α extracelular de 515 kDa unida a la membrana celular mediante interacciones no covalentes con la cadena β transmembranal de 85 kDa (L. Yang et al., 2016), y regula el metabolismo de más de cuarenta ligandos endógenos, incluyendo a la apolipoproteína E (ApoE) y β -amiloide (Strickland & Holtzman, 2019) y se han descrito varias vías por las cuales puede modular la activación inmune en el SNC.

Por ejemplo, su deficiencia en macrófagos periféricos *in vivo* regula a la baja la expresión de marcadores de la respuesta tipo M2, y promueve un tipo de respuesta tipo M1 (May et al., 2013). Más aún, el antagonizar su activación en cultivos primarios de microglía tiene la propiedad de inducir la activación de la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y de NF- κ B, además de potenciar la producción de citocinas como TNF- α e IL-1 β y aumentar la sensibilidad de estas células a estímulos como LPS (L. Yang et al., 2016), señalando que LRP1 tiene un rol importante en la regulación de la respuesta inmune en macrófagos, incluida la microglía. A pesar de que todos los SNPs del gen *Lrp1* identificados en la cepa C58/J corresponden a variaciones codificantes sinónimas (**Anexo I**), se requieren más experimentos para conocer su participación en la modulación de la activación de la microglía y la respuesta inmune en el SNC de estos ratones.

La proteína 4 de la superfamilia de 9 dominios transmembranales (TM9SF4), por su parte, es una proteína perteneciente a la familia TM9 que se asocian a motivos transmembranales ricos en glicina y promueve su localización hacia la membrana plasmática, actuando como una proteína chaperona en la vía secretora desde el aparato de Golgi (Perrin et al., 2015; Vernay et al., 2018). Abatir su expresión en macrófagos periféricos *in vivo* puede producir una polarización hacia un perfil M1 y suprimir el perfil de respuesta tipo M2 en el contexto de la enfermedad inflamatoria intestinal (Xie et al., 2022), sin embargo, su participación en procesos del SNC no ha sido descrita, por lo que caracterizar la contribución de los SNPs de este gen al fenotipo de la cepa C58/J resulta de interés para futuras investigaciones.

11. Limitaciones del estudio

El uso de animales para el modelado de fenómenos complejos, como trastornos psiquiátricos y del neurodesarrollo en humanos, representa un reto debido a la heterogeneidad de estas condiciones en el propio humano. La interpretación de los datos deberá realizarse con cautela para poder hallar similitudes potencialmente extrapolables entre el modelo y la condición humana.

En este estudio hemos identificado que existen diferencias en el contenido de citocinas proinflamatorias en la cepa de ratones C58/J, un modelo murino de autismo que ha sido caracterizado conductualmente. Cabe mencionar que los datos obtenidos en embriones deben ser interpretados de manera cuidadosa debido a la heterogeneidad dada por el uso de cerebros completos, enmascarando posibles diferencias sutiles que sean región-específicas, además de que los datos aquí presentados en el caso de los fetos han agrupado tanto a hembras como a machos, añadiendo una capa adicional de incertidumbre.

En el caso de las citocinas en el hipocampo adulto sólo hemos presentado datos obtenidos a partir de machos, por lo que la incorporación de hembras a estos estudios enriquecerá de forma importante el entendimiento de la cepa C58/J como modelo para el estudio del autismo, considerando las marcadas diferencias en la prevalencia de estos trastornos que se observa entre hombres y mujeres.

Por último, será necesario correlacionar los datos que indican un estado neuroinflamatorio con las conductas tipo autistas que caracterizan a la cepa C58/J como un modelo para su estudio, lo cual no ha sido incluido en el presente estudio, siendo esto uno de los principales objetivos para hallar posibles mecanismos que vinculen a las alteraciones inmunes con cambios en la conducta en el contexto del TEA.

12. Conclusiones

Conclusión general

Los ratones de la cepa murina C58/J presentan alteraciones en la respuesta inmunológica que se manifiesta a través de una disminución en el contenido de IFN- γ y de TNF- α durante el desarrollo embrionario, y un posterior aumento en el contenido hipocampal de IFN- α y MCP-1, con una tendencia a aumentar de TNF- α , durante la adultez temprana, acompañados de cambios en el contenido sérico de TNF- α .

Conclusiones particulares

- Los ratones de la cepa C58/ con fenotipo autista J muestran alteraciones en la trayectoria del desarrollo del sistema nervioso central que se relaciona con una disminución de la masa cerebral durante el desarrollo embrionario y un aumento de ésta hacia la décima semana de edad, cuando se les compara con una cepa neurotípica.
- Mostramos que los ratones macho adulto de la cepa C58/J presentan alteraciones que se relacionan con un proceso neuroinflamatorio a través de:
 - Un aumento en el contenido hipocampal de IFN- γ y de MCP-1.
 - Una disminución en el contenido hipocampal de ARG1.
 - Una tendencia al aumento del contenido sérico e hipocampal de TNF- α .
- Los ratones de la cepa C58/J presentan alteraciones durante el neurodesarrollo que podrían vincularse con un tipo de respuesta antiinflamatoria cerebral debido a que exhiben un contenido disminuido de las citocinas TNF- α e IFN- γ en el cerebro total.
- Las hembras gestantes de la cepa C58/J presentan un aumento en la respuesta proinflamatoria basalmente, pues presentan un aumento en el contenido sérico de IFN- γ .
- Los ratones de la cepa C58/J presentan polimorfismos de nucleótido único en genes que se relacionan con la identidad de la microglía y la respuesta inmune, dos de los cuales (*Lrp1* y *Tm9sf4*) poseen ortólogos en humanos que han sido reportados como genes de riesgo para desarrollar trastorno del espectro autista.

13. Perspectivas

- Correlacionar la presencia de un proceso neuroinflamatorio en el cerebro de los ratones C58/J con los cambios conductuales observados en la cepa.
- Analizar las vías celulares anti-apoptóticas (BCL-2) y pro-apoptóticas (BAX, PUMA) en los cerebros embrionarios y adultos de ratones C58/J y su posible relación con cambios en el volumen cerebral.
- Analizar la relación de los receptores IFN γ R1/2 con posibles cambios en la elongación y el desarrollo de neuritas, en el cerebro embrionario y adulto de los ratones C58/J.
- Investigar sobre cambios en la proporción basal de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10 y TGF- β 1) en el cerebro de los ratones C58/J.
- Evaluar registros electrofisiológicos en el hipocampo de los ratones C58/J y relacionarlo con los cambios observados en el contenido de citocinas que inducen excitotoxicidad, como TNF- α e IL-1 β .
- Evaluar si los cambios en el contenido de citocinas son prevalentes en etapas del desarrollo anteriores al E18.
- Evaluar si el restablecimiento de TNF- α puede tener efectos favorables sobre la memoria espacial en los ratones de la cepa C58/J.
- Determinar el contenido de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10 y TGF- β 1) de forma región-específica en cerebros embrionarios de ratones C58/J.
- Evaluar el contenido de citocinas en el suero materno de ratonas C58/J en diferentes puntos de la gestación.
- Determinar la presencia de proteínas del SNC, así como de autoanticuerpos en el suero de los ratones C58/J y correlacionarlo con los cambios conductuales observados en la cepa.
- Evaluar las propiedades bioquímicas que inducen los SNPs identificados sobre las proteínas Lrp1 y Tm9sf4, y determinar si causan alteraciones en sus funciones que se relacionen con un fenotipo relevante para el TEA en la cepa C58/J.

14. Referencias

- Abou-Donia, M. B., Suliman, H. B., Siniscalco, D., Antonucci, N., ElKafrawy, P., & Brahmajothi, M. V. (2019). De novo blood biomarkers in autism: Autoantibodies against neuronal and glial proteins. *Behavioral Sciences, 9*(5), 1–17. <https://doi.org/10.3390/bs9050047>
- Ahmad, S. F., Nadeem, A., Ansari, M. A., Bakheet, S. A., Alasmari, F., Alasmari, A. F., Al-Kharashi, L. A., Al-Qahtani, Q. H., & Attia, S. M. (2019). The potent immunomodulatory compound VGX-1027 regulates inflammatory mediators in CD4+ T cells, which are concomitant with the prevention of neuroimmune dysregulation in BTBR T+ Itpr3tf/J mice. *Life Sciences, 237*(May), 116930. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116930>
- Aimone, J. B., Deng, W., & Gage, F. H. (2011). Resolving New Memories: A Critical Look at the Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron, 70*(4), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.010>
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience, 10*(12), 1538–1543. <https://doi.org/10.1038/nn2014>
- Amaral, D. G. (2002). The primate amygdala and the neurobiology of social behavior: Implications for understanding social anxiety. In *Biological Psychiatry* (Vol. 51, Issue 1, pp. 11–17). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01307-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01307-5)
- Amaral, D. G., & Lavenex, P. (2007). Hippocampal Neuroanatomy. In P. Andersen, R. Morris, D. G. Amaral, T. Bliss, & J. O'Keefe (Eds.), *The hippocampus book* (pp. 37–114). Oxford University Press.
- Amaral, D. G., Schumann, C. M., & Nordahl, C. W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends in Neurosciences, 31*(3), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.005>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th ed.). American Psychiatric Publishing. <https://doi.org/10.1016/B0-12-657410-3/00457-8>
- Arora, M., Reichenberg, A., Willfors, C., Austin, C., Gennings, C., Berggren, S., Lichtenstein, P., Anckarsäter, H., Tammimies, K., & Bölte, S. (2017). Fetal and postnatal metal dysregulation in autism. *Nature Communications, 8*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms15493>
- Arvanitis, D., & Davy, A. (2008). Eph/ephrin signaling: Networks. *Genes and Development, 22*(4), 416–429. <https://doi.org/10.1101/gad.1630408>
- Ashwood, P., Corbett, B. A., Kantor, A., Schulman, H., van de Water, J., & Amaral, D. G. (2011). In search of cellular immunophenotypes in the blood of children with autism. *PLoS ONE, 6*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019299>
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I. N., & Van de Water, J. (2011a). Altered T cell responses in children with autism. *Brain, Behavior, and Immunity, 25*(5), 840–849. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.002>
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., & Van de Water, J. (2011b). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior, and Immunity, 25*(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.003>
- Atladóttir, H. Ó., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D. E., Lemcke, S., Abdallah, M., & Parner, E. T. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders, 40*(12), 1423–1430. <https://doi.org/10.1007/s10803-010-1006-y>

- Avino, T., & Hutsler, J. J. (2021). Supernumerary neurons within the cerebral cortical subplate in autism spectrum disorders. *Brain Research*, 1760(October 2020), 147350. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147350>
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D. L., Maenner, M. J., Daniels, J., Warren, Z., Kurzius-Spencer, M., Zahorodny, W., Rosenberg, C. R., White, T., Durkin, M. S., Imm, P., Nikolaou, L., Yeargin-Allsopp, M., Lee, L. C., Harrington, R., Lopez, M., Fitzgerald, R. T., Hewitt, A., ... Dowling, N. F. (2018). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 Years - Autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summaries*, 67(6). <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6706a1>
- Barón-Mendoza, I., Del Moral-Sánchez, I., Martínez-Marcial, M., García, O., Garzón-Cortés, D., & González-Arenas, A. (2019). Dendritic complexity in prefrontal cortex and hippocampus of the autistic-like mice C58/J. *Neuroscience Letters*, 703(March), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.018>
- Barón-Mendoza, I., García, O., Calvo-Ochoa, E., Rebollar-García, J. O., Garzón-Cortés, D., Haro-Valencia, R., & González-Arenas, A. (2018). Alterations in neuronal cytoskeletal and astrocytic proteins content in the brain of the autistic-like mouse strain C58/J. *Neuroscience Letters*, 682(April), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.004>
- Barón-Mendoza, I., Maqueda-Martínez, E., Martínez-Marcial, M., De la Fuente-Granada, M., Gómez-Chavarín, M., & González-Arenas, A. (2021). Changes in the Number and Morphology of Dendritic Spines in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of the C58/J Mouse Model of Autism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15(September), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.726501>
- Bartsch, T., Döhring, J., Reuter, S., Finke, C., Rohr, A., Brauer, H., Deuschl, G., & Jansen, O. (2015). Selective neuronal vulnerability of human hippocampal CA1 neurons: Lesion evolution, temporal course, and pattern of hippocampal damage in diffusion-weighted MR imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(11), 1836–1845. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.137>
- Baruch, K., Kertser, A., Porat, Z., & Schwartz, M. (2015). Cerebral nitric oxide represses choroid plexus NFκB-dependent gateway activity for leukocyte trafficking. *The EMBO Journal*, 34(13), 1816–1828. <https://doi.org/10.15252/emj.201591468>
- Bauer-Negrini, G., Deckmann, I., Schwingel, G. B., Hirsch, M. M., Fontes-Dutra, M., Carello-Collar, G., Halliwell, D. E., Paraskevaidi, M., Morais, C. L. M., Martin, F. L., Riesgo, R., Gottfried, C., & Bambini-Junior, V. (2022). The role of T-cells in neurobehavioural development: Insights from the immunodeficient nude mice. *Behavioural Brain Research*, 418(September 2021), 113629. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113629>
- Bauman, M. D., Crawley, J. N., & Berman, R. F. (2019). Autism: Animal Models. *ELS*, March, 1–22. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022368.pub2>
- Bauman, M. D., & Schumann, C. M. (2018). Advances in nonhuman primate models of autism: Integrating neuroscience and behavior. *Experimental Neurology*, 299(May 2017), 252–265. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.07.021>
- Becerra, T. A., Wilhelm, M., Olsen, J., Cockburn, M., & Ritz, B. (2013). Ambient air pollution and autism in Los Angeles County, California. *Environmental Health Perspectives*, 121(3), 380–386. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205827>
- Bergdolt, L., & Dunaevsky, A. (2019). Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Progress in Neurobiology*, 175(December 2018), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.002>

- Bertrand, J., Mars, A., Boyle, C., Bove, F., Yeargin-Allsopp, M., & Decoufle, P. (2001). Prevalence of autism in a United States population: The Brick Township, New Jersey, investigation. *Pediatrics*, *108*(5), 1155–1161. <https://doi.org/10.1542/peds.108.5.1155>
- Bey, A. L., & Jiang, Y. hui. (2014). Overview of mouse models of autism spectrum disorders. *Current Protocols in Pharmacology*, *2014*(September), 5.66.1-5.66.26. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0566s66>
- Blick, M. G., Puchalski, B. H., Bolanos, V. J., Wolfe, K. M., Green, M. C., & Ryan, B. C. (2015). Novel object exploration in the C58/J mouse model of autistic-like behavior. *Behavioural Brain Research*, *282*, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.030>
- Bliss, R. M., Finckbone, V. L., Trice, J., Strahlendorf, H., & Strahlendorf, J. (2011). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) augments AMPA-induced Purkinje neuron toxicity. *Brain Research*, *1386*, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.059>
- Bulloch, K., Miller, M. M., Gal-Toth, J., Milner, T. A., Gottfried-Blackmore, A., Waters, E. M., Kaunzner, U. W., Liu, K., Lindquist, R., Nussenzweig, M. C., Steinman, R. M., & McEwen, B. S. (2008). CD11c/EYFP transgene illuminates a discrete network of dendritic cells within the embryonic, neonatal, adult, and injured mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, *508*(5), 687–710. <https://doi.org/10.1002/cne.21668>
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P., & Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, *17*(1), 131–143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
- Camara, M. Lou, Corrigan, F., Jaehne, E. J., Jawahar, M. C., Anscornb, H., Koerner, H., & Baune, B. T. (2013). TNF- α and its receptors modulate complex behaviours and neurotrophins in transgenic mice. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(12), 3102–3114. <https://doi.org/10.1016/j.PSYNEUEN.2013.09.010>
- Carare, R. O., Bernardes-Silva, M., Newman, T. A., Page, A. M., Nicoll, J. A. R., Perry, V. H., & Weller, R. O. (2008). Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: Significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *34*(2), 131–144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00926.x>
- Careaga, M., Murai, T., & Bauman, M. D. (2017). Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biological Psychiatry*, *81*(5), 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.10.020>
- Careaga, M., Schwartz, J., & Ashwood, P. (2015). Inflammatory profiles in the BTBR mouse: how relevant are they to autism spectrum disorders? *Brain, Behavior, and Immunity*, *43*, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.006>
- Carlezon, W. A., Kim, W., Missig, G., Finger, B. C., Landino, S. M., Alexander, A. J., Mokler, E. L., Robbins, J. O., Li, Y., Bolshakov, V. Y., McDougale, C. J., & Kim, K. S. (2019). Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53294-z>
- Chez, M. G., Dowling, T., Patel, P. B., Khanna, P., & Kominsky, M. (2007). Elevation of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Cerebrospinal Fluid of Autistic Children. *Pediatric Neurology*, *36*(6), 361–365. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.01.012>

- Chiarotti, F., & Venerosi, A. (2020). Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates Since 2014. *Brain Sciences* 2020, Vol. 10, Page 274, 10(5), 274. <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI10050274>
- Chinnery, H. R., Ruitenbergh, M. J., & McMenemy, P. G. (2010). Novel characterization of monocyte-derived cell populations in the meninges and choroid plexus and their rates of replenishment in bone marrow chimeric mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 69(9), 896–909. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181edbc1a>
- Christensen, D. L., Baio, J., Van Naarden Braun, K., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., Daniels, J., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., Kurzius-Spencer, M., Lee, L. C., Pettygrove, S., Robinson, C., Schulz, E., Wells, C., Wingate, M. S., Zahorodny, W., & Yeargin-Allsopp, M. (2016). Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years - Autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2012. *MMWR Surveillance Summaries*, 65(3), 1–23. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6503a1>
- Chu, W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*, 328(2), 222–225. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2012.10.014>
- Clarkson, B. D., Héninger, E., Harris, M. G., Lee, J., Sandor, M., & Fabry, Z. (2012). Innate-Adaptive Crosstalk: How Dendritic Cells Shape Immune Responses in the CNS. In J. D. Lambris & G. Hajishengallis (Eds.), *Current Topics in Innate Immunity II* (pp. 309–333). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_18
- Coiro, P., Padmashri, R., Suresh, A., Spartz, E., Pendyala, G., Chou, S., Jung, Y., Meays, B., Roy, S., Gautam, N., Alnouti, Y., Li, M., & Dunaevsky, A. (2015). Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 50, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.022>
- Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35(1), 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Colton, C. A. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 4(4), 399–418. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9164-4>
- Colton, C. A. (2013). Immune heterogeneity in neuroinflammation: Dendritic cells in the brain. In *Journal of Neuroimmune Pharmacology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 145–162). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9414-8>
- Colton, C. A., & Wilcock, D. M. (2012). Assessing Activation States in Microglia. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9(2), 174–191. <https://doi.org/10.2174/187152710791012053>
- Colvert, E., Tick, B., McEwen, F., Stewart, C., Curran, S. R., Woodhouse, E., Gillan, N., Hallett, V., Lietz, S., Garnett, T., Ronald, A., Plomin, R., Rijdsdijk, F., Happé, F., & Bolton, P. (2015). Heritability of autism spectrum disorder in a UK population-based twin sample. *JAMA Psychiatry*, 72(5), 415–423. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.3028>
- Courchesne, E., Campbell, K., & Solso, S. (2011). Brain growth across the life span in autism: Age-specific changes in anatomical pathology. *Brain Research*, 1380, 138–145. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2010.09.101>
- Craig, S. (2009). Functional Role of the Human Hippocampus. *The Hippocampus Book*. <https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780195100273.003.0012>
- D’Agostino, P. M., Gottfried-Blackmore, A., Anandasabapathy, N., & Bulloch, K. (2012). Brain dendritic

- cells: Biology and pathology. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 124, Issue 5, pp. 599–614). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1018-0>
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience* 2007 9:1, 9(1), 46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- Dawson, G., & Toth, K. (2015). Autism Spectrum Disorders. In *Developmental Psychopathology* (pp. 317–357). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470939406.ch8>
- De Graaf, M. T., Sillevius Smitt, P. A. E., Luitwieler, R. L., Van Velzen, C., Van Den Broek, P. D. M., Kraan, J., & Gratama, J. W. (2011). Central memory CD4+ T cells dominate the normal cerebrospinal fluid. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 80 B(1), 43–50. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20542>
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Ercument Cicek, A., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Fu, S.-C., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P. F., Brownfeld, J. M., Cai, J., ... Consortium, T. A. S. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515(7526), 209–215. <https://doi.org/10.1038/nature13772>
- De, S., Van Deren, D., Peden, E., Hockin, M., Boulet, A., Titen, S., & Capecchi, M. R. (2018). Two distinct ontogenies confer heterogeneity to mouse brain microglia. *Development (Cambridge)*, 145(13). <https://doi.org/10.1242/DEV.152306/VIDEO-1>
- De Simone, R., Butera, A., Armida, M., Pezzola, A., Boirivant, M., Potenza, R. L., & Ricceri, L. (2020). Beneficial Effects of Fingolimod on Social Interaction, CNS and Peripheral Immune Response in the BTBR Mouse Model of Autism. *Neuroscience*, 435, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.041>
- Deczkowska, A., Baruch, K., & Schwartz, M. (2016). Type I/II Interferon Balance in the Regulation of Brain Physiology and Pathology. *Trends in Immunology*, 37(3), 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.006>
- Delong, G. R. (1992). Autism, amnesia, hippocampus, and learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16(1), 63–70. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80052-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80052-1)
- Deng, W., Zou, X., Deng, H., Li, J., Tang, C., Wang, X., & Guo, X. (2015). The Relationship among Genetic Heritability, Environmental Effects, and Autism Spectrum Disorders. *Journal of Child Neurology*, 30(13), 1794–1799. <https://doi.org/10.1177/0883073815580645>
- Denney, D. R., Frei, B. W., & Gaffney, G. R. (1996). Lymphocyte subsets and interleukin-2 receptors in autistic children. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 26(1), 87–97. <https://doi.org/10.1007/BF02276236>
- Derecki, N. C., Quinlins, K. M., & Kipnis, J. (2011). Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(3), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.11.009>
- Dittel, B. N., Visintin, I., Merchant, R. M., & Janeway, C. A. (1999). Presentation of the self antigen myelin basic protein by dendritic cells leads to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(1), 32–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384096>
- Duvernoy, H., Cattin, F., & Risold, P. (2013). The Human Hippocampus. In *Springer-Verlag*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Edmonson, C., Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2014). Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Molecular Autism*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-3>
- Eichenbaum, H. (2012). What H. M. Taught Us. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 25(1), 14–21.
- Eichenbaum, H. (2017). Prefrontal–hippocampal interactions in episodic memory. *Nature Reviews Neuroscience* 2017 18:9, 18(9), 547–558. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.74>
- Ellegood, J., Anagnostou, E., Babineau, B. A., Crawley, J. N., Lin, L., Genestine, M., Dicicco-Bloom, E., Lai, J. K. Y., Foster, J. A., Peñagarikano, O., Geschwind, D. H., Pacey, L. K., Hampson, D. R., Laliberté, C. L., Mills, A. A., Tam, E., Osborne, L. R., Kouser, M., Espinosa-Becerra, F., ... Lerch, J. P. (2015). Clustering autism: Using neuroanatomical differences in 26 mouse models to gain insight into the heterogeneity. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 118–125. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.98>
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y. J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-Nava, C., Patel, V., Paula, C. S., Wang, C., Yasamy, M. T., & Fombonne, E. (2012). Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Research*, 5(3), 160–179. <https://doi.org/10.1002/aur.239>
- Endo, T. H., Mizuno, N., Matsuda, S., Shiga, S., & Yanagawa, Y. (2022). Synergy of interleukin-4 and interferon- γ in arginase-1 production in RAW264.7 macrophages. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. <https://doi.org/10.12932/AP-160221-1067>
- Enstrom, A. M., Lit, L., Onore, C. E., Gregg, J. P., Hansen, R. L., Pessah, I. N., Hertz-Picciotto, I., Van de Water, J. A., Sharp, F. R., & Ashwood, P. (2009). Altered gene expression and function of peripheral blood natural killer cells in children with autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(1), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.08.001>
- Enstrom, A. M., Onore, C. E., Van de Water, J. A., & Ashwood, P. (2010). Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(1), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.08.001>
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, 353(6301), 772–777. <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>
- Etherton, M., Földy, C., Sharma, M., Tabuchi, K., Liu, X., Shamloo, M., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2011). Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13764–13769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111093108>
- Etherton, M. R., Tabuchi, K., Sharma, M., Ko, J., & Südhof, T. C. (2011). An autism-associated point mutation in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus. *EMBO Journal*, 30(14), 2908–2919. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.182>
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Faraco, G., Park, L., Anrather, J., & Iadecola, C. (2017). Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *Journal of Molecular Medicine*, 95(11), 1143–1152. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1573-x>
- Fatemi, S. H., & Halt, A. R. (2001). Altered levels of Bcl2 and p53 proteins in parietal cortex reflect deranged apoptotic regulation in autism. *Synapse*, 42(4), 281–284. <https://doi.org/10.1002/syn.10002>
- Fatemi, S. H., Halt, A. R., Stary, J. M., Realmuto, G. M., & Jalali-Mousavi, M. (2001). Reduction in anti-

- apoptotic protein Bcl-2 in autistic cerebellum. *NeuroReport*, 12(5).
https://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/2001/04170/Reduction_in_anti_apoptotic_protein_Bcl_2_in.13.aspx
- Feliciano, P., Zhou, X., Astrovskaya, I., Turner, T. N., Wang, T., Brueggeman, L., Barnard, R., Hsieh, A., Snyder, L. G., Muzny, D. M., Sabo, A., Abbeduto, L., Acampado, J., Ace, A. J., Albright, C., Alessandri, M., Amaral, D. G., Amatya, A., Annett, R. D., ... Consortium, T. S. (2019). Exome sequencing of 457 autism families recruited online provides evidence for autism risk genes. *Npj Genomic Medicine*, 4(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41525-019-0093-8>
- Ferro, A., Auguste, Y. S. S., & Cheadle, L. (2021). Microglia, Cytokines, and Neural Activity: Unexpected Interactions in Brain Development and Function. *Frontiers in Immunology*, 12(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.703527>
- Fiorentino, M., Sapone, A., Senger, S., Camhi, S. S., Kadzielski, S. M., Buie, T. M., Kelly, D. L., Cascella, N., & Fasano, A. (2016). Blood–brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Molecular Autism* 2016 7:1, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13229-016-0110-Z>
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric Research*, 65(6), 591–598. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e7203>
- Fombonne, E., Marcin, C., Cecilia, A., Ruth, M., Diaz, C., Villalobos, M., Ramsay, K., Nealy, B., & Diaz, C. (2016). Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato , Mexico : The Leon survey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(5), 1669–1685. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2696-6>
- Gao, R., & Penzes, P. (2015). Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Current Molecular Medicine*, 15(2), 146–167. <https://doi.org/10.2174/1566524015666150303003028>
- Gąssowska-Dobrowolska, M., Cieślak, M., Czapski, G. A., Jęsko, H., Frontczak-Baniewicz, M., Gewartowska, M., Dominiak, A., Polowy, R., Filipkowski, R. K., Babiec, L., & Adamczyk, A. (2020). Prenatal exposure to valproic acid affects microglia and synaptic ultrastructure in a brain-region-specific manner in young-adult male rats: Relevance to autism spectrum disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103576>
- Geschwind, D. H. (2011). Genetics of autism spectrum disorders. In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 15, Issue 9, pp. 409–416). <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.07.003>
- Geuze, E., Vermetten, E., & Bremner, J. D. (2005). MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 10, Issue 2, pp. 160–184). <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001579>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 0(MAR), 45. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00045/BIBTEX>
- Giulian, D. (1987). Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, 18(1), 155–171. <https://doi.org/10.1002/jnr.490180123>
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M. J. C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Amann, L., Staszewski, O., Kierdorf, K., Krueger, M., Locatelli, G., Hochgerner, H., Zeiser, R., Epelman, S.,

- Geissmann, F., Priller, J., Rossi, F. M. V., Bechmann, I., Kerschensteiner, M., ... Prinz, M. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature Immunology*, *17*(7), 797–805. <https://doi.org/10.1038/ni.3423>
- Greter, M., Heppner, F. L., Lemos, M. P., Odermatt, B. M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R. J., & Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, *11*(3), 328–334. <https://doi.org/10.1038/nm1197>
- Groen, W., Teluij, M., Buitelaar, J., & Tendolkar, I. (2010). Amygdala and Hippocampus Enlargement During Adolescence in Autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *49*(6), 552–560. <https://doi.org/10.1097/00004583-201006000-00004>
- Guilmatre, A., Mosca, A.-L., Legallic, S., Frébourg, T., Saugier Veber, P., Champion, D., Le Vacon, G., Goldenberg, A., Drouin-Garraud, V., Joly-Helas, G., Dubourg, C., David, V., Bendavid, C., Odent, S., Layet, V., Rosier, A., Briault, S., Bonnet-Brilhault, F., Laumonier, F., ... Di Rosa, G. (2009). Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Archives of General Psychiatry*, *66*(9), 947–956. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.80>
- Guzmán-Ruiz, M. A., Guerrero-Vargas, N. N., Lagunes-Cruz, A., González-González, S., García-Aviles, J. E., Hurtado-Alvarado, G., Mendez-Hernández, R., Chavarría-Krauser, A., Morin, J. P., Arriaga-Avila, V., Buijs, R. M., & Guevara-Guzmán, R. (2022). Circadian modulation of microglial physiological processes and immune responses. *Glia*, *March*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/glia.24261>
- Hamilton, T. A., Ohmori, Y., Tebo, J. M., & Kishore, R. (1999). Regulation of macrophage gene expression by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Pathobiology*, *67*(5–6), 241–244. <https://doi.org/10.1159/000028101>
- Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A. J., Gergits, F., Segel, M., Nemesh, J., Marsh, S. E., Saunders, A., Macosko, E., Ginhoux, F., Chen, J., Franklin, R. J. M., Piao, X., McCarroll, S. A., & Stevens, B. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, *50*(1), 253-271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>
- Hanamsagar, R., & Bilbo, S. D. (2017). Environment matters: microglia function and dysfunction in a changing world. *Current Opinion in Neurobiology*, *47*, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.007>
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, *10*(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Hansel, C. (2019). Deregulation of synaptic plasticity in autism. *Neuroscience Letters*, *688*, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.003>
- Hauser, J., Llano López, L. H., Feldon, J., Gargiulo, P. A., & Yee, B. K. (2020). Small lesions of the dorsal or ventral hippocampus subregions are associated with distinct impairments in working memory and reference memory retrieval, and combining them attenuates the acquisition rate of spatial reference memory. *Hippocampus*, *30*(9), 938–957. <https://doi.org/10.1002/HIPO.23207>
- Hegazy, H. G., Ali, E. H. A., & Elgoly, A. H. M. (2015). Interplay between pro-inflammatory cytokines and brain oxidative stress biomarkers: Evidence of parallels between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain physiopathology in autism rat model. *Cytokine*, *71*(2), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.027>
- Heidari, A., Rostam-Abadi, Y., & Rezaei, N. (2021). The immune system and autism spectrum disorder:

- Association and therapeutic challenges. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 81(3), 249–263. <https://doi.org/10.21307/ANE-2021-023>
- Heo, Y., Zhang, Y., Gao, D., Miller, V. M., & Lawrence, D. A. (2011). Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020912>
- Herz, J., Filiano, A. J., Smith, A., Yogev, N., & Kipnis, J. (2017). Myeloid Cells in the Central Nervous System. *Immunity*, 46(6), 943–956. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.007>
- Hickey, W. F., & Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*, 239(4837), 290–292. <https://doi.org/10.1126/science.3276004>
- Hillen, A. E. J., Burbach, J. P. H., & Hol, E. M. (2018). Cell adhesion and matricellular support by astrocytes of the tripartite synapse. *Progress in Neurobiology*, 165–167(July 2017), 66–86. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.02.002>
- Homberg, J. R., Kyzar, E. J., Nguyen, M., Norton, W. H., Pittman, J., Poudel, M. K., Gaikwad, S., Nakamura, S., Koshiba, M., Yamanouchi, H., Scattoni, M. L., Ullman, J. F. P., Diamond, D. M., Kaluyeva, A. A., Parker, M. O., Klimenko, V. M., Apryatin, S. A., Brown, R. E., Song, C., ... Kalueff, A. V. (2016). Understanding autism and other neurodevelopmental disorders through experimental translational neurobehavioral models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 65, 292–312. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.013>
- Hrabovska, S. V., & Salyha, Y. T. (2016). Animal Models of Autism Spectrum Disorders and Behavioral Techniques of their Examination. *REVIEWS Neurophysiology*, 48(5). <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9613-2>
- Hutchins, K. D., Dickson, D. W., Rashbaum, W. K., & Lyman, W. D. (1990). Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Developmental Brain Research*, 55(1), 95–102. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90109-C](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90109-C)
- Insausti, R., & Amaral, D. G. (2012). Hippocampal Formation. In *The Human Nervous System* (pp. 896–942). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374236-0.10024-0>
- Iossifov, I., O’Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H. A., Witherspoon, K. T., Vives, L., Patterson, K. E., Smith, J. D., Paepker, B., Nickerson, D. A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L. E., Mandell, J. D., Mane, S. M., Murtha, M. T., ... Wigler, M. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, 515(7526), 216–221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>
- Isaksen, J., Diseth, T. H., Schjøberg, S., & Skjeldal, O. H. (2013). Autism Spectrum Disorders - Are they really epidemic? *European Journal of Paediatric Neurology*, 17(4), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.03.003>
- Jacobson, S., Marcus, E. M., & Pugsley, S. (2018). The Limbic System, Temporal Lobe, and Prefrontal Cortex. In *Neuroanatomy for the Neuroscientist* (pp. 477–529). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60187-8_16
- Janach, G. M. S., Reetz, O., Döhne, N., Stadler, K., Grosser, S., Byvaltcev, E., Bräuer, A. U., & Strauss, U. (2020). Interferon- γ acutely augments inhibition of neocortical layer 5 pyramidal neurons. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 17, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-1722-y>
- Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 5, pp. 1–16). <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
- Jeye, B. M., MacEvoy, S. P., Karanian, J. M., & Slotnick, S. D. (2018). Distinct regions of the hippocampus

- are associated with memory for different spatial locations. *Brain Research*, 1687, 41–49.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.029>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(August), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Kalkbrenner, A. E., Windham, G. C., Serre, M. L., Akita, Y., Wang, X., Hoffman, K., Thayer, B. P., & Daniels, J. L. (2015). Particulate matter exposure, prenatal and postnatal windows of susceptibility, and autism spectrum disorders. *Epidemiology*, 26(1), 30–42.
<https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000173>
- Kaur, G., Han, S. J., Yang, I., & Crane, C. (2010). Microglia and Central Nervous System Immunity. *Neurosurgery Clinics of North America*, 21(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2009.08.009>
- Kawamura, Y., Takahashi, O., & Ishii, T. (2008). Reevaluating the incidence of pervasive developmental disorders: Impact of elevated rates of detection through implementation of an integrated system of screening in Toyota, Japan. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 62(2), 152–159.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2008.01748.x>
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>
- Khalil, R., Kenny, C., Hill, R. S., Mochida, G. H., Nasir, R., Partlow, J. N., Barry, B. J., Al-Saffar, M., Egan, C., Stevens, C. R., Gabriel, S. B., Barkovich, A. J., Ellison, J. W., Al-Gazali, L., Walsh, C. A., & Chahrouh, M. H. (2018). PSMD12 haploinsufficiency in a neurodevelopmental disorder with autistic features. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 177(8), 736–745.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32688>
- Kirwan, C. B., & Stark, C. E. L. (2004). Medial temporal lobe activation during encoding and retrieval of novel face-name pairs. *Hippocampus*, 14(7), 919–930. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20014>
- Knowles, W. D. (1992). Normal Anatomy and Neurophysiology of the Hippocampal Formation. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 9(2), 253–263. <https://doi.org/10.1097/00004691-199204010-00006>
- Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S. A., Bodmer, M., Hellings, J. A., Toovey, S., & Prinszen, E. P. (2014). Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Reviews Neurology*, 10(11), 643–660. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.187>
- Kofler, J., & Wiley, C. A. (2011). Microglia: Key Innate Immune Cells of the Brain. *Toxicologic Pathology*, 39(1), 103–114. <https://doi.org/10.1177/0192623310387619>
- Kogan, M. D., Vladutiu, C. J., Schieve, L. A., Ghandour, R. M., Blumberg, S. J., Zablotsky, B., Perrin, J. M., Shattuck, P., Kuhlthau, K. A., Harwood, R. L., & Lu, M. C. (2018). The prevalence of parent-reported autism spectrum disorder among US children. *Pediatrics*, 142(6), 20174161.
<https://doi.org/10.1542/peds.2017-4161>
- Kovacs, G. G. (2018). Cellular reactions of the central nervous system. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 145). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00003-1>
- Krencik, R., van Asperen, J. V., & Ullian, E. M. (2017). Human astrocytes are distinct contributors to the complexity of synaptic function. *Brain Research Bulletin*, 129, 66–73.
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2016.08.012>
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*,

19(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)

- Kumar, S., Reynolds, K., Ji, Y., Gu, R., Rai, S., & Zhou, C. J. (2019). Impaired neurodevelopmental pathways in autism spectrum disorder: A review of signaling mechanisms and crosstalk. *Journal of Neurodevelopmental Disorders, 11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s11689-019-9268-y>
- Kunis, G., Baruch, K., Miller, O., & Schwartz, M. (2015). Immunization with a myelin-derived antigen activates the brain's choroid plexus for recruitment of immunoregulatory cells to the CNS and attenuates disease progression in a mouse model of ALS. *Journal of Neuroscience, 35*(16), 6381–6393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3644-14.2015>
- Laboratory, T. J. (2009). *The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice* (J. M. Curren (ed.); Sixth Edit). The Jackson Laboratory.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience, 39*(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-W](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-W)
- Le Couteur, A. L., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., Rutter, M., & Bailey, A. (1995). Autism as a strongly genetic disorder evidence from a british twin Study. *Psychological Medicine, 25*(1), 63–77. <https://doi.org/10.1017/S0033291700028099>
- Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Grandin, T., Collins, F., Greenacre, C., McCrackin, M. A., Meyer, R., Miller, D., Shearer, J., Yanong, R., Golab, G. C., & Patterson-Kane, E. (2013). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. American Veterinary Medical Association.
- Lee, A. S., Azmitia, E. C., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2017). Developmental microglial priming in postmortem autism spectrum disorder temporal cortex. *Brain, Behavior, and Immunity, 62*, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.019>
- Leitner, Y. (2014). The Co-Occurrence of Autism and Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children – What Do We Know? . In *Frontiers in Human Neuroscience* (Vol. 8, p. 268). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2014.00268>
- Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X. M., Ji, L., Brown, T., & Malik, M. (2009). Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal of Neuroimmunology, 207*(1–2), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>
- Liao, X., Yang, J., Wang, H., & Li, Y. (2020). Microglia mediated neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Journal of Psychiatric Research, 130*(June), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.07.013>
- Lichtenstein, P., Carlström, E., Råstam, M., Gillberg, C., & Anckarsäter, H. (2010). The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *American Journal of Psychiatry, 167*(11), 1357–1363. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10020223>
- Liu, K., Vitorica, G. D., Schwickert, T. A., Guermontprez, P., Meredith, M. M., Yao, K., Chu, F. F., Randolph, G. J., Rudensky, A. Y., & Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science, 324*(5925), 392–397. <https://doi.org/10.1126/science.1170540>
- Liverman, C. S., Kaftan, H. A., Cui, L., Hersperger, S. G., Taboada, E., Klein, R. M., & Berman, N. E. J. (2006). Altered expression of pro-inflammatory and developmental genes in the fetal brain in a mouse model of maternal infection. *Neuroscience Letters, 399*(3), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.064>
- López-Cacho, J. M., Gallardo, S., Posada, M., Aguerri, M., Calzada, D., Mayayo, T., Lahoz, C., & Cárdbaba, B. (2016). Characterization of immune cell phenotypes in adults with autism spectrum disorders.

- Journal of Investigative Medicine*, 64(7), 1179–1185. <https://doi.org/10.1136/jim-2016-000070>
- Lord, C., Brugha, T. S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., Jones, E. J. H., Jones, R. M., Pickles, A., State, M. W., Taylor, J. L., & Veenstra-VanderWeele, J. (2020). Autism spectrum disorder. *Nature Reviews Disease Primers* 2020 6:1, 6(1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0138-4>
- Lord, C., Cook, E. H., Leventhal, B. L., & Amaral, D. G. (2000). Review Autism Spectrum Disorders coordinating vocalizations with their intentions, and com. In *Neuron* (Vol. 28).
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392, 508–520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
- Lotter, V. (1967). Epidemiology of autistic conditions in young children - II. Some characteristics of the parents and children. *Social Psychiatry*, 1(4), 163–173. <https://doi.org/10.1007/BF00578950>
- Loucas, T., Charman, T., Pickles, A., Simonoff, E., Chandler, S., Meldrum, D., & Baird, G. (2008). Autistic symptomatology and language ability in autism spectrum disorder and specific language impairment. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, 49(11), 1184–1192. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2008.01951.x>
- Luhach, K., Kulkarni, G. T., Singh, V. P., & Sharma, B. (2021). Cilostazol attenuated prenatal valproic acid-induced behavioural and biochemical deficits in a rat model of autism spectrum disorder. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(11), 1460–1469. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab115>
- Madore, C., Leyrolle, Q., Morel, L., Rossitto, M., Greenhalgh, A. D., Delpech, J. C., Martinat, M., Bosch-Bouju, C., Bourel, J., Rani, B., Lacabanne, C., Thomazeau, A., Hopperton, K. E., Beccari, S., Sere, A., Aubert, A., De Smedt-Peyrusse, V., Lecours, C., Bisht, K., ... Layé, S. (2020). Essential omega-3 fatty acids tune microglial phagocytosis of synaptic elements in the mouse developing brain. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19861-z>
- Madore, C., Nadjar, A., Delpech, J. C., Sere, A., Aubert, A., Portal, C., Joffre, C., & Layé, S. (2014). Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 41(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.021>
- Maggio, N., & Vlachos, A. (2018). Tumor necrosis factor (TNF) modulates synaptic plasticity in a concentration-dependent manner through intracellular calcium stores. *Journal of Molecular Medicine*, 96(10), 1039–1047. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1674-1>
- Maldonado-Ruiz, R., Trujillo-Villarreal, L. A., Montalvo-Martínez, L., Mercado-Gómez, O. F., Arriaga-Ávila, V., Garza-Ocañas, L., Ortiz-López, R., Garza-Villarreal, E. A., Guevara-Guzmán, R., & Camacho-Morales, A. (2022). MCP-1 Signaling Disrupts Social Behavior by Modulating Brain Volumetric Changes and Microglia Morphology. *Molecular Neurobiology*, 59(2), 932–949. <https://doi.org/10.1007/S12035-021-02649-7/FIGURES/8>
- Mangano, E. N., Litteljohn, D., So, R., Nelson, E., Peters, S., Bethune, C., Bobyn, J., & Hayley, S. (2012). Interferon- γ plays a role in paraquat-induced neurodegeneration involving oxidative and proinflammatory pathways. *Neurobiology of Aging*, 33(7), 1411–1426. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2011.02.016>
- Marks, M. A., Eby, Y., Howard, R., & Gravitt, P. E. (2012). Comparison of normalization methods for measuring immune markers in cervical secretion specimens. *Journal of Immunological Methods*, 382(1–2), 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.05.012>
- Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., & Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 13, Issue 2, pp. 453–461). Front Biosci. <https://doi.org/10.2741/2692>
- Masi, A., Quintana, D. S., Glozier, N., Lloyd, A. R., Hickie, I. B., & Guastella, A. J. (2015). Cytokine

- aberrations in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 20(4), 440–446. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.59>
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Böttcher, C., Amann, L., Sagar, Scheiwe, C., Nessler, S., Kunz, P., van Loo, G., Coenen, V. A., Reinacher, P. C., Michel, A., Sure, U., Gold, R., Grün, D., Priller, J., Stadelmann, C., & Prinz, M. (2019). Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 2019 566:7744, 566(7744), 388–392. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0924-x>
- Matson, J. L., & Kozlowski, A. M. (2011). The increasing prevalence of autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 5(1), 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.rasd.2010.06.004>
- Matta, S. M., Hill-Yardin, E. L., & Crack, P. J. (2019). The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79(October 2018), 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.037>
- May, P., Bock, H. H., & Nofer, J. R. (2013). Low density receptor-related protein 1 (LRP1) promotes anti-inflammatory phenotype in murine macrophages. *Cell and Tissue Research*, 354(3), 887–889. <https://doi.org/10.1007/S00441-013-1699-2/FIGURES/1>
- Mazur-Kolecka, B., Cohen, I. L., Gonzalez, M., Jenkins, E. C., Kaczmarek, W., Brown, W. T., Flory, M., & Frackowiak, J. (2014). Autoantibodies against neuronal progenitors in sera from children with autism. *Brain and Development*, 36(4), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2013.04.015>
- McFarlane, H. G., Kusek, G. K., Yang, M., Phoenix, J. L., Bolivar, V. J., & Crawley, J. N. (2008). Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes, Brain and Behavior*, 7(2), 152–163. <https://doi.org/10.1111/J.1601-183X.2007.00330.X>
- McHugh, S. B., & Bannerman, D. M. (2010). Cognition: Learning and Memory: Spatial. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, 279–287. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045396-5.00006-3>
- Menassa, D. A., & Gomez-Nicola, D. (2018). Microglial dynamics during human brain development. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 1014. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01014/XML/NLM>
- Menendez Iglesias, B., Cerase, J., Ceracchini, C., Levi, G., & Aloisi, F. (1997). Analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands in cultured mouse microglia: upregulation by interferon-g and lipopolysaccharide and downregulation by interleukin-10, prostaglandin E and cyclic 2 AMP-elevating agents ~`. In *Journal of Neuroimmunology* (Vol. 72).
- Meyer, U., Murray, P. J., Urwyler, A., Yee, B. K., Schedlowski, M., & Feldon, J. (2007). Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Molecular Psychiatry* 2008 13:2, 13(2), 208–221. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002042>
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A. J., Yoshimura, Y., & Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12540>
- Modabbernia, A., Velthorst, E., & Reichenberg, A. (2017). Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Molecular Autism*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>
- Moehle, M. S., & West, A. B. (2015). M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience*, 302, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.018>
- Morgan, J. T., Barger, N., Amaral, D. G., & Schumann, C. M. (2014). Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder. *PLoS ONE*, 9(10), 29–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110356>

- Morgan, J. T., Chana, G., Abramson, I., Semendeferi, K., Courchesne, E., & Everall, I. P. (2012). Abnormal microglial-neuronal spatial organization in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Brain Research*, *1456*, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.03.036>
- Morgan, J. T., Chana, G., Pardo, C. A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., & Everall, I. P. (2010). Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biological Psychiatry*, *68*(4), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.024>
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Magnuson, T. R., & Crawley, J. N. (2006). Mouse Models of Autism Spectrum Disorders: The Challenge for Behavioral Genetics. *American Journal of Medical Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)*, *142*, 40–51. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30081>
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Nonneman, R. J., Segall, S. K., Andrade, G. M., Crawley, J. N., & Magnuson, T. R. (2008). Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behavioural Brain Research*, *191*(1), 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.015>
- Moy, S. S., Riddick, N. V., Nikolova, V. D., Teng, B. L., Agster, K. L., Nonneman, R. J., Young, N. B., Baker, L. K., Nadler, J. J., & Bodfish, J. W. (2014). Repetitive behavior profile and supersensitivity to amphetamine in the C58/J mouse model of autism. *Behavioural Brain Research*, *259*, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.052>
- Nadeem, A., Ahmad, S. F., Al-Harbi, N. O., Attia, S. M., Alshammari, M. A., Alzahrani, K. S., & Bakheet, S. A. (2019). Increased oxidative stress in the cerebellum and peripheral immune cells leads to exaggerated autism-like repetitive behavior due to deficiency of antioxidant response in BTBR T + tf/J mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *89*, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.09.012>
- Nadeem, A., Ahmad, S. F., Attia, S. M., AL-Ayadhi, L. Y., Bakheet, S. A., & Al-Harbi, N. O. (2019). Oxidative and inflammatory mediators are upregulated in neutrophils of autistic children: Role of IL-17A receptor signaling. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *90*, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.12.002>
- Nadeem, A., Ahmad, S. F., Attia, S. M., Bakheet, S. A., Al-Harbi, N. O., & AL-Ayadhi, L. Y. (2018). Activation of IL-17 receptor leads to increased oxidative inflammation in peripheral monocytes of autistic children. *Brain, Behavior, and Immunity*, *67*, 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.09.010>
- Napoli, I., & Neumann, H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, *158*(3), 1030–1038. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.046>
- National Collaborating Centre for Women’s and Children’s Health. (2011). *Autism: recognition, referral and diagnosis of children and young people on the autism spectrum. NICE Clinical Guideline*. RCOG Press.
- Nicolini, C., & Fahnstock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology*, *299*, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, *308*(5726), 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Olmos, G., & Lladó, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/861231>
- Onore, C., Careaga, M., & Ashwood, P. (2012). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, *26*(3), 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.007>
- Ordy, J. M., Wengenack, T. M., Bialobok, P., Coleman, P. D., Rodier, P., Baggs, R. B., Dunlap, W. P., &

- Kates, B. (1993). Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. In *Experimental Neurology* (Vol. 119, Issue 1, pp. 128–139). <https://doi.org/10.1006/exnr.1993.1014>
- Ortí-Casañ, N., Zuhorn, I. S., Naudé, P. J. W., De Deyn, P. P., van Schaik, P. E. M., Wajant, H., & Eisel, U. L. M. (2022). A TNF receptor 2 agonist ameliorates neuropathology and improves cognition in an Alzheimer's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(37), 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2201137119>
- Ouyang, Y. B., Voloboueva, L. A., Xu, L. J., & Giffard, R. G. (2007). Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *Journal of Neuroscience*, 27(16), 4253–4260. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0211-07.2007>
- Paintlia, M. K., Paintlia, A. S., Barbosa, E., Singh, I., & Singh, A. K. (2004). N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 78(3), 347–361. <https://doi.org/10.1002/jnr.20261>
- Paludan, S. R., & Paludan, S. R. (1998). Interleukin-4 and Interferon- γ : The Quintessence of a Mutual Antagonistic Relationship. *Scandinavian Journal of Immunology*, 48(5), 459–468. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3083.1998.00435.X>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Papazian, I., Tsoukala, E., Boutou, A., Karamita, M., Kambas, K., Iliopoulou, L., Fischer, R., Kontermann, R. E., Denis, M. C., Kollias, G., Lassmann, H., & Probert, L. (2021). Fundamentally different roles of neuronal TNF receptors in CNS pathology: TNFR1 and IKK β promote microglial responses and tissue injury in demyelination while TNFR2 protects against excitotoxicity in mice. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02200-4>
- Pardo, C. A., Vargas, D. L., & Zimmerman, A. W. (2005). Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *International Review of Psychiatry*, 17(6), 485–495. <https://doi.org/10.1080/02646830500381930>
- Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V., Oliet, S. H. R., Schousboe, A., Haydon, P. G., Stout, R. F., Spray, D. C., Reichenbach, A., Pannicke, T., Pekny, M., Pekna, M., Zorec, R., & Verkhratsky, A. (2012). Glial cells in (patho)physiology. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 121, Issue 1, pp. 4–27). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x>
- Paterka, M., Siffrin, V., Voss, J. O., Werr, J., Hoppmann, N., Gollan, R., Belikan, P., Bruttger, J., Birkenstock, J., Jung, S., Esplugues, E., Yogev, N., Flavell, R. A., Bopp, T., & Zipp, F. (2016). Gatekeeper role of brain antigen-presenting CD11c + cells in neuroinflammation. *The EMBO Journal*, 35(1), 89–101. <https://doi.org/10.15252/embj.201591488>
- Pati, D., & Kash, T. L. (2021). Tumor necrosis factor- α modulates GABAergic and dopaminergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray of female mice. In *Journal of Neurophysiology* (Vol. 127, Issue 1, pp. 2119–2129). <https://doi.org/10.1152/jn.00251.2021>
- Patterson, P. H. (2011). Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7), 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.001>
- Perrin, J., Le Coadic, M., Vernay, A., Dias, M., Gopaldass, N., Ouertatani-Sakouhi, H., & Cosson, P. (2015).

TM9 family proteins control surface targeting of glycine-rich transmembrane domains. *Journal of Cell Science*, 128(13), 2269–2277. <https://doi.org/10.1242/JCS.164848/260369/AM/TM9-PROTEINS-CONTROL-SURFACE-TARGETING-OF-GLYCINE>

- Petrelli, F., Pucci, L., & Bezzi, P. (2016). Astrocytes and microglia and their potential link with autism spectrum disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00021>
- Defining Autism Spectrum Disorders, 14 *Journal for Specialists in Pediatric Nursing* 206 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1744-6155.2009.00200.x>
- Pomaznoy, M., Ha, B., & Peters, B. (2018). GONet: A tool for interactive Gene Ontology analysis. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2533-3>
- Pont-Lezica, L., Beumer, W., Colasse, S., Drexhage, H., Versnel, M., & Bessis, A. (2014). Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. *European Journal of Neuroscience*, 39(10), 1551–1557. <https://doi.org/10.1111/ejn.12508>
- Posar, A., & Visconti, P. (2017). Autismo em 2016: necessidade de respostas. *Jornal de Pediatria*, 93(2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2016.09.002>
- Pozniak, P. D., White, M. K., & Khalili, K. (2014). TNF- α /NF- κ B signaling in the CNS: Possible connection to EPHB2. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 9(2), 133–141. <https://doi.org/10.1007/S11481-013-9517-X/TABLES/1>
- Prinz, M., Erny, D., & Hagemeyer, N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nature Immunology*, 18(4), 385–392. <https://doi.org/10.1038/ni.3703>
- Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292–311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.053>
- Prodinger, C., Bunse, J., Krüger, M., Schiefenhövel, F., Brandt, C., Laman, J. D., Greter, M., Immig, K., Heppner, F., Becher, B., & Bechmann, I. (2011). CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathologica*, 121(4), 445–458. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0774-y>
- Quintana, E., Fernández, A., Velasco, P., de Andrés, B., Liste, I., Sancho, D., Gaspar, M. L., & Cano, E. (2015). DNGR-1+ dendritic cells are located in meningeal membrane and choroid plexus of the noninjured brain. *Glia*, 63(12), 2231–2248. <https://doi.org/10.1002/glia.22889>
- Quintana, F. J. (2019). Myeloid cells in the central nervous system: So similar, yet so different. *Science Immunology*, 4(32), 8–10. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw2841>
- Ramirez-Celis, A., Becker, M., Nuño, M., Schauer, J., Aghaepour, N., & Van de Water, J. (2021). Risk assessment analysis for maternal autoantibody-related autism (MAR-ASD): a subtype of autism. *Molecular Psychiatry* 2021 26:5, 26(5), 1551–1560. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00998-8>
- Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1164–1171. <https://doi.org/10.1172/JCI58644.1164>
- Ransohoff, R. M., & Cardona, A. E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468(7321), 253–262. <https://doi.org/10.1038/nature09615>
- Ravanos, K., Dagklis, T., Petousis, S., Margioulas-Siarkou, C., Prapas, Y., & Prapas, N. (2015). Factors implicated in the initiation of human parturition in term and preterm labor: A review. *Gynecological Endocrinology*, 31(9), 679–683. <https://doi.org/10.3109/09513590.2015.1076783>
- Raymond, G. V., Bauman, M. L., & Kemper, T. L. (1995). Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathologica*, 91(1), 117–119. <https://doi.org/10.1007/s004010050401>

- Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J., & Hol, E. M. (2016). The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Frontiers in Human Neuroscience*, *10*(NOV2016), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Rezaie, P., Dean, A., Male, D., & Ulfig, N. (2005). Microglia in the Cerebral Wall of the Human Telencephalon at Second Trimester. *Cerebral Cortex*, *15*(7), 938–949. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHH194>
- Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., Nelson, S., & Romano, J. (1996). Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, *370*(2), 247–261. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960624\)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2)
- Ryan, B. C., Young, N. B., Crawley, J. N., Bodfish, J. W., & Moy, S. S. (2010). Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain. *Behavioural Brain Research*, *208*(1), 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.031>
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O’Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., & Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, *472*(7344), 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature09817>
- Saitoh, O., Karns, C., & Courchesne, E. (2001). Development of the hippocampal formation from 2 to 42 years. *Brain*, *124*(7), 1317. [papers://3ef1dd7b-eb58-45d1-97b3-39da2cdb02b4/Paper/p1380](https://doi.org/10.1093/brain/124.7.1317)
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *311*(17), 1770–1777. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.4144>
- Satoh, J. ichi, Lee, Y. B., & Kim, S. U. (1995). T-cell costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) are expressed in human microglia but not in astrocytes in culture. *Brain Research*, *704*(1), 92–96. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01177-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01177-3)
- Satterstrom, F. K., Kosmicki, J. A., Wang, J., Breen, M. S., De Rubeis, S., An, J.-Y., Peng, M., Collins, R., Grove, J., Klei, L., Stevens, C., Reichert, J., Mulhern, M. S., Artomov, M., Gerges, S., Sheppard, B., Xu, X., Bhaduri, A., Norman, U., ... Buxbaum, J. D. (2020). Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*, *180*(3), 568–584.e23. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036)
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, *75*(2), 163–189. <https://doi.org/10.1189/JLB.0603252>
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 6–17). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Schulz, C., Perdiguero, E. G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E. W., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J., & Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science*, *335*(6077), 86–90. <https://doi.org/10.1126/science.1219179>
- Schumann, C. M., Hamstra, J., Goodlin-Jones, B. L., Lotspeich, L. J., Kwon, H., Buonocore, M. H., Lammers, C. R., Reiss, A. L., & Amaral, D. G. (2004). The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *Journal of Neuroscience*, *24*(28), 6392–6401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1297-04.2004>
- Schwartz, M., & Baruch, K. (2014). The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: Leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO Journal*, *33*(1), 7–22.

<https://doi.org/10.1002/embj.201386609>

- Sedgwick, J. D., Schwender, S., Imrich, H., Dorries, R., Butcher, G. W., & Ter Meulen, V. (1991). Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(16), 7438–7442. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7438>
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2017). Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*, *127*(7), 624–633. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>
- Shaker, N., Taha, G., Kholeif, H., Sayed, N., El Sheikh, M., & Abulmagd, M. (2016). Serum Levels of S100B, Interleukin-6 and Anti-Transglutaminase li IgA as Immune Markers in a Sample of Egyptian Children with Autistic Spectrum Disorders. *Autism-Open Access*, *6*(4). <https://doi.org/10.4172/2165-7890.1000191>
- Shalom, D. Ben. (2003). Memory in autism: Review and synthesis. *Cortex*, *39*(4–5), 1129–1138. [https://doi.org/10.1016/S0010-9452\(08\)70881-5](https://doi.org/10.1016/S0010-9452(08)70881-5)
- Sharma, S. R., Gonda, X., & Tarazi, F. I. (2018). Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, *190*, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.007>
- Sheikh, A. M., Malik, M., Wen, G., Chauhan, A., Chauhan, V., Gong, C. X., Liu, F., Brown, W. T., & Li, X. (2010). BDNF-Akt-Bcl2 antiapoptotic signaling pathway is compromised in the brain of autistic subjects. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(12), 2641–2647. <https://doi.org/10.1002/JNR.22416>
- Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W., & Patterson, P. H. (2003). Maternal Influenza Infection Causes Marked Behavioral and Pharmacological Changes in the Offspring. *Journal of Neuroscience*, *23*(1), 297–302. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-01-00297.2003>
- Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J. E., Sekino, Y., & Sato, K. (2014). Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, *34*(6), 2231–2243. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1619-13.2014>
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E., & Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, *7*(4), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>
- Simonoff, E., Pickles, A., Charman, T., Chandler, S., Loucas, T., & Baird, G. (2008). Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: Prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *47*(8), 921–929. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e318179964f>
- Singer, H. S., Morris, C. M., Gause, C. D., Gillin, P. K., Crawford, S., & Zimmerman, A. W. (2008). Antibodies against fetal brain in sera of mothers with autistic children. *Journal of Neuroimmunology*, *194*(1–2), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.11.004>
- Singer, H. S., Morris, C. M., Williams, P. N., Yoon, D. Y., Hong, J. J., & Zimmerman, A. W. (2006). Antibrain antibodies in children with autism and their unaffected siblings. *Journal of Neuroimmunology*, *178*(1–2), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.05.025>
- Singh, V., Warren, R., Averett, R., & Ghaziuddin, M. (1997). Circulating Autoantibodies to Neuronal and Glial Filament Proteins in Autism. *Pediatric Neurology*, *17*(1), 88–90.
- Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *Journal of Neuroscience*, *27*(40), 10695–10702.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>

- Smolders, S. M. T., Kessels, S., Vanganswinkel, T., Rigo, J. M., Legendre, P., & Brône, B. (2019). Microglia: Brain cells on the move. *Progress in Neurobiology*, *178*, 101612. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2019.04.001>
- Sparks, B. F., Friedman, S. D., Shaw, D. W., Aylward, E. H., Echelard, D., Artru, A. A., Maravilla, K. R., Giedd, J. N., Munson, J., Dawson, G., & Dager, S. R. (2002). Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. *Neurology*, *59*(2), 184–192. <https://doi.org/10.1212/WNL.59.2.184>
- Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., & Garel, S. (2014). Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Reports*, *8*(5), 1271–1279. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.042>
- Squire, L. R., & Wixted, J. T. (2011). The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 34, Issue 1). <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113720>
- Stark, C. E. L., & Okado, Y. (2003). Making Memories without Trying: Medial Temporal Lobe Activity Associated with Incidental Memory Formation during Recognition. *Journal of Neuroscience*, *23*(17), 6748–6753. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-17-06748.2003>
- Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y., & Malenka, R. C. (2005). Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor- α . *Journal of Neuroscience*, *25*(12), 3219–3228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005>
- Stellwagen, D., & Malenka, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, *440*(7087), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nature04671>
- Stojanovic, I., Cuzzocrea, S., Mangano, K., Mazzon, E., Miljkovic, D., Wang, M., Donia, M., Al Abed, Y., Kim, J., Nicoletti, F., Stosic-Grujicic, S., & Claesson, M. (2007). In vitro, ex vivo and in vivo immunopharmacological activities of the isoxazoline compound VGX-1027: Modulation of cytokine synthesis and prevention of both organ-specific and systemic autoimmune diseases in murine models. *Clinical Immunology*, *123*(3), 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.03.004>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(10), 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Streit, W. J., Condeelis, J. R., Fendrick, S. E., Flanary, B. E., & Mariani, C. L. (2005). Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurological Research*, *27*(7), 685–691. <https://doi.org/10.1179/016164105X49463>
- Strickland, M. R., & Holtzman, D. M. (2019). Dr. Jekyll and Mr. Hyde: ApoE explains opposing effects of neuronal LRP1. *The Journal of Clinical Investigation*, *129*(3), 969–971. <https://doi.org/10.1172/JCI127578>
- Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., Yoshihara, Y., Omata, K., Matsumoto, K., Tsuchiya, K. J., Iwata, Y., Tsujii, M., Sugiyama, T., & Mori, N. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *Archives of General Psychiatry*, *70*(1), 49–58. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.272>
- Suzumura, A., Marunouchi, T., & Yamamoto, H. (1991). Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Research*, *545*(1–2), 301–306. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91302-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91302-H)
- Sweeten, T. L., Posey, D. J., & McDougle, C. J. (2003). High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *American Journal of Psychiatry*, *160*(9), 1691–1693. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.9.1691>

- Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., Brône, B., Legendre, P., & Rigo, J. M. (2013). Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia*, *61*(2), 150–163. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22421>
- Tan, Y. L., Yuan, Y., & Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular Psychiatry*, *25*(2), 351–367. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 1181–1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Tetreault, N. A., Hakeem, A. Y., Jiang, S., Williams, B. A., Allman, E., Wold, B. J., & Allman, J. M. (2012). Microglia in the cerebral cortex in autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *42*(12), 2569–2584. <https://doi.org/10.1007/s10803-012-1513-0>
- Tobe, R., Kim, Y. S., Owley, T. B., & Leventhal, B. L. (2012). The Autistic Spectrum Disorders. In *Clinical Child Psychiatry* (pp. 353–376). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119962229.ch21>
- Tomova, A., Keményová, P., Filčíková, D., Szapuová, Z., Kováč, A., Babinská, K., & Ostatníková, D. (2019). Plasma levels of glial cell marker S100B in children with autism. *Physiological Research*, *68*, S315–S323. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934350>
- Toro, R., Konyukh, M., Delorme, R., Leblond, C., Chaste, P., Fauchereau, F., Coleman, M., Leboyer, M., Gillberg, C., & Bourgeron, T. (2010). Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends in Genetics : TIG*, *26*(8), 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.05.007>
- Torrico, B., Shaw, A. D., Mosca, R., Vivó-Luque, N., Hervás, A., Fernández-Castillo, N., Aloy, P., Bayés, M., Fullerton, J. M., Cormand, B., & Toma, C. (2019). Truncating variant burden in high-functioning autism and pleiotropic effects of LRP1 across psychiatric phenotypes. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, *44*(5), 350–359. <https://doi.org/10.1503/jpn.180184>
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). *Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development*. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, *57*(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>
- Veith, G. L., & Rice, G. E. (1999). Interferon gamma expression during human pregnancy and in association with labour. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, *48*(3), 163–167. <https://doi.org/10.1159/000010165>
- Velmeshev, D., Schirmer, L., Jung, D., Haeussler, M., Perez, Y., Mayer, S., Bhaduri, A., Goyal, N., Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2019). Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science*, *364*(6441), 685–689. <https://doi.org/10.1126/science.aav8130>
- Vernay, A., Lamrabet, O., Perrin, J., & Cosson, P. (2018). TM9SF4 levels determine sorting of transmembrane domains in the early secretory pathway. *Journal of Cell Science*, *131*(21). <https://doi.org/10.1242/JCS.220830/265816/AM/TM9SF4-LEVELS-DETERMINE-SORTING-OF-TRANSMEMBRANE>
- Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., & Gressens, P. (2010). Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *Journal of Anatomy*, *217*(4), 436–448. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01245.x>
- Veroni, C., Gabriele, L., Canini, I., Castiello, L., Coccia, E., Remoli, M. E., Columba-Cabezas, S., Aricò, E.,

- Aloisi, F., & Agresti, C. (2010). Activation of TNF receptor 2 in microglia promotes induction of anti-inflammatory pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *45*(3), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.06.014>
- Vorstman, J. A. S., Parr, J. R., Moreno-De-Luca, D., Anney, R. J. L., Nurnberger, J. I., & Hallmayer, J. F. (2017). Autism genetics: Opportunities and challenges for clinical translation. *Nature Reviews Genetics*, *18*(6), 362–376. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.4>
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., & Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *Journal of Neuroscience*, *29*(13), 3974–3980. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009>
- Wakselman, S., Béchade, C., Roumier, A., Bernard, D., Triller, A., & Bessis, A. (2008). Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *Journal of Neuroscience*, *28*(32), 8138–8143. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1006-08.2008>
- Wang, F., Yuan, T., Pereira, A., Verkhratsky, A., Huang, J. H., & Huang, J. H. (2016). Glial Cells and Synaptic Plasticity. *Neural Plasticity*, *2016*, 5042902. <https://doi.org/10.1155/2016/5042902>
- Wang, G., Zhang, H., Sun, J., Zhang, Y., He, F., & Zou, J. (2021). Cyclosporin A impairs neurogenesis and cognitive abilities in brain development via the IFN- γ -Shh-BDNF pathway. *International Immunopharmacology*, *96*, 107744. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2021.107744>
- Wang, J., Zou, Q., Han, R., Li, Y., & Wang, Y. (2017). Serum levels of Glial fibrillary acidic protein in Chinese children with autism spectrum disorders. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *57*, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.01.004>
- Warre-Cornish, K., Perfect, L., Nagy, R., Duarte, R. R. R., Reid, M. J., Raval, P., Mueller, A., Evans, A. L., Couch, A., Ghevaert, C., McAlonan, G., Loth, E., Murphy, D., Powell, T. R., Vernon, A. C., Srivastava, D. P., & Price, J. (2020). Interferon- γ signaling in human iPSC-derived neurons recapitulates neurodevelopmental disorder phenotypes. In *Science Advances* (Vol. 6, Issue 34). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay9506>
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., Ma, S. Y., Chauhan, A., Chauhan, V., Bobrowicz, T. W., De Leon, M., Saint Louis, L. A., Cohen, I. L., London, E., Brown, W. T., & Wisniewski, T. (2010). The neuropathology of autism: Defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathologica*, *119*(6), 755–770. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0655-4>
- Wei, H., Alberts, I., & Li, X. (2014). The apoptotic perspective of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *36*, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.04.004>
- Wei, H., Zou, H., Sheikh, A. M., Malik, M., Dobkin, C., Brown, W. T., & Li, X. (2011). IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *Journal of Neuroinflammation*, *8*. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-52>
- Werling, D. M., & Geschwind, D. H. (2013). Sex differences in autism spectrum disorders. In *Current Opinion in Neurology* (Vol. 26, Issue 2, pp. 146–153). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32835ee548>
- Wilkes, B. J., Bass, C., Korah, H., Febo, M., & Lewis, M. H. (2019). Volumetric magnetic resonance and diffusion tensor imaging of C58/J mice: neural correlates of repetitive behavior. *Brain Imaging and Behavior*, *2018*. <https://doi.org/10.1007/s11682-019-00158-9>
- Willis, C. L., Garwood, C. J., & Ray, D. E. (2007). A size selective vascular barrier in the rat area postrema formed by perivascular macrophages and the extracellular matrix. *Neuroscience*, *150*(2), 498–509.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.023>

- Wing, L., & Potter, D. (2002). The epidemiology of autistic spectrum disorders: Is the prevalence rising? *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(3), 151–161. <https://doi.org/10.1002/mrdd.10029>
- World Health Organization. (2004). *ICD-10: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems: tenth revision*. (2nd ed, p. Spanish version, 1st edition published by PAHO as). World Health Organization.
- Wu, H., Wang, X., Gao, J., Liang, S., Hao, Y., Sun, C., Xia, W., Cao, Y., & Wu, L. (2017). Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. *Life Sciences*, 173, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.01.012>
- Xie, M., Mak, J. W. Y., Yu, H., Cheng, C. T. Y., Chan, H. C. H., Chan, T. T., Lau, L. H. S., Wong, M. T. L., Ko, W. H., Jiang, L., & Yao, X. (2022). TM9SF4 Is a Crucial Regulator of Inflammation and ER Stress in Inflammatory Bowel Disease. *CMGH*, 14(2), 245–270. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.04.002>
- Xu, G., Strathearn, L., Liu, B., & Bao, W. (2018). Prevalence of autism spectrum disorder among US children and adolescents, 2014–2016. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 319(1), 81–82. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.17812>
- Yang, L., Liu, C. C., Zheng, H., Kanekiyo, T., Atagi, Y., Jia, L., Wang, D., N'songo, A., Can, D., Xu, H., Chen, X. F., & Bu, G. (2016). LRP1 modulates the microglial immune response via regulation of JNK and NF- κ B signaling pathways. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12974-016-0772-7/FIGURES/6>
- Yang, T., Guo, R., & Zhang, F. (2019). Brain perivascular macrophages: Recent advances and implications in health and diseases. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 25(12), 1318–1328. <https://doi.org/10.1111/cns.13263>
- Yates, K., & Couteur, A. Le. (2016). Diagnosing autism / autism spectrum disorders. *Paediatrics and Child Health*, 26(12), 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2016.08.004>
- Zeidán-Chuliá, F., Salmina, A. B., Malinovskaya, N. A., Noda, M., Verkhatsky, A., Cláudio, J., Moreira, F., & Moreira, J. C. F. (2014). The glial perspective of autism spectrum disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 38, 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.11.008>
- Zeidan, J., Fombonne, E., Scora, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., & Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research*, 15(5), 778–790. <https://doi.org/10.1002/AUR.2696>
- Zeidman, P., & Maguire, E. A. (2016). Anterior hippocampus: The anatomy of perception, imagination and episodic memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(3), 173–182. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.24>
- Zeineh, M. M., Engel, S. A., Thompson, P. M., & Bookheimer, S. Y. (2003). Dynamics of the hippocampus during encoding and retrieval of face-name pairs. *Science*, 299(5606), 577–580. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1077775/SUPPL_FILE/ZEINEH.SOM.PDF
- Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., Vyssotski, A. L., Bifone, A., Gozzi, A., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, 17(3), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3641>
- Zhang, C., Zhang, Y. P., Li, Y. Y., Liu, B. P., Wang, H. Y., Li, K. W., Zhao, S., & Song, C. (2019). Minocycline ameliorates depressive behaviors and neuro-immune dysfunction induced by chronic unpredictable mild stress in the rat. *Behavioural Brain Research*, 356, 348–357.

<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2018.07.001>

Zhang, K., & Luo, J. (2019). Role of MCP-1 and CCR2 in alcohol neurotoxicity. *Pharmacological Research*, 139, 360–366. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2018.11.030>

Zhou, X., Fragala, M. S., McElhaney, J. E., & Kuchel, G. A. (2010). Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13(5), 541–547. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833cf3bc>

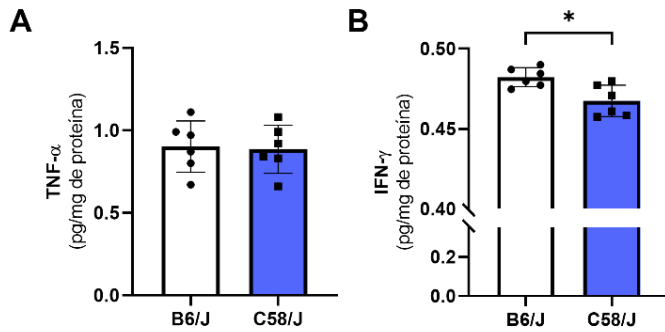
IV. Anexos

Anexo I. Lista de anticuerpos utilizados

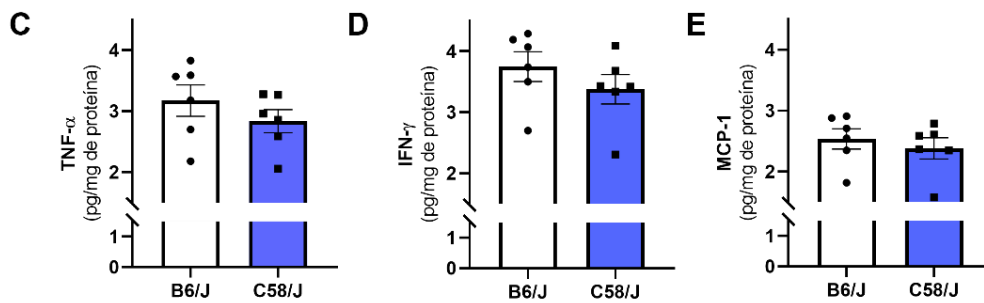
Nombre del anticuerpo	Fabricante, No. cat., No. lote.	Proteína blanco	Secuencia del antígeno	Especie, clonalidad	Dilución utilizada
Anti-NOS2 (C-11)	Santa Cruz Biotechnology, cat. sc-7271, lote H2520.	Óxido nítrico inducible (iNOS)	Aminoácidos 1126-1144 del carboxilo terminal de iNOS.	IgG1 monoclonal de ratón.	1:200
Anti-Arginase 1	Invitrogen, cat. PA5-18392, lote VI3086052.	Arginasa 1 (ARG1)	Péptido sintético CFGLAREGNHKPID del al carboxilo terminal de ARG1.	IgG policlonal de cabra	1:500
Goat anti-mouse IgG (HRP)	Abcam, cat. ab6789, lote GR3234.	Anticuerpo secundario anti-IgG de ratón desarrollado en cabra y conjugado a HRP	IgG de ratón	IgG policlonal de cabra	1:20,000
Donkey anti-goat IgG (HRP)	Santa Cruz Biotechnology, cat. sc-2020, lote n.d.	Anticuerpo secundario anti-IgG de ratón desarrollado en cabra y conjugado a HRP	IgG de cabra	IgG policlonal de burro	1:15,000

n.d. no disponible

Cerebros totales de embrión



Hipocampo adulto



Anexo II. Cuantificación de IFN- γ , TNF- α y MCP-1 en los cerebros totales de fetos en el E18 y en el hipocampo de ratones macho adultos de ambas cepas utilizando la cantidad (mg) de proteína para normalizar el contenido de citocinas. Cuantificación del contenido de **A) TNF- α** y **B) IFN- γ** en cerebros totales de fetos en el E18. Cuantificación de **C) TNF- α** , **D) IFN- γ** y **E) MCP-1** en el hipocampo de ratones macho de diez semanas de edad de ambas cepas. Las gráficas representan la media \pm E.E.M.; $n = 7$ (cerebros totales de fetos), $n = 6$ (hipocampos adultos). El análisis estadístico se realizó empleando la prueba t de Student de dos colas, para muestras no pareadas. * $p < 0.05$.

Anexo III. Lista de polimorfismos de nucleótido único identificados en genes relevantes para la identidad de la microglía y la respuesta inmunitaria a partir del conjunto de datos Sanger4 (MPD:388).

<i>Cromosoma</i>	<i>bp38</i>	<i>rs</i>	<i>Observado</i>	<i>Anotación</i>	<i>Símbolo del gen</i>	<i>Nombre del gen</i>
2	34989210	rs27169018	C/T	Cn		
2	35013637	rs13476427	C/T	Cn		
2	35019651	rs27168919	C/T	Cs		
2	35019663	rs27168918	C/T	Cs		
2	35028134	rs27168886	A/G	Cs		
2	35028174	rs27168885	A/G	Cn		
2	35029436	rs27168875	A/G	Cs	<i>Hc</i>	Hemolytic complement
2	35030459	rs27168872	C/T	Cn		
2	35035977	rs27168831	A/G	Cs		
2	35036022	rs27168830	A/G	Cs		
2	35045325	rs219584343	C/T	Cs		
2	35045912	rs27168790	A/G	Cs		
2	35057396	rs252751350	C/T	Cs		
2	122685194	rs27468242	C/G	Cn	<i>Slc30a4</i>	Zinc transporter 4
2	122702118	rs51084527	C/T	Cs		
2	153194345	rs28300416	C/T	Cs		
2	153203880	rs13476847	A/G	Cs	<i>Tm9sf4</i>	Transmembrane 9 superfamily member 4
2	153208645	rs28283264	C/T	Cs		
2	153208690	rs13476840	A/G	Cs		
3	135511812	rs13469706	A/G	Cn	<i>Manba</i>	Beta-mannosidase
3	135570332	rs30851979	C/T	Cn/NC		
3	135590375	rs13472037	C/T	Cs		
3	135601501	rs31054249	A/G	Cs	<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
3	135603838	rs13472038	C/T	Cs		

3	135608234	rs30771025	A/G	Cs		
3	135613666	rs13477428	C/T	Cs		
6	89332741	rs30021144	A/G	Cs		
6	89335215	rs30268797	A/T	Cs		
6	89340583	rs30856414	A/G	Cs		
6	89342639	rs30565102	A/G	Cs		
6	89354949	rs30226054	C/G	Cs		
6	89356509	rs49080641	G/T	Cs		
6	89356635	rs29829443	A/G	Cs		
6	89356674	rs30470909	C/T	Cs	<i>Plxna1</i>	Plexin-A1
6	89356746	rs30741189	A/G	Cs		
6	89356863	rs30664791	C/T	Cs		
6	89356932	rs30319587	C/T	Cs		
6	89357064	rs30841834	C/T	Cs		
6	89357343	rs47244655	C/G	Cs		
6	89360689	rs50699473	C/T	I		
6	89360693	rs48173097	A/G	I/Cn		
6	129468995	rs30117984	A/G/T	I/Cs/StopG/NC	<i>Clec7a</i>	C-type lectin domain family 7 member A
6	129470991	rs30165339	C/T	Cn/NC/I		
8	89028672	rs33111193	A/G	Cs		
8	89030664	rs33499749	A/G	Cs		
8	89031222	rs32715788	A/G	CS		
8	89031645	rs46230063	A/G	Cs		
8	89031654	rs51184631	A/G	Cs	<i>Sall1</i>	Sal-like protein 1
8	89031687	rs51871543	A/G	Cs		
8	89032044	rs33285465	C/T	Cs		
8	89032524	rs13479905	A/G	Cs		
8	89033190	rs32671401	A/G	Cs		

8	89033225	rs33019190	C/T	Cn				
8	89033274	rs33615446	C/T	Cs				
9	124124393	rs51935306	G/T	Cn				
9	124124454	rs8254378	A/G	Cs				
9	124124546	rs8254379	A/G	Cn				
9	124124557	rs8254380	A/G	Cn				
9	124124571	rs8254381	C/T	Cs				
9	124124581	rs8254382	C/T	Cs	<i>Ccr5</i>	C-C chemokine receptor type 5		
9	124124828	rs30141095	A/G	Cn				
9	124124840	rs215765133	C/T	Cn				
9	124124915	rs51122988	C/T	Cn				
9	124124998	rs8254385	A/G	Cn				
9	124125093	rs8254386	C/T	Cs				
9	124125315	rs46884338	G/T	Cn				
10	127541065	rs47680220	A/G	Cs				
10	127572954	rs29357071	A/G	Cs				
10	127577012	rs29347892	C/T	Cs				
10	127578130	rs29356512	A/G	Cs	<i>Lrp1</i>	Prolow-density lipoprotein receptor- related protein 1		
10	127578608	rs29344938	A/G	Cs				
10	127578643	rs29378254	G/T	Cs				
10	127581813	rs29342571	A/G	Cs				
10	127595386	rs29360347	A/G	Cs				
10	127605527	rs29364825	A/G	Cs				
11	75214077	rs108215173	G/T	I/Cn				
11	75214130	rs28216936	C/T	I/Cs			<i>Rtn4rl1</i>	Reticulon-4 receptor- like 1
11	75214146	rs49945763	C/T	I/Cn				
11	75265163	rs28216726	G/T	Cs/I				
11	75265445	rs13481103	C/T	Cs/I				

11	75265916	rs28216725	A/G	Cs/I		
11	75266037	rs29461496	C/T	Cn/I		
11	75214077	rs108215173	G/T	I/Cn		
11	75214130	rs28216936	C/T	I/Cs		
11	75214146	rs49945763	C/T	I/Cn		
11	75265163	rs28216726	G/T	Cs/I		
11	75265445	rs13481103	C/T	Cs/I		
11	75265916	rs28216725	A/G	Cs/I		
11	75266037	rs29461496	C/T	Cn/I		
17	66732307	rs47894850	C/T	I	<i>Ptpm</i>	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu
17	66732308	rs46374442	A/G	I		
17	66762190	rs13483078	C/T	Cs		
17	78655541	rs33613138	C/T	Cs		
17	78655556	rs29517830	C/T	Cs		
17	78656951	rs51675617	A/G	Cs		
17	78657927	rs49062742	C/T	Cs		
17	78660165	rs46071905	A/C/T	Cs		
17	78660186	rs48951565	C/T	Cs		
17	78660204	rs50460296	C/T	Cs		
17	78661820	rs47234737	A/G	Cs	<i>Strn</i>	Striatin
17	78664696	rs46777065	A/G	Cs		
17	78667251	rs33095308	C/T	Cs		
17	78670365	rs29501702	A/T	I		
17	78677403	rs49317682	C/T	Cs		
17	78682893	rs47813641	A/C	Cn		
17	78684376	rs33479015	A/G	Cs		
17	78692395	rs47156944	A/G	Cs		
17	78700945	rs33123704	A/G	Cs		

6	78377467	rs13478842	A/G	Cs	<i>Reg3d</i>	Reg III delta
10	3259314	rs29348769	C/T	Cn/I		
10	3259361	rs29353203	C/T	Cn/I		
10	3259766	rs29317055	C/T	Cn	<i>H60c</i>	Histocompatibility antigen 60c
10	3260343	rs13480463	A/C	Cn		
10	3260416	rs29358823	C/T	Cs		
2	157465910	rs13476864	A/G	Cs		
2	157469823	rs33064724	C/T	Cs	<i>Src</i>	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
2	157465910	rs13476864	A/G	Cs		
2	157469823	rs33064724	C/T	Cs		
11	46528416	rs13481009	A/C/G	Cn	<i>Gm12169</i>	Predicted gene 12169
11	46528591	rs28230503	A/G	Cn		
2	164734256	rs13476891	C/T	Cs	<i>Wfdc3</i>	WAP four-disulfide core domain protein 3
10	127742253	rs29381933	C/T	Cn		
10	127742413	rs29338595	C/T	Cs	<i>Zbtb39</i>	Zinc finger and BTB domain-containing 39
10	127742453	rs13480822	C/G	Cn		
10	127743270	rs33849832	C/G	Cn		
4	125068158	rs13474356	A/G	Cn/U5	<i>Snip1</i>	Smad nuclear-interacting protein 1
8	84031094	rs33078056	C/T	Cs		
8	84031391	rs32626564	C/T	Cs		
8	84032038	rs32861063	C/T	Cn		
8	84032100	rs6246587	A/G	Cn/U3	<i>Il27ra</i>	Interleukin-27 receptor subunit alpha
8	84034244	rs32851408	A/G	Cs		
8	84034274	rs50122130	G/T	Cs		
8	84036182	rs48535072	C/T	Cs/U3		
8	84040685	rs51624342	C/T	Cn		

8	84042194	rs50691714	A/G	Cs		
2	37429671	rs13476435	A/T	Cn	<i>Zbtb6</i>	Zinc finger and BTB domain-containing protein 6

- Cs** Codificante sinónimo
- Cn** Codificante no sinónimo
- U5** Variación de la región 5' UTR
- U3** Variación de la región 3' UTR
- I** Variación intrónica
- NC** Variación en gen RNA no codificante
- StopG** Codón de paro