



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



**“ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA NEURONAL EN RATONES C58/J Y
SUS IMPLICACIONES EN EL ESTUDIO DEL AUTISMO”**

PRESENTA:

SOFÍA LIZBETH CRUZ GUZMÁN

NÚMERO DE CUENTA 309022965

Tel.: 55 75 39 70 95

E- mail: sofia.guzman.93@hotmail.com

DIRECTOR DE TESIS: DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

REVISOR DE TESIS: FRUCTUOSO AYALA GUERRERO

SINODALES: CÉSAR CASASOLA CASTRO

ÓSCAR GALICIA CASTRO

ALEJANDRA AGUAYO

Ciudad de México, 2017



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 desarrollado en el Laboratorio de Neurobiología del Síndrome de Down de la Facultad de Psicología de la UNAM y con un apoyo del proyecto PAPIIT-IN304817 *“El papel de la trombospondina-1 (TSP-1) en la plasticidad neuronal asociada al síndrome de Down”*.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por estar a mi lado en cada paso que doy.

A la **UNAM**, la máxima casa de estudios, quien me brindó la oportunidad desde la Escuela Nacional Preparatoria No. 9 “Pedro de Alba” y posteriormente en la Facultad de Psicología para forjar mis estudios profesionales e inculcarme el amor por el desarrollo científico y la investigación teniendo siempre en cuenta el beneficio del ser humano, su cultura y su naturaleza.

A mi **familia** (padres, hermana, abuelos, tíos, primos) por ser parte de mi crecimiento personal, profesional y cultural. Por apoyarme siempre y compartir cada uno de mis logros, derrotas, debilidades y virtudes. Por el amor incondicional que me brindan y la felicidad que me inyectan a pesar de la distancia de algunos de ellos.

A mi director de tesis, **Dr. Octavio García**, quien me apoyo hasta el final. Gracias por su paciencia, sus críticas, su interés, empeño y dedicación constante.

A la **Dra. Aliesha González** por su apoyo en el desarrollo de la presente investigación.

A la **Dra. Natalia Arias** quien logró infundirme el amor por el campo de la investigación científica y ayudarme a ver el panorama en el que deseo desarrollarme profesionalmente.

Agradezco a mis grandes amigos, **Eli, Mau, Carlos, Armando, Leonardo, Bernardo, Mario y Jorge** por ser amigos ejemplares, por los momentos vividos; por hacerme sentir parte de sus vidas y encontrar el significado de la amistad.

A mis compañeros de laboratorio, **Enrique, Miroslava, Antonio, Edwin, Celeste, Alyson, Bart, Arturo y Omar** por sus críticas, sus enseñanzas, su apoyo, por compartir el amor por la investigación y sobre todo por siempre hacer más ameno el trabajo.

A mi primer amor por creer siempre en mí, por exigirme tanto como persona con firmeza y ternura al mismo tiempo. Por ayudarme a tener un carácter más sólido y nunca dejar

las cosas a medias. Por compartir conmigo tus miedos, tus sueños y proyectos y entender que todos mis miedos existen, solamente si yo se los permito. Por enseñarme que no es importante quien tiene más, sino quién con lo que tiene se inspira y logra lo imposible. Por enseñarme todo eso y más no con palabras sino con el ejemplo.

Y finalmente a **la vida**, quien me ha dado todo lo que he necesitado, quien me ha dado tormentas y días grises para valorar el color del arcoíris y el entendimiento de que a pesar de todo... ***LA VIE EST BELLE!***

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mi madre **Lilia** por ser uno de mis mayores ejemplos de determinación, lucha constante y amor incondicional. Por la ternura y la paz que solo en sus abrazos puedo encontrar.

A mi padre **Jorge**, por siempre tener la paciencia que el amor requiere, por sus consejos y su silencio cuando es necesario.

A ambos, por los valores que me inculcan día con día y por ser el pilar fundamental en mi educación, tanto académica, como en la que la vida requiere. Por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mi hermana **Ana**, quién siempre tiene una manera tan peculiar de hacerme reír a carcajadas y defenderme a su manera, a pesar de ser ella la menor.

A mis mascotas **Camila, Kalimán, Cossette y Nala** por la enorme alegría que siempre tienen cuando llego a casa. Por enseñarme a amar de una manera sobrehumana.

A **Octavio Villar**, por enseñarme que el 'NO PUEDO' no está permitido en mi vocabulario. Por los regaños necesarios, enojos, lágrimas, risas y bromas compartidas. Por motivarme en demasía y mostrarme que una persona inteligente es más hermosa que una bonita y la primera siempre vale mucho más.

A mis compañeras de entrenamiento: **Paty, Thali, Kari y Gaby** gracias por ayudarme a dirigir el coraje, la ansiedad, los miedos y preocupaciones para obtener un beneficio personal. Por ayudarme a entender que siempre podemos soportar un poco más de lo que creemos y creerlo de verdad. Por compartir el amor hacia el deporte y la vida.

Por último, dedico esta tesis a mi gran amor, por encontrar y conocer a un hombre más fuerte en mente y espíritu que cualquiera que conozco. Porque siempre amé eso de ti, tu nobleza y tu buen corazón. Por todas las enseñanzas que me dejaste, las llevo en lo más profundo de mi alma aunque ya no seas parte de mi vida.

Sofía

*“I know I'm bad for everything,
that's why I always act like I'm the best”*

| ÍNDICE | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMEN..... | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| ANTECEDENTES..... | 5 |
| Trastorno del Espectro Autista (TEA)..... | 5 |
| Alteraciones cerebrales en el TEA..... | 7 |
| Morfología neuronal y autismo..... | 9 |
| Modelos animales para el estudio del TEA..... | 15 |
| Ratón C58/J como modelo para el estudio del autismo..... | 16 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 17 |
| HIPÓTESIS..... | 18 |
| OBJETIVOS..... | 18 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 19 |
| Animales..... | 19 |
| Impregnación de Golgi..... | 20 |
| Análisis de la morfología neuronal..... | 21 |
| Análisis cuantitativo de espinas dendríticas..... | 24 |
| Clasificación de espinas dendríticas..... | 26 |
| Análisis estadístico..... | 28 |
| RESULTADOS..... | 29 |
| Las neuronas corticales del ratón C58/J presentan alteraciones morfológicas..... | 29 |
| Las neuronas corticales del ratón C58/J muestran un mayor número mayor número de espinas dendríticas..... | 32 |
| Morfología de espinas dendríticas en neuronas corticales del ratón C58/J..... | 33 |
| DISCUSIÓN..... | 34 |
| CONCLUSIONES..... | 39 |
| REFERENCIAS..... | 40 |

RESUMEN

El Trastorno del Espectro Autista (TEA), es un desorden del neurodesarrollo caracterizado principalmente por déficit en la comunicación social y comportamientos repetitivos excesivos. Alteraciones en la organización cortical, conectividad neuronal y un incremento en el número de espinas dendríticas han sido descritas en cerebros con personas diagnosticadas con TEA. Sin embargo, la relación entre las conductas asociadas al TEA y las modificaciones neuroanatómicas no han sido totalmente establecidas. El ratón C58/J presenta una falta de sociabilidad y múltiples conductas estereotipadas, sin embargo, se desconoce si este ratón presenta alteraciones en la morfología neuronal similares a las descritas en el cerebro de pacientes con autismo. Por lo que el objetivo de esta tesis fue conocer si los ratones C58/J presentan alteraciones en la morfología neuronal. Los resultados mostraron que las neuronas corticales del ratón C58/J presentan ramificaciones dendríticas más largas y numerosas así como un mayor número de puntos terminales con respecto a los ratones control. Además se pudo observar un incremento en el número total de espinas dendríticas. Un análisis de la morfología de las espinas dendríticas demostró un aumento en las espinas tipo filipoideas y larga-delgada así como un decremento en las espinas tipo *hongo*. Las espinas con forma redondeada y delgada no tuvieron cambios. Los resultados de esta tesis sugieren que las neuronas corticales del ratón C58/J presentan una arborización dendrítica alterada y modificaciones en la densidad y tipo de espinas dendríticas. Estas modificaciones podrían estar asociadas al fenotipo conductual del ratón C58/J.

INTRODUCCIÓN

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es definido por el *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales* en su 5ª edición (DSM-5), como un desorden del neurodesarrollo diagnosticado por déficits en dos elementos centrales del comportamiento: 1) inusuales interacciones sociales y alteración en la comunicación social y 2) conductas estereotipadas y repetitivas con intereses restringidos (American Psychiatric Association, 2013). El diagnóstico para dicho trastorno es fundamentalmente clínico ya que no existe ningún examen biológico que pueda validarlo (Palau-Baduell, 2012). En México se calcula que existe una incidencia de 1 de cada 115 niños y una población estimada cerca de 400 000 infantes diagnosticados con TEA (Fombonne et al., 2016). Aunque los estudios epidemiológicos han reportado un incremento a nivel mundial de este padecimiento (Hill et al., 2016), las investigaciones enfocadas a entender las causas y mecanismos implicados en las conductas asociadas al TEA han recibido poca atención (De la Torre-Ubieta et al., 2016; Barak y Feng, 2016).

En los últimos años diversas investigaciones sugieren que las personas con TEA presentan alteraciones en la organización cortical que incluyen un aumento de la densidad de columnas corticales (Casanova et al., 2002; Courchesne et al., 2011), alta densidad neuronal e incremento en el número de espinas dendríticas (Hutsler y Zhang, 2010), así como alteraciones en la conectividad neuronal (Belmonte et al., 2004; Courchesne, 2004; Frith, 2004; Hughes, 2007; Rippon et al., 2007; Palau-Baduell, 2012; Calderoni et al., 2016; O'Reilly, 2017). Estas modificaciones podrían estar relacionadas con las conductas características del trastorno autista, sin embargo, esta asociación no ha sido totalmente establecida.

Numerosos modelos de ratones han sido utilizados para reproducir diversos síntomas conductuales presentes en enfermedades humanas (Vandamme, 2015; Leung y Jia, 2016). Estos modelos permiten estudiar la neurobiología y evaluar posibles estrategias terapéuticas. Los ratones C58/J muestran una falta de sociabilidad y múltiples conductas estereotipadas como las que prevalecen en el TEA (Moy et al., 2008; Ryan et al., 2010; Ellegood y Crawley, 2015; Silverman et al., 2010), sugiriendo su uso para estudiar mecanismos y alteraciones neuroanatómicas asociadas al TEA, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue conocer si los ratones C58/J presentan alteraciones en la morfología neuronal similares a las que se han reportado en personas con TEA.

ANTECEDENTES

Trastorno del Espectro Autista (TEA)

Los primeros intentos para describir lo que actualmente denominamos como Trastorno del Espectro Autista fueron realizados por el psiquiatra austriaco Leo Kanner y posteriormente por Hans Asperger. En 1943 Leo Kanner describió a un grupo de niños con aislamiento profundo que solían mostrar un deseo obsesivo de no aceptar cambios (Harris, 2016); con conductas que se caracterizaban por tener una relación intensa con objetos, movimientos repetitivos y una comunicación verbal anormal, todos ellos como signos de un comportamiento social inadecuado, definiéndolos por primer vez con el término autista (del griego que significa “*uno mismo*”) (Artigas-Pallarès y Pérez, 2012; Barak y Feng, 2016). Un año después Hans Asperger, incluyó la falta de empatía, ingenuidad; poca habilidad para hacer amigos, lenguaje pedante y repetitivo; pobre comunicación no verbal, interés desmesurado por ciertos temas; torpeza motora y mala coordinación (Barahona-Corrêa y Filipe, 2016), posteriormente conocido como síndrome de Asperger.

Tanto Kanner como Asperger sugerían un diagnóstico con base a determinantes emocionales ligadas a un vínculo materno, apoyándose fuertemente en el psicoanálisis dejando a un lado los aspectos genéticos y de funcionamiento del sistema nervioso. Actualmente se considera al autismo como un trastorno con diversos aspectos genéticos, fenomenológicos y etiológicos (Artigas-Pallarès y Pérez, 2012), que abarca a un grupo heterogéneo de desórdenes del neurodesarrollo como el trastorno autista, síndrome de Asperger y trastorno generalizado del desarrollo (TGD) no especificado. Estos tres grupos en su

conjunto forman el denominado “Trastorno del Espectro Autista” (TEA) (Artigas-Pallarès y Pérez, 2012; Harris, 2016).

El TEA es caracterizado principalmente por déficits en la comunicación social e interacciones sociales así como conductas repetitivas y estereotipadas, con intereses y actividades restringidas a menudo acompañados por anormalidades sensoriales y un retardo en el desarrollo del lenguaje o ausencia del mismo. Estos síntomas suelen presentarse en la primera infancia (es decir, alrededor de los 2 años de edad), impidiendo la realización de las actividades cotidianas del individuo, sin embargo, la mayoría de las personas con TEA son diagnosticadas después de la edad de 5 años (APA, 2013; Ecker, 2017).

La incidencia a nivel mundial del TEA es de 1:1000 (Hill et al., 2016); esta cifra ha aumentado de manera constante debido a los nuevos criterios que existen para su diagnóstico (Harris, 2016). El TEA muestra una prevalencia mayor en hombres que en mujeres (9:1 respectivamente) (De la Torre-Ubieta et al., 2016; Hill, 2016). Actualmente se considera que más del 1% de la población podría ser diagnosticada con TEA, teniendo en al menos el 20% de los casos una causa genética (Delorme, 2013; Harris, 2016).

El TEA tiene un fuerte componente genético por lo que se considera uno de los trastornos psiquiátricos hereditarios más comunes (Barak y Feng, 2016; De la Torre-Ubieta et al., 2016). Las alteraciones genéticas podrían influir en el desarrollo del sistema nervioso central y esto estar involucrado en las anomalías conductuales asociadas al TEA (Barak y Feng, 2016).

Alteraciones cerebrales en el TEA

En los últimos años diversas evidencias sugieren que las personas con TEA podrían tener numerosas alteraciones en la arquitectura cerebral relacionadas con su desarrollo (Peca y Feng 2012; Zoghbi y Bear, 2012). Por ejemplo, se ha reportado que los infantes autistas tienen un cerebro de tamaño promedio al nacimiento, posteriormente su cerebro crece más rápido que el normal (Courchesne et al., 2005, Courchesne et al., 2011), este crecimiento anormal comienza de los 9 a los 18 meses de edad (Figura 1). En este periodo crítico del desarrollo postnatal, el cerebro de los pacientes autistas puede aumentar hasta un 10% de su tamaño (Courchesne y Carper, 2005), posteriormente durante el segundo y tercer periodo de crecimiento, que van de los 2-5 años de edad y 5-11 años de edad respectivamente, el cerebro de los pacientes autistas presenta un retardo en el crecimiento. Adicionalmente se ha demostrado que la corteza cerebral en el TEA puede tener diversas alteraciones en la conectividad neuronal (Belmonte et al., 2004; Courchesne, 2004; Frith, 2004; Hughes, 2007; Rippon et al., 2007; Palau-Baduell, 2012; Mohammad-Rezazadeh et al., 2016; O'Reilly, 2017). Otros estudios han demostrado que personas con TEA tienen una hipoactivación de la amígdala cuando son sometidos a una tarea de reconocimiento facial (Courchesne et al, 2006; Barak y Feng, 2016).

Estas diferencias macroestructurales (Courchesne et al., 2011; Lew et al., 2017) podrían relacionarse con un desarrollo anormal de procesos cognitivos implicados en su **inadecuado comportamiento social**. Por otro lado, se han reportado diferencias en la microestructura del cerebro con TEA que incluyen un incremento en la densidad de columnas corticales (Casanova et al., 2002), incremento en el

espesor cortical (Courchesne et al., 2011), alta densidad neuronal, neuronas supernumerarias en la capa molecular, pequeñas áreas de desorganización y pobre diferenciación en los límites de la materia gris y blanca (Courchesne et al., 2011). La materia blanca del cerebro autista exhibe anomalías como un axón delgado y axones menos mielinizados (Delorme et al., 2013; Zikopoulos y Barbas, 2010), así como alteraciones en la neurogénesis, morfología neuronal, función sináptica (Martínez-Cerdeño, 2017; Delorme et al., 2013; De la Torre-Ubieta et al., 2016), heteropatías neuronales (Bailey et al., 1998; Delorme et al., 2013; De la Torre-Ubieta et al., 2016), sobreexpresión de neuronas inhibitorias (De la Torre-Ubieta et al., 2016), incremento en la densidad de espinas dendríticas (Hutsler y Zhang, 2010; Delorme et al., 2013; Martínez-Cerdeño, 2017) y una mala expresión de genes vinculados a la sinaptogénesis (Zoghbi y Bear, 2012; Delorme et al., 2013; De la Torre-Ubieta et al., 2016).

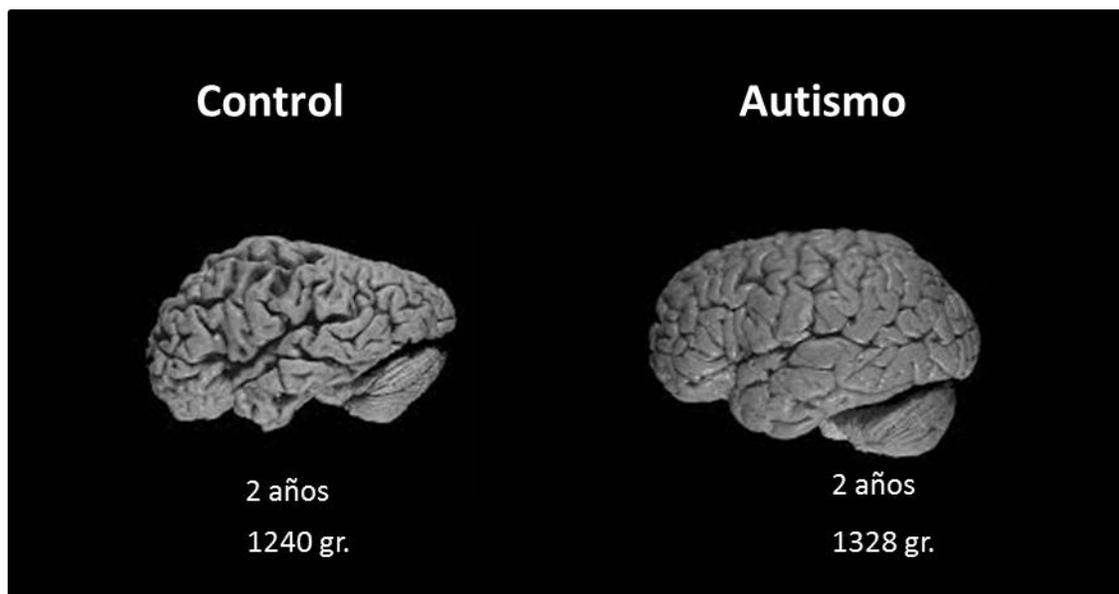


Figura 1. Representación del volumen de un cerebro con desarrollo normal y uno autista, ambos de dos años de edad. Modificado de Courchesne et al., 2011.

Morfología Neuronal y Autismo

El desarrollo del cerebro involucra la formación de millones de células llamadas neuronas y de las conexiones entre ellas. El cerebro humano se compone de cien mil millones de neuronas interconectadas en circuitos neuronales funcionales que subyacen a todos nuestros comportamientos, pensamientos, emociones y son los responsables de realizar funciones complejas como el lenguaje, aprendizaje y memoria que permiten asimilar la información del exterior.

Una neurona típica está formada por un soma o cuerpo celular, una serie de ramificaciones conocidas como dendritas y una segunda ramificación con mayor longitud llamada axón. El conjunto de dendritas se conoce como arborización o ramificación dendrítica (Figura 2). Las dendritas se originan en el soma neuronal y son las encargadas de recibir información proveniente de otras neuronas, su número y longitud puede ser muy variable y suelen bifurcarse en ángulos agudos originando ramas o dendritas primarias, secundarias, terciarias, etc., los patrones de ramificación pueden ser simples o complejos pero siempre típicos para cada tipo neuronal.

Durante el desarrollo las ramificaciones dendríticas permiten nuevas conexiones neuronales. La mayoría de estas conexiones se dan a través de pequeñas protuberancias que emergen de las dendritas y que le confieren un aspecto espinoso, a estas protuberancias se les conoce como espinas dendríticas (Hering y Sheng, 2001). Las espinas se consideran los principales sitios de comunicación nerviosa o sinapsis (Álvarez y Sabatini, 2007) y representan un medio por el cual se establecen nuevos contactos entre las neuronas y/o se fortalecen los contactos ya establecidos (Tønnesen y Nägerl, 2016) (Figura 2). Una arborización extensa

puede considerarse un signo de complejidad debido al aumento del número de conexiones sinápticas que permite.

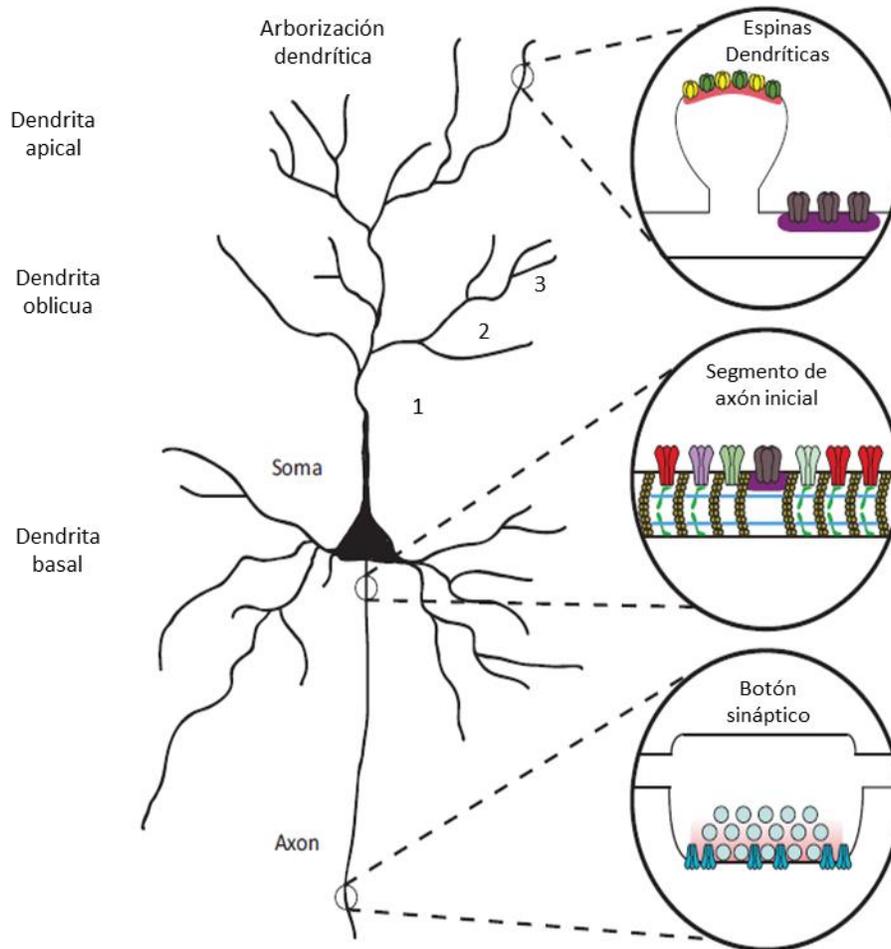


Figura 2. Morfología de la neurona. La imagen muestra los principales componentes de la neurona. A partir del soma o cuerpo neuronal emergen las dendritas, las cuales son clasificadas en basales si están cercanas al soma, oblicuas en la parte media y apicales si se alejan del soma. Los números representan ejemplo de bifurcación de las dendritas que sirven para clasificar a la dendrita en primaria (1), secundaria (2) y terciaria (3). Las dendritas presentan protuberancias, que se conocen como espinas dendríticas consideradas el principal componente postsináptico de la mayoría de las sinapsis excitadoras. El conjunto de todas las dendritas es llamado arborización dendrítica. La ramificación con mayor longitud representa el axón. Modificado de Wefelmeyer et al., 2016.

Anatómicamente, se ha determinado que la espina está conformada por tres componentes principales: base (unida a la dendrita), cuello y cabeza (Figura 3) (Nimchinsky et al., 2002, Ballesteros-Yáñez et al., 2006; Arellano et al., 2007;

Hotulainen y Hoogenraad, 2010), sitio donde generalmente se forma el contacto con la presinápsis (Hering y Sheng, 2001). El diámetro y largo de la cabeza y longitud del cuello de la espina han sido utilizados para clasificar a las espinas (Figura 3), describiéndose cuatro formas principales de espinas dendríticas: delgada, en forma de copa, corta y hongo (Figura 4).

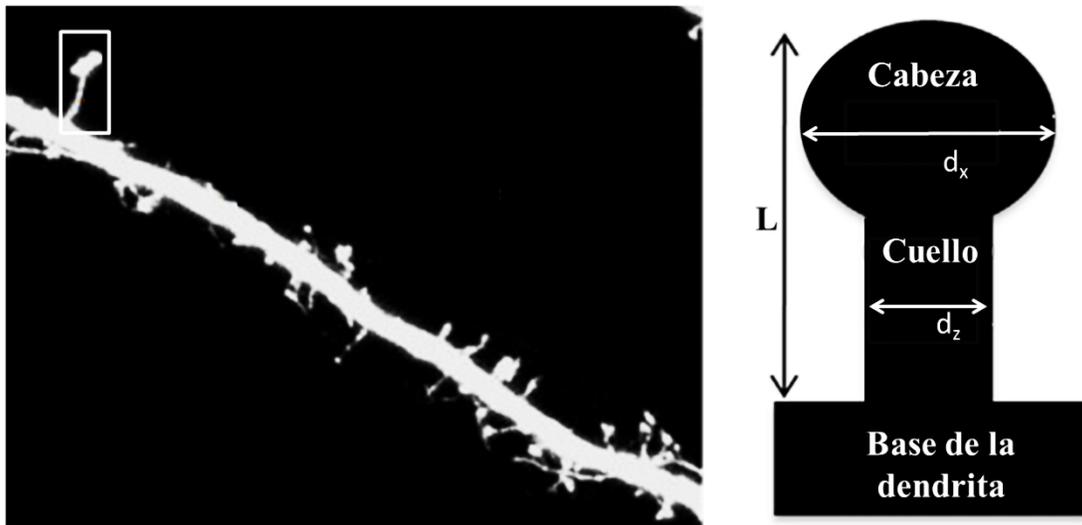


Figura 3. Morfología general de las espinas dendríticas. Las espinas se clasifican de acuerdo al diámetro de la cabeza, cuello de la espina y la longitud de las mismas. d_x (diámetro de la cabeza), d_z (diámetro del cuello), L (Longitud). Modificada de Wang et al, 2016.

Las espinas dendríticas son estructuras heterogéneas dinámicas o móviles, su forma, tamaño y número cambia por la actividad y la experiencia a través de la vida, en un principio respondiendo a un dictamen genético y posteriormente a la propia actividad neuronal (Yang et al., 2009), sugiriendo un papel importante de estas estructuras en la plasticidad sináptica. Alteraciones en la forma y el tamaño

de estas protuberancias podrían interferir en la adecuada conexión sináptica y alterar el correcto funcionamiento cerebral (Hotulainen y Hoogenraad, 2010).

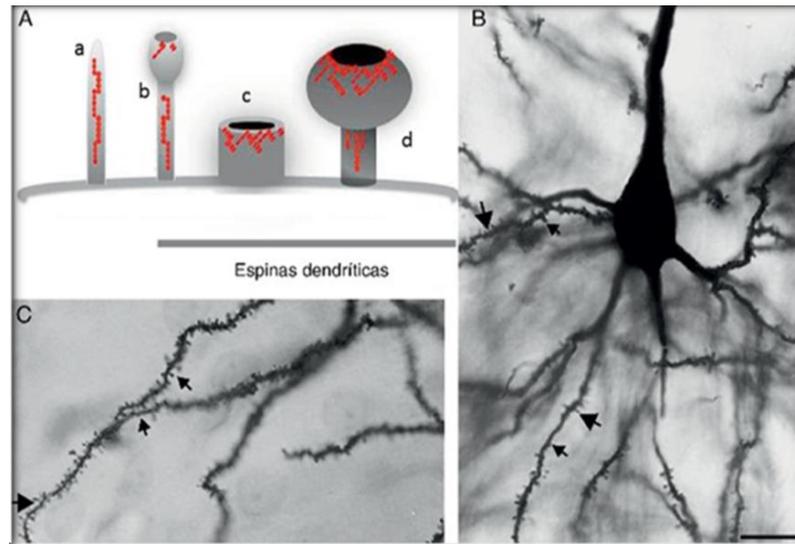


Figura 4. **A)** Representación esquemática de las espinas dendríticas: **a.** delgada, **b.** en forma de copa, **c.** corta, **d.** hongo. **B)** Fotomicrografía de una neurona piramidal de la tercera capa de la corteza cerebral prefrontal de una rata; en la que se muestran las diferentes formas de espinas dendríticas a lo largo de la dendrita basal. **C)** Amplificación del segmento de dendrita mostrando las espinas. Barra de 25 μ m. Modificado de Soria y Pérez, 2012.

En las personas con TEA se ha encontrado alteraciones en la morfología neuronal y disminución de la conectividad sináptica (Palau-Baduell, 2012), que podría estar asociado a una mala integración de la información y una inadecuada interacción

con el entorno. Por ejemplo, en el hipocampo de personas autistas se ha reportado una reducción en la complejidad de los árboles dendríticos y una alta densidad celular (Kemper y Bauman, 1996), mientras que el cerebelo presenta una pérdida de células de Purkinje (Ritvo et al., 1986; Bailey et al., 1998).

Algunos estudios han demostrado que en la corteza cerebral de individuos con TEA existe un incremento en la densidad de espinas dendríticas (Hutsler y Zhang, 2010; Phillips y Pozo-Miller, 2015; De la Torre-Ubieta, 2016). Este aumento se observa tanto en las dendritas basales, apicales y de manera significativa en las dendritas oblicuas de las neuronas localizadas en la capa II de la corteza cerebral (Hutsler y Zhang, 2010) (Figura 5). El incremento en la densidad de espinas dendríticas también se ha observado en diversos modelos animales de autismo (Niesman et al., 2011; Wang et al., 2011; Schmeisser et al., 2012; Isshiki et al., 2014; Tang et al., 2014; Schuster et al., 2015; Hullinger et al., 2016; Mei et al., 2016), sugiriendo una característica común en la neuropatología del autismo. Sin embargo, aún no es claro si alteraciones en las espinas dendríticas están asociadas con la aparición y progresión de los síntomas relacionados con el TEA y tampoco se sabe si esta malformación es una causa o una consecuencia de algunas perturbaciones cognitivas.

Adicionalmente alteraciones en la morfología de las espinas han sido descritas en neuronas corticales en niños con discapacidad intelectual (Purpura, 1974), síndrome de Rett, síndrome de Down y síndrome de X frágil (Kaufmann y Mosser, 2000); en enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, neurológicas como la epilepsia y neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Penzes et al., 2011; Herms y Dorostkar, 2016). Las anomalías de las espinas dendríticas

podrían tener como resultado un grado sustancial de disfunción a nivel de las neuronas individuales afectando circuitos neuronales involucrados en las diversas funciones cognitivas (Dierssen y Ramakers, 2006; Zoghbi y Bear, 2012; Peca y Feng, 2012), sugiriendo un papel significativo de las espinas dendríticas en diversos procesos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central. Sin embargo, los mecanismos involucrados en estas alteraciones estructurales y funcionales no se conocen completamente (Kasai et al., 2010; Calderoni et al., 2016).

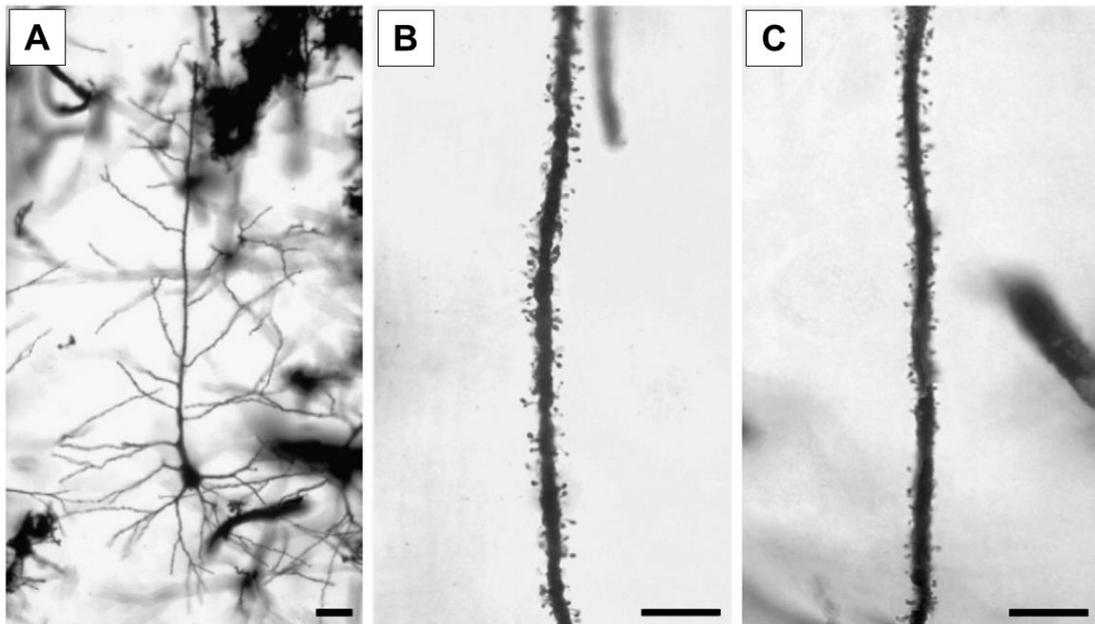


Figura 5. Neurona piramidal de un caso con TEA. La neurona muestra una impregnación nítida a la tinción de Golgi (A). Segmentos de dendritas apicales que muestran densidad de espinas de células piramidales de TEA (B) y sujetos control (C). Escala de la barra A = 25 μm ; B y C = 20 μm . Modificado de Hutsler y Zhang, 2010.

Por otro lado, se sabe que en los primeros años de vida del niño se forman miles de millones de sinapsis; pero se eliminan gradualmente las conexiones

innecesarias (Kano y Hashimoto, 2009), las cuales permiten refinar la función de los circuitos neuronales. En el autismo este proceso no se lleva de manera adecuada (Tang et al., 2014); lo cual puede explicar porque los cerebros de niños y adolescentes con autismo presentan un exceso de sinapsis y espinas dendríticas en el cerebro (Courchesne et al., 2011; Tang et al., 2014).

Modelos animales para el estudio del TEA

El manejo de ratones como modelos de enfermedades humanas ha sido utilizado de manera constante en la investigación para entender los mecanismos involucrados en el desarrollo de una enfermedad y evaluar posibles estrategias terapéuticas (Vandamme, 2015; Leung y Jia, 2016). La alta prevalencia del TEA (Hill et al., 2016), demuestra que es necesario seguir buscando los posibles sustratos biológicos asociados en este trastorno y las anomalías neuroanatómicas que podrían estar involucradas en las alteraciones conductuales características de este desorden del neurodesarrollo. Debido a que en los últimos años diversas investigaciones sugieren una asociación entre mutaciones genéticas y la génesis del TEA (De la Torre-Ubieta et al., 2016; Nomura et al., 2017), diversos modelos animales basados en la inhibición de la expresión de genes han sido desarrollados para entender esta relación. Algunos de estos modelos incluyen mutaciones en los genes involucrados en el desarrollo de la sinapsis, síntesis de neurotransmisores, alteración en el equilibrio excitador-inhibitorio (E/I), señalización celular, transcripción, metilación y factores neurotróficos, entre otros (Silverman et al., 2010; Niesmann et al., 2011; Wang et al., 2011; Peca y Feng, 2012; Schmeisser et al., 2012; Isshiki et al., 2014; Tang et al., 2014; Schuster et al., 2015; Hullinger et

al., 2016; Mei et al., 2016; Nomura et al., 2017). Adicionalmente se han desarrollado cepas endogámicas como NOD/LtJ, NZB/B1NJ, PL/J, SJL/J, SWR/J, NLGN4, y C58/J (Silverman et al., 2010). Todos estos modelos muestran una o varias conductas relacionadas con el autismo.

Ratón C58/J como modelo para el estudio del autismo

La cepa de ratón C58/J fue desarrollada en 1921 a partir del apareamiento de hermanos provenientes de la camada 58 y 52 de sexo masculino. Los ratones fueron producidos por MacDowell en Cold Spring Harbor y de ahí transferidos a la Universidad de California y en 1948 a Jackson Laboratory donde se ha comercializado la cepa con el nombre de C58/J. Los ratones macho C58/J han mostrado falta de sociabilidad, comunicación deteriorada así como comportamientos repetitivos y estereotipados (Moy et al., 2008; Silverman et al., 2010; Ryan et al., 2010; Blick et al., 2015; Ellegood y Crawley, 2015), características principales del autismo, sin embargo, se desconoce si estas características podrían estar relacionadas con alteraciones neuroanatómicas asociadas al TEA, por lo tanto, el objetivo de este trabajo es conocer si los ratones C58/J presentan alteraciones en la morfología neuronal similares a las que presentan las personas con TEA.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el descubrimiento del autismo data desde el año 1943 aún no se sabe con certeza cuál es la causa de dicho padecimiento debido a su amplio espectro y heterogeneidad. El incremento de personas diagnosticadas con TEA hace necesario dirigir investigaciones enfocadas a conocer los mecanismos celulares que podrían estar involucrados en la génesis del TEA. Aunque diversas alteraciones en la morfología neuronal han sido descritas en los cerebros de personas con TEA, se requieren más estudios que permitan tener una descripción completa de todas las alteraciones morfológicas que podrían estar presentes en los cerebros con TEA, por lo que el uso de modelos animales podría acelerar estas investigaciones. El ratón C58/J presenta una falta de sociabilidad y múltiples conductas estereotipadas, sugiriendo su uso como un modelo animal para el estudio del autismo, sin embargo, no existen trabajos enfocados a conocer las características neuroanatómicas de este ratón y su relación con las conductas presentadas, por lo que en la presente investigación se trató de hacer un estudio de la morfología que presentan las neuronas corticales del ratón C58/J y establecer si estas son similares a las reportadas en el humano.

HIPÓTESIS

H₁. Los ratones C58/J presentarán cambios significativos en la anatomía neuronal en general, así como en la morfología y densidad de las espinas dendríticas de las neuronas de la corteza cerebral con respecto a los ratones control.

H₀. Los ratones C58/J no tendrán cambios en la anatomía de las neuronas, ni en la morfología y densidad de las espinas dendríticas con respecto a ratones control.

OBJETIVO

Objetivo general

Conocer si los ratones C58/J tienen una alteración en la morfología neuronal como la que se observa en cerebros de personas con TEA.

Objetivos específicos

1. Analizar la morfología de las dendritas neuronales en corteza cerebral, de los ratones C58/J.
2. Conocer si existen cambios en la densidad de las espinas dendríticas en los ratones C58/J.
3. Determinar si existen un tipo particular de espinas dendríticas que se encuentra alterado en los ratones C58/J.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Ratones C57BL/6J (n=5) y ratones C58/J (n=5) (The Jackson Laboratory), de cuatro semanas de edad fueron utilizados durante toda la fase experimental (Figura 6). La cepa C57BL/6J fue usada como grupo de comparación debido a la estrecha similitud física y linaje genético similar con el ratón C58/J (Moy et al., 2008). La cepa de ratón C58/J surge a partir del apareamiento de hermanos provenientes de la camada 58 y 52 de sexo masculino. Un acoplamiento del mismo macho pero con una hembra diferente generó la cepa mencionada.



Figura 6. Representación de un ratón C58/J.

Durante todo el proceso experimental los ratones fueron mantenidos a una temperatura de 20 ± 2 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (7:00 am a 7:00 pm), con alimento en pellet y agua *ad libitum*, todo el protocolo se realizó durante la fase de luz. Para la obtención de los cerebros los animales fueron anestesiados profundamente con una inyección de pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.) antes de la eutanasia. El mantenimiento, manipulación y cuidado de los ratones siguió las reglas establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-200-1999. El uso de los animales y el desarrollo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Psicología de la UNAM (FPSI/DIP/CE/07/2015).

Impregnación de Golgi

El marcaje de las espinas dendríticas se realizó con la técnica de Golgi, la cual es un sencillo procedimiento histológico que revela la morfología neuronal completa en dos dimensiones. Este método se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico, producto de la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata (reacción negra) (Melendez-Ferro et al., 2009).

El análisis de las espinas en cerebros de ratones fue realizado a través del ensayo rápido de Golgi-Cox (FD NeuroTechnologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para estos experimentos los cerebros de los ratones C57BL/6J y ratones C58/J no fueron perfundidos. Después de la eutanasia los cerebros fueron removidos rápidamente del cráneo para evitar algún daño del tejido, posteriormente disectados y lavados varias veces con buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4), a temperatura ambiente (Melendez-Ferro et al., 2009) (Figura 7A). Los

cerebros fueron inmersos en una solución de impregnación (A+B), y reemplazada después de 6-12 horas para ser guardados en la oscuridad por 15-16 días. Después de este periodo los cerebros fueron puestos en una solución C que fue reemplazada después de 24 horas y guardadas en la oscuridad por las siguientes 48-60 hrs.

Un microtomo (Ecoshel/335), fue usado para cortar rebanadas coronales de 75 micras (μm) de grosor. Las placas fueron montadas en portaobjetos, oscurecidas, deshidratadas y cubiertas con permount (Figura 7B).

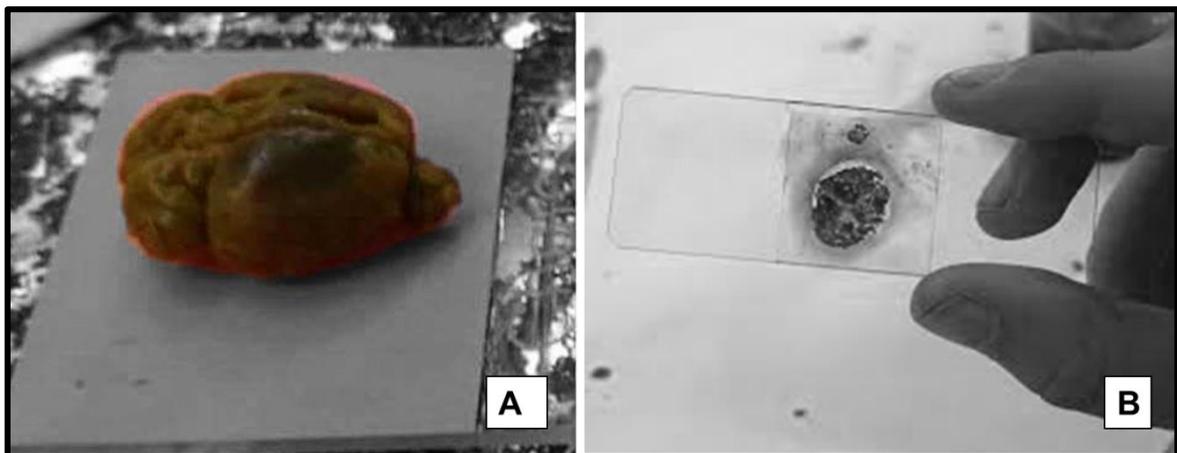


Figura 7. Ejemplo de un cerebro de ratón C58/J impregnado en la solución de Golgi, disecado y lavado (A). Laminillas con muestras de las rebanadas de cerebro procesadas de acuerdo al ensayo rápido de Golgi-Cox (B).

Análisis de la morfología neuronal.

Las características morfológicas de las neuronas y el estudio cuantitativo de la arborización dendrítica se realizó a través de un análisis semiautomatizado de tipo Sholl a doble ciego (Kutzing et al., 2010; Langhammer et al., 2010). Para lo cual se

analizaron al menos 10 neuronas de corteza cerebral de manera aleatorizada por cada ratón. Un total de 50 neuronas por grupo fueron analizadas. Sólo las neuronas que tuvieron una impregnación completa del árbol dendrítico, relativamente aisladas de las neuronas vecinas y que no cruzaron con dendritas de otras neuronas fueron seleccionadas para el análisis. Las neuronas fueron capturadas en diversas imágenes con una cámara digital (Euromex microscopes, Holanda), conectada a un microscopio óptico (US MICROS IV, Holanda), con un objetivo 40x.

Las imágenes fueron capturadas en serie (*Z-stack*), con espacio entre cada sección de 0.5 μm , con un total de 10 imágenes. Todas las imágenes fueron calibradas a 100 μm / 859 píxeles y convertidas a un formato de mapa de 8 bits y procesadas en *Z-stacks* para tener una mejor definición de la morfología neuronal, las imágenes finales fueron guardadas con formato Tiff y posteriormente procesadas secuencialmente en los programas: *ImagenFocus v3.0.*, *ImageJ/fiji* (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2014), *NeuroImageJ* y *NeuroStudio*. Estos programas permitieron tener información acerca de la posición de segmentos de dendritas en un espacio relativo del resto de la célula, realizar un modelado de la arborización neuronal y definir información estructural acerca de la conectividad entre neuritas con el fin de tener una descripción completa del árbol dendrítico y los diferentes tipos de arborizaciones (Figura 8). Un análisis posterior con el programa Bonfire de Matlab permitió conocer el número de dendritas primarias (raíz), secundarias (intermedias) y terciarias (terminales) (Figura 9A, B), número

total de ramificaciones (Figura 9C), número de racimos dendríticos por célula y número de terminales neuríticas o puntos terminales (Figura 9C, D).

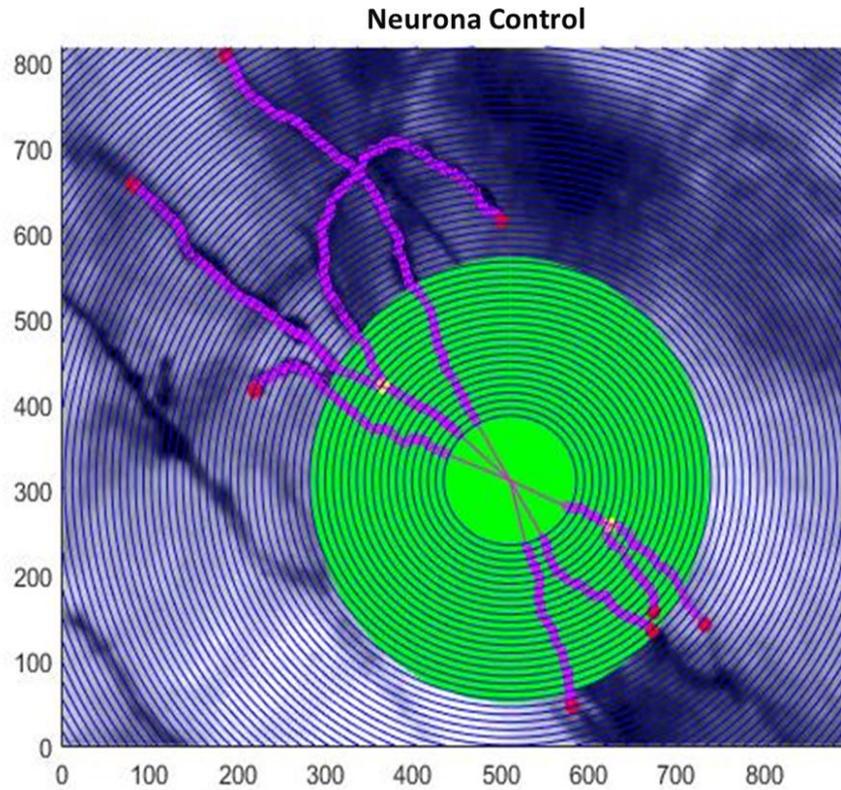


Figura 8. Análisis de Sholl para la morfología neuronal. La imagen muestra los círculos concéntricos generados a partir del soma, cada círculo permite el análisis de los segmentos dendríticos, longitudes e intersecciones de las ramificaciones. La distancia entre cada círculo es de 3 μm .

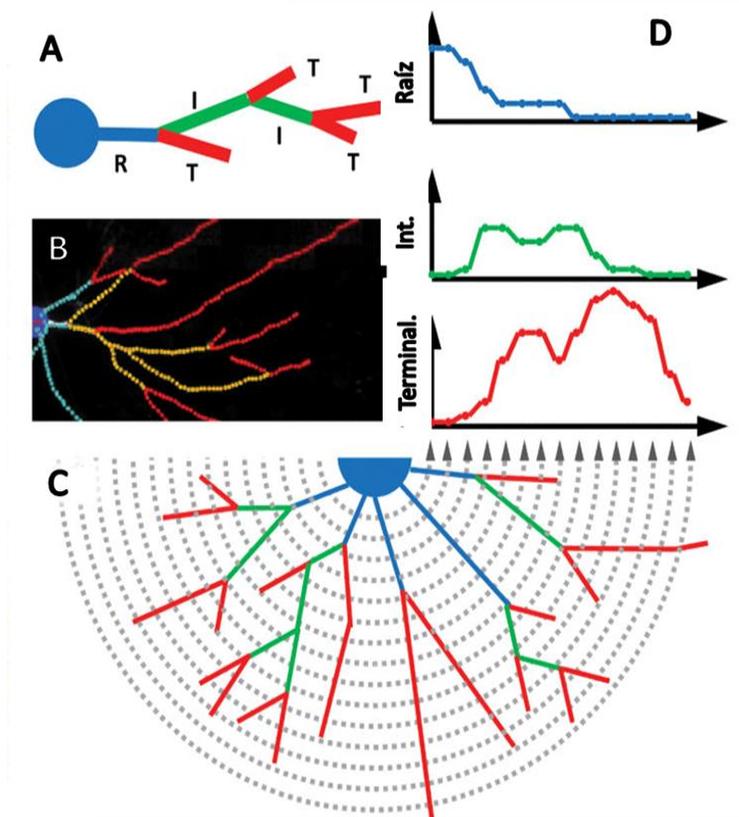


Figura 9. Análisis de la arborización dendrítica. La imagen muestra el resultado del análisis semiautomatizado de Sholl (A). Se aprecian los puntos de ramificaciones dendríticas primarias, secundarias o terciarias asignadas como Raíz (R), Intermedia (I) y Terminal (T) respectivamente obtenidos de la dendrita (B); el número de círculos depende del número de ramificaciones y el largo de la neurona (C). Las gráficas representan el número de ramificaciones que se obtienen en cada una de las intersecciones de los círculos concéntricos y puntos terminales (D). Modificado de Langhammer et al., 2010.

Análisis cuantitativo de las espinas dendríticas

La estimación del número de espinas dendríticas se realizó a través de una observación a doble ciego y método semiautomatizado desarrollado por Orlowski y Bjarkam (2012), tomando en cuenta los siguientes criterios: a) selección de una dendrita lo más recta posible; b) se consideró espina a cualquier protuberancia que emergiera de esa dendrita; c) se seleccionó a la dendrita que presentó espinas con mayor nitidez y d) la cuantificación de las espinas se normalizó en

fragmentos de 50 μm a partir del soma. Las dendritas seleccionadas se tomaron de neuronas de la corteza cerebral de manera aleatorizada. Una vez seleccionadas las dendritas se capturaron imágenes en serie (*Z-stacks*), con un espacio de 0.5 μm entre sección y sección. Posteriormente las imágenes tomadas de cada grupo fueron procesadas con el programa *ImagenFocus v3.0*. y llevadas al programa *ImageJ* para elaborar una imagen digitalizada de la región de interés (ROI, por sus siglas en inglés), con un fragmento de dendrita seleccionado (Figura 10A). Se realizó un conteo manual del número de espinas dendríticas (Figura 10B) y posteriormente un análisis semiautomatizado para corroborar el número de espinas con imágenes previamente binarizadas con el programa *ImageJ* para obtener una imagen blanco y negro sobre la cual generó una “esqueletonización” de la fotografía binaria (Figura 10C). La “esqueletonización” es un método implementado en el programa *ImageJ* basado en la eliminación de algoritmos (Figura 10D) (Orlowski et al., 2012), que remueve los pixeles de los bordes del objeto en una imagen binaria hasta reducirlos a formas de un sólo pixel de ancho (topología del esqueleto), permitiendo identificar las protuberancias reales que emergen de la dendrita. Las imágenes obtenidas fueron corregidas y analizadas en el plugin *AnalyzeSkeleton*. Esta segunda “esqueletonización” permitió descartar irregularidades de la superficie de la dendrita que podrían haber dado una estimación errónea en el número de espinas; y solo consideró las espinas dendríticas reales (Figura 10E).

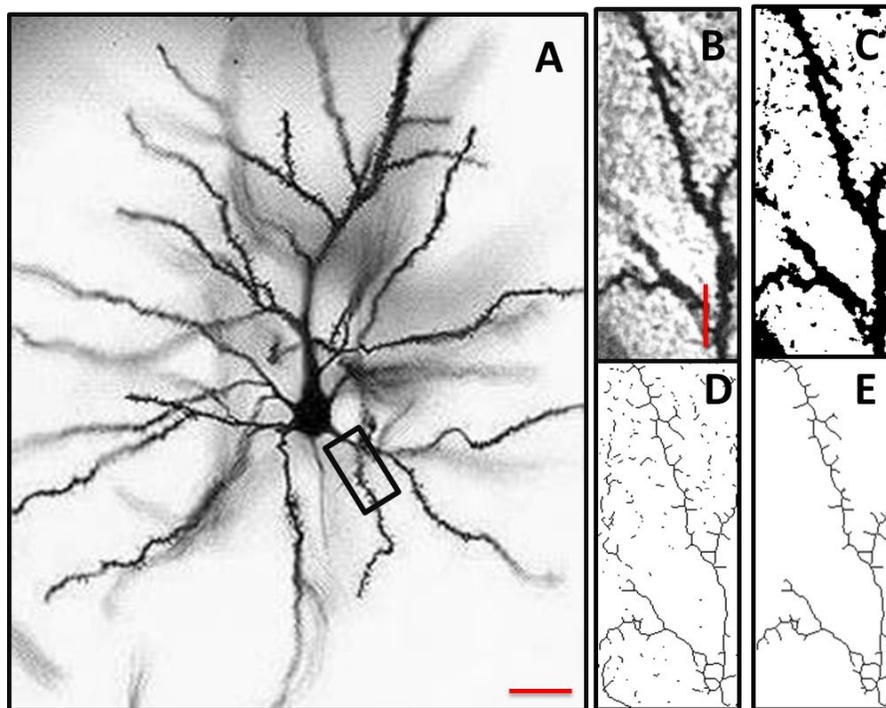


Figura 10. Imagen de neurona que sirve para ejemplificar el método semiautomatizado para la estimación de espinas dendríticas. **A)** Localización de la región de interés, **B)** Fragmento de dendrita analizado, **C)** réplica binaria del fragmento obtenido en B, **D)** esqueleto calculado de la imagen binaria, **E)** ejemplificación de espinas dendríticas finales del esqueleto. Escala de barra = 10 μm .

Clasificación de espinas dendríticas

La clasificación de las espinas dendríticas se realizó a través del método propuesto por Risher et al. (2014), con pequeñas modificaciones. Este método permitió identificar la morfología de las espinas dendríticas en células impregnadas con Golgi convencional. Las imágenes capturadas para la cuantificación de las espinas fueron empleadas para la clasificación de las espinas. Brevemente, la imagen final *Z-stack* procesada en *Z project*, se convirtió a un formato RGB color y se guardó como una secuencia de imágenes.

Posteriormente se empleó el software libre *RECONSTRUCT* (<http://synapses.cim.utexas.edu>), para elaborar un trazado ininterrumpido sobre la dendrita de 10 μm de longitud. Con las espinas dendríticas visualizadas en este segmento, se realizó una medición del diámetro de la cabeza y la longitud del cuello de la espina, la clasificación de las espinas tuvo los siguientes criterios: *filipodia*, longitud de cuello $>2 \mu\text{m}$; *delgada-larga*, longitud de cuello $>1\mu\text{m}$ pero $<2\mu\text{m}$; *delgada*, longitud de cuello $<1\mu\text{m}$; *redondeada*, para una ratio cabeza/cuello $\leq 1\mu\text{m}$ y *hongo*, cabeza con un diámetro $>0.6 \mu\text{m}$ (Figura 11). Un aproximado de 150 espinas dendríticas por grupo se utilizó para el análisis morfológico.

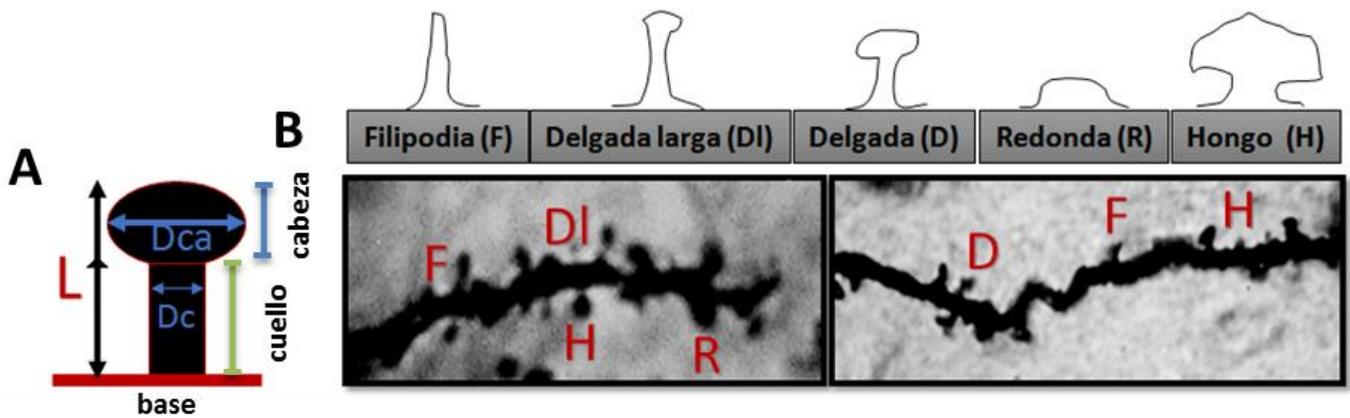


Figura 11. Identificación de espinas dendríticas. **A)** La morfología de las espinas se determina de acuerdo a la longitud del cuello (L), diámetro del cuello (D_c) y diámetro de la cabeza (D_{ca}). **B)** Ejemplo del tipo de espinas encontradas: filipodio (F), hongo (H), redondeada (R), delgada (D) y delgada larga (DI); en un segmento de dendrita, en la parte superior se muestra un esquema de las espinas observadas en las fotomicrografías del panel inferior. Modificado de Villegas, 2016.

Análisis Estadístico

Una prueba de “t” no pareada fue utilizada para todas las comparaciones entre grupos. La normalización de los datos se realizó mediante las pruebas Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Cuando nuestras muestras no cumplieron los criterios de normalidad, se utilizó una U de Mann-Whitney. La comparación entre los tipos de espinas se realizó mediante ANOVA multivariada. Los resultados se expresaron en promedios \pm error estándar, un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado para indicar la significancia estadística.

RESULTADOS

Las neuronas corticales del ratón C58/J presentan alteraciones morfológicas

Los resultados del análisis cualitativo de la impregnación de Golgi en los cerebros de ratones C58/J mostraron una excelente impregnación de los somas, dendritas y espinas dendríticas (Figura 12). Además, se pudo observar que las neuronas corticales mostraron una arborización dendrítica con mayor complejidad con respecto al grupo control. El análisis de Sholl confirmó que las neuronas de los ratones C58/J presentan un mayor número de ramificaciones dendríticas en comparación a los ratones control ($t [98]=-10.85$; $p\leq 0.5$) (Figura 13A), así como un incremento en el número de puntos terminales ($t [98]=-8.95$; $p\leq 0.5$) (Figura 13B). El incremento en el número de ramificaciones se pudo observar en las dendritas primarias, secundarias y terciarias (Figura 13C). Adicionalmente se pudo observar que las dendritas de las neuronas del ratón C58/J presentan una mayor longitud con respecto a los ratones control ($U<.000$; $p\leq 0.5$) (Figura 13D).

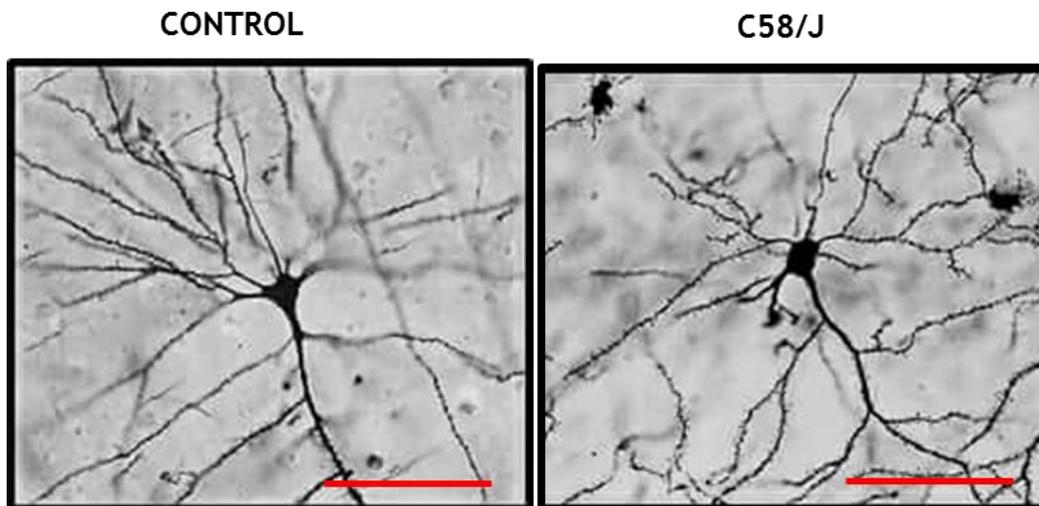


Figura 12. Impregnación de Golgi en neuronas de la corteza cerebral. Se muestra la morfología neuronal de ratones control y ratones C58/J. Escala de la barra = 100 μm .

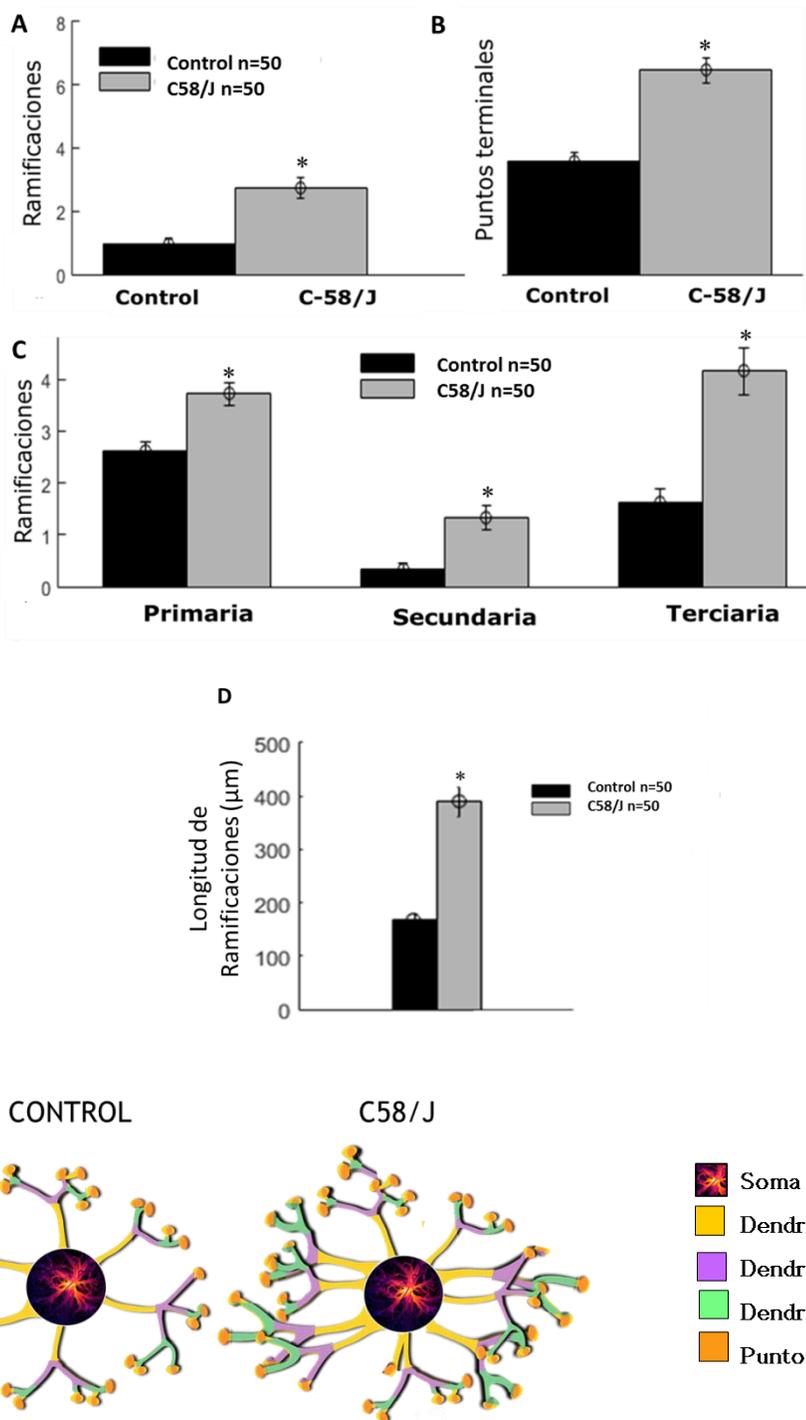


Figura13. Morfología neuronal del ratón C58/J. Un análisis de Sholl fue utilizado para conocer el número de ramificaciones (A), número de puntos terminales (B), tipos de ramificaciones (C) y longitud de ramificaciones (D). El esquema muestra el resumen de los principales cambios observados en la corticales neuronas del ratón C58/J (E). Los datos son expresados como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$.

Estos resultados en su conjunto sugieren que las neuronas corticales del ratón C58/J presentan una arborización dendrítica alterada (Figura 13E).

Con el fin de conocer si el incremento en el número de ramificaciones dendríticas estaba asociado con una mayor complejidad de la arborización se realizó un análisis del número de intersecciones a lo largo de la dendrita (Binley et al., 2014) (Figura 14A).

Los resultados obtenidos de 50 neuronas de 5 ratones diferentes muestran un mayor número de intersecciones en las neuronas corticales del ratón C58/J. De manera interesante se pudo observar que los ratones C58/J tienen una mayor complejidad entre los 15-30 μm de largo, la complejidad disminuye conforme se aleja del soma pero no deja de ser mayor con respecto al grupo control (Figura 14B). Esta complejidad en las neuronas de los ratones C58/J podría ser un indicador de la actividad cerebral.

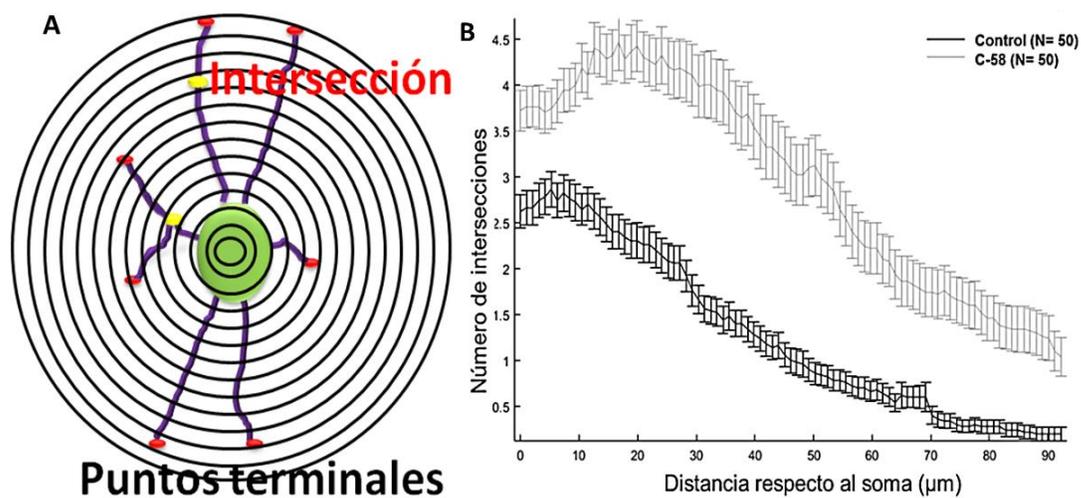


Figura 14. Los ratones C58/J presentan mayor complejidad neuronal. La complejidad fue definida como el número de intersecciones que tiene la dendrita cuando pasa a través del círculo concéntrico a partir del soma (A). Análisis de la complejidad de la neurona a partir del número de intersecciones promedio en ratones control (línea negra) y ratones C58/J (línea gris) (B).

Las neuronas corticales del ratón C58/J muestran un mayor número de espinas dendríticas.

Estudios realizados en corteza cerebral de humano diagnosticados con TEA han demostrado que existe un incremento en la densidad de espinas dendríticas (Hutsler y Zhang, 2009). Con el fin de conocer si además de las alteraciones en la arborización dendrítica los ratones C58/J presentaban alteraciones en el número y tipo de espinas dendríticas se realizó un análisis del número total de espinas dendríticas. El número total de se llevó a cabo tomando 50 segmentos de dendrita de 50 micras cada uno y realizando un conteo de espinas dendríticas por grupo. Nuestros resultados muestran que los ratones C58/J presentan un incremento de 2.5 veces con respecto a las neuronas control (Figura 15). Sugiriendo que los ratones C58/J reproducen una de las características observadas en los cerebros de personas con TEA.

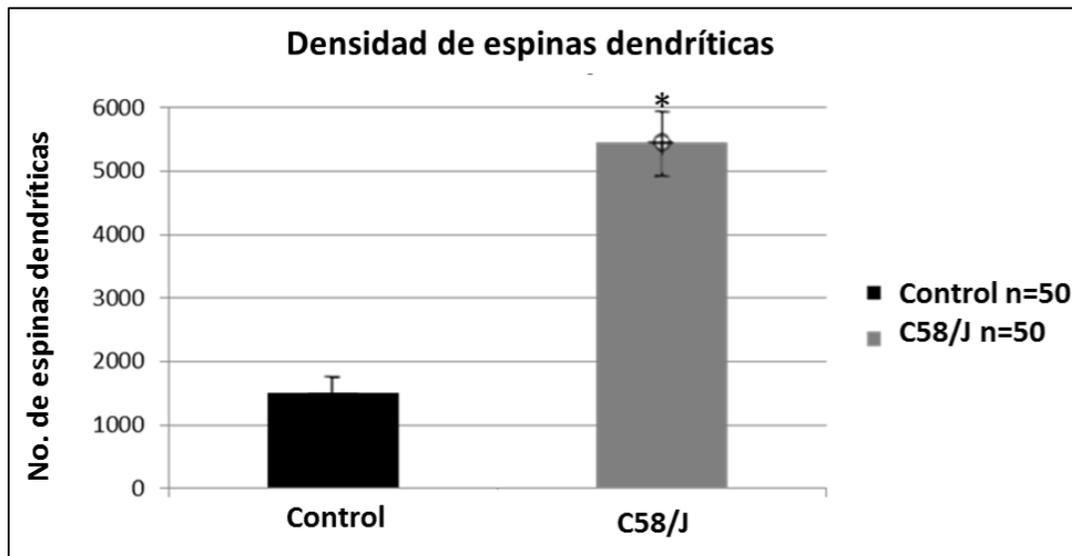


Figura15. Número de espinas dendríticas en neuronas corticales del ratón C58/J. Barras negras representan el grupo control y las barras grises los ratones C58/J. Los valores representan el número total de espinas dendríticas obtenido en segmentos de 50 micras de 50 dendritas. Los datos son expresados como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$.

Morfología de espinas dendríticas en neuronas corticales del ratón C58/J

Con el fin de determinar si en los ratones C58/J prevalecía o se alteraba un tipo particular de espinas dendríticas, se realizó un análisis morfológico a través del método propuesto por Risher et al., (2014), con algunas modificaciones. Para este análisis se seleccionaron segmentos de dendrita de 50 μm de longitud y un aproximado de 150 espinas se eligió por cada grupo. Con las espinas dendríticas visualizadas en este segmento, se realizó una medición del diámetro de la cabeza y la longitud del cuello de la espina, como se describe en la metodología.

Los resultados muestran que los ratones C58/J presentan un incremento significativo en las formas “filipoideas” (33%) y un menor número en espinas de tipo “hongo” (49%). Asimismo, presentan mayor cantidad de espinas de tipo “delgada-larga” (14%) con respecto a los grupos control (3%). Las espinas con forma “redondeada” y “delgada” no tuvieron ningún cambio significativo (Figura 16).

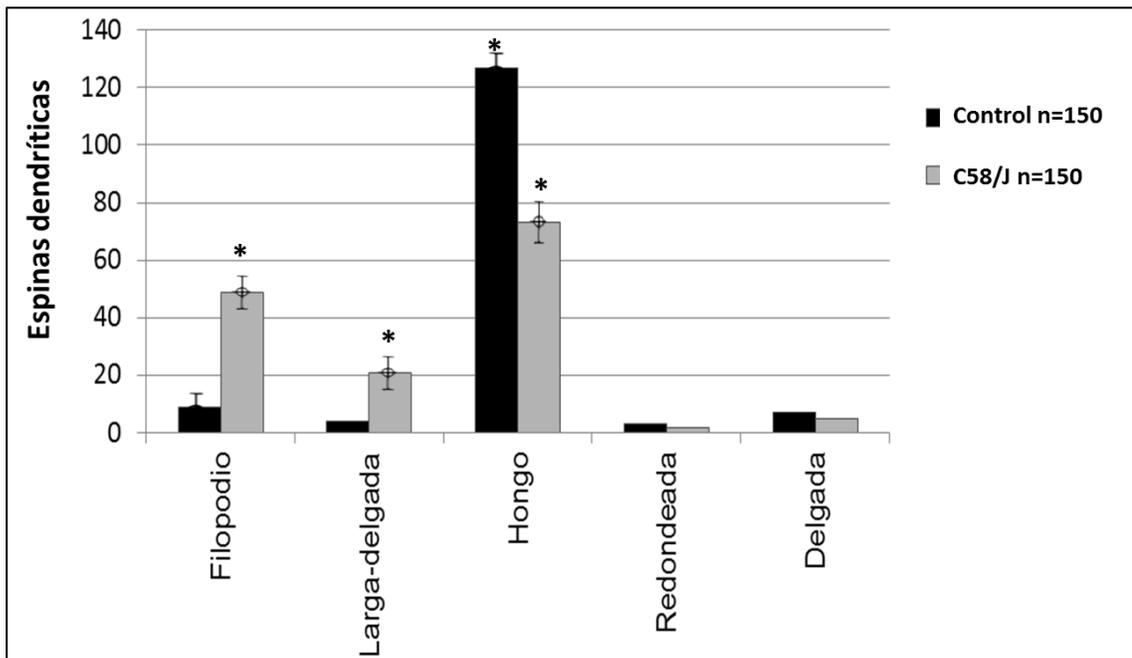


Figura16. Gráfica de los porcentajes de clasificación de espinas dendríticas para grupo control (barras negras) y C58/J (barras grises) (150 espinas= 100%). Ambos grupos de ratones muestran mayor densidad de espinas de tipo ‘hongo’ y menor densidad en las de tipo ‘redondeada’. * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

Diversos estudios han reportado que las personas con TEA pueden presentar alteraciones en el sistema nervioso central que incluyen: una alta densidad neuronal, alteraciones en la conectividad sináptica (Belmonte et al., 2004; Courchesne, 2004; Frith, 2004; Hughes, 2007; Rippon et al., 2007; Palau-Baduell, 2012; Calderoni et al., 2016; O'Reilly, 2017), aumento de la densidad de columnas corticales (Casanova et al., 2002; Courchesne et al., 2011) e incremento en el número de espinas dendríticas (Hutsler y Zhang, 2010; Phillips y Pozo-Miller, 2015; De la Torre-Ubieta, 2016), entre otros. De manera interesante la alteración en las espinas dendríticas también ha sido observada en ratones modificados genéticamente que han sido utilizados para estudiar genes candidatos vinculados al TEA (Silverman et al., 2010; Niesmann et al., 2011; Wang et al., 2011; Peca y Feng, 2012; Schmeisser et al., 2012; Isshiki et al., 2014; Tang et al., 2014; Schuster et al., 2015; Hullinger et al., 2016; Mei et al., 2016; Nomura et al., 2017). En esta tesis se pudo comprobar que las neuronas corticales del ratón C58/J (un modelo sugerido para estudiar el TEA por sus conductas estereotipadas y falta de comunicación social), presenta alteraciones en la morfología neuronal que incluyen: dendritas con mayor longitud y número, una mayor complejidad neuronal y un incremento en el número de espinas dendríticas, estos resultados en su conjunto sugieren que las neuronas corticales del ratón C58/J presentan alteraciones en la arborización dendrítica y sinapsis. Las alteraciones en la morfología dendrítica podrían estar asociadas a problemas en la neurogénesis. La morfogénesis de las dendritas es un proceso complejo pero bien orquestado que incluye la formación de los árboles dendríticos y espinas dendríticas, estructuras

básicas que permiten a las neuronas comunicarse unas con otras. Los árboles dendríticos son estructuras altamente dinámicas, los racimos dendríticos pueden retraerse o extenderse en respuesta a la información recibida y pueden ser estabilizados o mantenidos por la señalización postsináptica, que daría como consecuencia patrones de ramificación, así como el tamaño y geometría del árbol dendrítico (Dailey y Smith, 1996; Cline, 2001; Niell et al., 2004). Los patrones de ramificación y la extensión de los racimos dendríticos se encuentran directamente asociados con el número y distribución de entradas de información que las neuronas pueden recibir y procesar; además, constituyen la base de redes neuronales específicas. Por ejemplo, en neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza prefrontal el incremento de la complejidad de los árboles dendríticos determina el reclutamiento de neuronas en circuitos funcionales (Papoutsi et al., 2017). Las alteraciones en la morfología dendrítica o defectos durante el desarrollo podrían generar cambios en los patrones de arborización dendrítica, fragmentación de las dendritas, retracción o pérdida de los racimos dendríticos y extensión de las ramificaciones dendríticas afectando directamente el desarrollo de los circuitos neuronales (Kulkarni y Firestein, 2012). El incremento en la longitud y número de dendritas y la mayor complejidad neuronal observada en las neuronas corticales del ratón C58/J (Figura 12-14), generaría árboles dendríticos alterados afectando la entrada de la información tanto en neuronas individuales como en circuitos neuronales, la pérdida en el procesamiento de la información tanto interna como externa, podría generar respuestas inadecuadas de funciones especializadas como la falta de sociabilización y comportamientos estereotipados. Por otro lado, es probable que los ratones C58/J tengan alteraciones en proteínas

que regulan la formación de patrones dendríticos específicos para cada tipo de neurona tales como: factores de crecimiento, receptores a efrinas, integrinas, proteínas involucradas en las vías de señalización, proteínas de matriz extracelular y moléculas de adhesión celular (Ledda y Paratcha, 2017). En este sentido estudios a nivel molecular en el TEA han revelado una inhibición del gen MET y su ligando el factor de crecimiento hepatocítico (HGF, por sus siglas en inglés) (Campbell et al., 2007). La vía HGF/MET juega un papel importante en la regulación de la morfología dendrítica durante el desarrollo de la corteza cerebral y promueve el crecimiento neurítico en neuronas talámicas (Powell et al., 2003; Gutierrez et al., 2004). También se ha observado que los pacientes con TEA muestran mutaciones en las neuregulinas 3 y 4 (Tabuchi et al., 2007; Jamain et al., 2003; Hutsler et al., 2010). Las neuregulinas son moléculas de adhesión celular asociadas con el crecimiento de los axones y dendritas (Ichtchenko et al., 1996; Song et al., 1999). Las mutaciones en las neuregulinas podrían tener un papel muy importante en la neuropatogénesis del autismo (Persico y Bourgeron, 2006; Zoghbi, 2003). Estudios en proceso son dirigidos para conocer la expresión de algunas proteínas sinápticas en el cerebro del ratón C58/J.

Los cambios observados en la morfología de la dendrita también podrían estar asociados a cambios en el número y forma de las espinas dendríticas, lo cual podría ser un indicador de alteraciones en la sinapsis. En este sentido, nuestro estudio demostró que las espinas dendríticas en el ratón C58/J presentan un incremento significativo con respecto a los ratones control (Figura 15). Una formación inapropiada de la sinapsis o pérdida de la estabilidad sináptica podría conducir a una afectación de los circuitos neuronales así como de la comunicación

neurona-neurona y eventualmente conducir a alteraciones en la plasticidad neuronal y enfermedades cerebrales. Cambios en la morfología y número de las espinas dendríticas han sido descritas en diversos desórdenes del neurodesarrollo como el síndrome de Down, síndrome de Rett, síndrome de X frágil (Kaufmann y Moser, 2000) y autismo (Hutsler y Zhang, 2010). Sugiriendo que la patología de las espinas dendríticas es un evento común en los desórdenes del neurodesarrollo. El incremento en el número de espinas dendríticas podría ser un mecanismo de respuesta al aumento en la longitud y número de dendritas, como un mecanismo de adaptación para procesar un mayor número de información que se recibiría a través de las dendritas (Kulkary y Finestein, 2012). Sin embargo, un mayor número de sinapsis no es un indicador de mejor funcionalidad. Recientemente se ha demostrado que las entradas excitatorias dependen de la cantidad de las espinas dendríticas y estas a su vez se correlacionan con el tamaño de la densidad postsináptica (Konur et al., 2003). En el autismo existen mutaciones en proteínas involucradas en el mantenimiento de la sinapsis afectando el balance excitador/inhibidor (Südhof et al., 2008), el incremento en el número de espinas y el desbalance entre la excitación e inhibición podría estar asociado al mantenimiento de conducta repetitivas.

Nuestro estudio demostró que además del incremento en el número de espinas dendríticas, el ratón C58/J presenta alteraciones en la morfología de la espina. Particularmente se encontró un incremento significativo de espinas tipo filipoideas y espinas delgada-largas y una disminución en espinas tipo hongo (Figura 16). Las mutaciones en las neuregulinas observadas en pacientes con TEA (Persico y Bourgeron, 2006; Zoghbi, 2003), podrían estar involucradas en ruptura y

desestabilización de estructuras tipo filipoideas, alterando la contracción de los filipodios (Chen et al., 2010). Las espinas tipo 'filipodio' son considerados estados inmaduros de las espinas, el incremento observado en estas espinas podría dar como resultado una inadecuada conexión entre neuronas debido a una pobre comunicación sináptica. Las espinas de tipo delgadas, redondas y en forma de hongo son las espinas más abundantes en las neuronas (González-Burgos, 2008). Las espinas delgadas son consideradas espinas involucradas en el aprendizaje mientras que las espinas en forma de hongo participan en los procesos de memoria (Bourne y Harris, 2007). En nuestro trabajo también se encontró un incremento en las espinas delgada largas y un decremento en las espinas tipo hongo, esto podría sugerir que los ratones C58/J podrían mantener la capacidad de aprender una tarea pero tendrían problemas para recordarla. En este sentido se ha reportado que las personas con TEA muestran problemas en la memoria de trabajo (Schuh et al., 2016) y memoria espacial (Urbain et al., 2015). El desbalance entre las espinas delgadas y las espinas en forma de hongo podría verse reflejado en conexiones disfuncionales y los problemas de memoria mencionados. Estudios en proceso son dirigidos para conocer si el ratón C58/J presenta problemas de memoria y aprendizaje además de tratar de establecer una correlación entre la alteración en la morfología neuronal y las conductas estereotipadas en el ratón C58/J.

CONCLUSIONES

1. Las neuronas corticales del ratón C58/J presentan alteraciones morfológicas que incluyen: incremento en el número de arborizaciones dendríticas y dendritas con mayor longitud y complejidad.
2. En las dendritas del ratón C58/J se observó un número mayor de espinas dendríticas.
3. Las espinas tipo filipodio y delgada-larga tienen una mayor presencia en las dendritas del ratón C58/J.
4. Las espinas tipo hongo tienen una menor presencia en las dendritas del ratón C58/J.
5. Las espinas de tipo delgada y las espinas redondeadas observadas en las dendritas del ratón C58/J no presentan ningún cambio significativo.
6. Estos resultados en su conjunto sugieren que el ratón C58/J reproduce características neuropatológicas asociadas al TEA.
7. Los resultados del presente estudio plantean la necesidad de experimentos para establecer una relación entre las conductas estereotipadas del ratón C58/J y las alteraciones neuronales.

REFERENCIAS

- Barahona-Corrêa, J. B. y Filipe, C. N. (2016). A Concise History of Asperger Syndrome: The Short Reign of a Troublesome Diagnosis. *Frontiers in psychology*, 6 (2024), 1-7.
- Álvarez, V. A. y Sabatini, B. L. (2007). Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annual review of neuroscience*, 30, 79-97.
- American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5). American Psychiatric Publishing. Arlington, VA (USA).
- Arellano, J. I., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J. y Yuste, R. (2007). Ultrastructure of Dendritic Spines: Correlation Between Synaptic and Spine Morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 131–143.
- Artigas-Pallarès, J. y Pérez, I. P. (2012). Autism 70 years after Leo Kanner and Hans Asperger. *Revista de la Asociación Española de Neuropsiquiatría*, 32 (115), 567-587.
- Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M. y Lantos, P. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain*, 121, 889–905.
- Ballesteros-Yáñez, I., Benavides-Piccione, R., Elston, G. N., Yuste, R. y DeFelipe, J. (2006). Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience*, 138 (2), 403-409.
- Barak, B. y Feng, G. (2016). Neurobiology of social behavior abnormalities in Autism and Williams syndrome. *Nature Neuroscience*, 19 (5), 647-655.
- Belmonte, M. K., Allen, G., Beckel-Mitchener, A., Boulanger, L.M., Carper, R.A., Webb, S. J. (2004). Autism and Abnormal Development of Brain Connectivity. *The Journal of Neuroscience*, 24 (42), 9228 –9231.
- Binley, K. E., W. S. Ng, J. R. Tribble, B. Song and J. E. Morgan (2014). Sholl analysis: a quantitative comparison of semi-automated methods. *Journal Neuroscience Methods*, 225, 65-70.

- 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. *Behavioral brain research*, 282, 54-60.
- Bourne, J. y Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381-386.
- Calderoni, S. Narzisi, A., Billeci, L., Brambilla, P., Retico, A. y Muratori, F. (2016). Plasticity in Autism Spectrum Disorders: Focus on MRI-Based Studies. *Frontiers in Neuroscience*, 10 (139), 1-7.
- Campbell, D. B., D'Oronzio, R., Garbett, K., Ebert, P. J., Mirnics, K., Levitt, P. y Persico, A., M. (2007). Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder. *Annals of Neurology*, 62 (3), 243-250.
- Casanova, M. F., Buxhoeveden, D. P., Switala, A. E, Roy, E. (2002). Minicolumnar pathology in autism. *Neurology*, 58, 428–432.
- Chen, S. X., Tari, P. K., She, K. y Haas, K. (2010). Neurexin–neuroligin cell adhesion complexes contribute to synaptotropic dendritogenesis via growth stabilization mechanisms in vivo. *Neuron*, 67 (6), 967–983.
- Cline, H. T. (2001). Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 11 (1), 118–126.
- Courchesne E., DiCicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Dager, S., Schmitz, C., Schultz, R., Crawley, J y Young, L. (2006). The Developmental Neurobiology of Autism Spectrum Disorder. *The Journal of Neuroscience*, 26(26), 6897– 6906.

- Courchesne, E. y Carper, R. A. (2005). Localized enlargement of the frontal cortex in early autism. *Biological psychiatry*, 57 (2), 126-133.
- Courchesne, E., Mouton, P. R., Calhoun, M.E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, MJ, Barnes, C.C., y Karen Pierce, K. (2011). Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *Journal of the American Medical Association*, 306, 2001-2010.
- Courchesne, E., Müller, R. A., Cauch, C., Rubio, M.A. (2004). Abnormal activity patterns in premotor cortex during sequence learning in autistic patients. *Biological Psychiatry*, 56 (5), 323-332.
- Dailey, M. E. y Smith, S. J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience*, 16 (9), 2983–2994.
- De la Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J. L. y Geschwind, D. H. (2016). Advancing the understanding of autism disease mechanism through genetics. *Nature Medicine*, 22 (4), 345–361.
- Delorme, R., Ey, E., Toro, R., Leboyer, M., Gillberg, C. y Bourgeron, T. (2013). Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nature Medicine*, 19 (6), 685–694.
- Dierssen, M. y Ramakers, G. (2006). Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetics to neurobiology. *Genes Brain Behavioral*, 5 (2), 48-60.
- Ecker, Christine (2017). The neuroanatomy of autism spectrum disorder: An overview of structural neuroimaging findings and their translatability to the clinical setting. *Autism*, 21(1), 18-28.
- Ellegood, J. y Crawley, J. N. (2015). Behavioral and Neuroanatomical Phenotypes in Mouse Models of Autism. *Neurotherapeutics*, 12, 521-533.

- Fombonne, E., Marcin, C., Manero, A. C., Bruno, R., Díaz, C., Villalobos, M., Ramsay, K. y Nealy, B. (2016). Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato, Mexico. The Leon survey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(5), 1669-1685.
- Frith, U., Hill, E. y Berthoz, S. (2004). Brief report: cognitive processing of own emotions in individuals with autistic spectrum disorder and in their relatives. *Journal Autism Development Disorders*, 34(2), 229-235.
- González-Burgos, I. (2008). Las espinas dendríticas y la memoria: un largo camino por recorrer. *Ciencia*, 26-35.
- rrez, H., Dolcet, X., Tolcos, M. y Davies, A. (2004). HGF regulates the development of cortical pyramidal dendrites. *Development*, 131 (15), 3717–3726.
- Harris, J. C. (2016). The origin and natural history of autism spectrum disorders. *Nature Neuroscience*, 11(19), 1390-1391.
- Hering, H. y Sheng, M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 12, 880-888.
- Herms, J. y Dorostkar, M. M. (2016). Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Annual review of pathology*, 23 (11), 221-250.
- Hill, A. P. Zuckerman, K. y Fombonne, E. (2016). Epidemiology of Autism Spectrum Disorder. In *Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder*, 2, 13-22.
- Hotulainen, P. y Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of Cell Biology*, 189(4), 619–629.
- Hughes, J. R. (2007). Autism: the first firm finding = underconnectivity? *Epilepsy and Behavior*, 11 (1), 20-24.
- Hullinger, R., Li, M., Wang, J., Peng, Y., Dowell, J. A., Bomba-Warczak, E., Mitchell, H. A., Burger, C., Chapman, E. R., Denu, J. M., Li. L. y Puglielli, L. (2016). Increased expression of AT-1/SLC33A1 causes an autistic-like phenotype in mice by affecting

dendritic branching and spine formation. *The Journal of experimental medicine*, 213 (7), 1267–1284.

- Hutsler, J. J. y Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, 1309, 83-94.
- Ichtchenko, K., Nguyen, T. y Sudhof, T. C. (1996). Structures, alternative splicing, and Neurexin Binding of Multiple Neuroligins. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 2676–2682.
- Isshiki, M., Tanaka, S., Kuriu, T., Tabuchi, K., Takumi, T., y Okabe, S. (2014). Enhanced synapse remodelling as a common phenotype in mouse models of autism. *Nature Communications*, 5 (4742), 1-15.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C. y Bourgeron, T. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, 34 (1), 27–29.
- Kano, M. y Hashimoto, K. (2009). Synapse elimination in the central nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 19 (2), 154-161.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Havashi-Takagi, A. y Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33 (3), 121-129.
- Kaufmann, W. E. y Moser, H. M. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral Cortex*, 10, 981-991.
- Kemper, T. L. y Bauman, M. (1998). Neuropathology of infantile autism. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(7), 645-652.
- Konur, S., Rabinowitz, D., Fenstermaker, V. L. y Yuste, R. (2003). Systematic regulation of spine sizes and densities in pyramidal neurons. *Journal of Neurobiology*, 56 (2), 95-112.

- Kulkarni, V. A. y Firestein, B. L. (2012). The dendritic tree and brain disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 50, 10-20.
- Kutzing, M. K., Langhammer, C. G., Luo, V., Lakdawala, H., y Firestein, B. L. (2010). Automated Sholl Analysis of Digitized Neuronal Morphology at Multiple Scales. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (45), 2354.
- Langhammer, C. G., Previtiera, M. L., Sweet, E. S., Sran, S. S., Chen, M., y Firestein, B. L. (2010). Automated Sholl analysis of digitized neuronal morphology at multiple scales: Whole-cell Sholl analysis vs. Sholl analysis of arbor sub-regions. *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(12), 1160–1168.
- Ledda, F. y Paratcha, G. (2017). Mechanism regulating dendritic arbor patterning. *Cellular and Molecular Life Science*. DOI: 10.1007/s00018-017-2588-8.
- Leung, C., y Jia, Z. (2016). Mouse Genetic Models of Human Brain. *Disorders. Frontiers in Genetics*, 7 (40), 1-20.
- Lew, C. H., Brown, C., Bellugi, U. y Semendeferi, K. (2017), Neuron density is decreased in the prefrontal cortex in Williams syndrome. *Autism Research*, 10, 99–112.
- Martínez-Cerdeño, V. (2017), Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Developmental Neurobiology*, 77, 393-404.
- Mei, Y., Monteiro, P., Zhou, Y., Kim, J., Gao, X., Fu, Z. y Feng, G. (2016). Adult restoration of Shank3 expression rescues selective autistic-like phenotypes. *Nature*, 530 (7591), 481-484.
- Melendez-Ferro, M., Perez-Costas, E., y Roberts, R. C. (2009). A new use for long-term frozen brain tissue: Golgi impregnation. *Journal of Neuroscience Methods*, 176 (2), 72–77.
- Mohammad-Rezazadeh, I., Frohlich, J., Loo S. K. y Jeste, S. S. (2016). Brain connectivity in autism spectrum disorder. *Current Opinion in Neurology*, 29 (2), 137-147.

- Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Nonneman, R. J., Segall, S. K., Andrade, G. M., Crawley, J. N. y Magnuson, T. R. (2008). Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. *Behavioral Brain Research*, 191(1), 118-129.
- Niell, C. M., Meyer, M. P. y Smith, S. J. (2004). In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nature Neuroscience*, 7 (3), 254–260.
- Niesmann, K., Breuer, D., Brockhaus, J., Born, G., Wolff, I., Reissner, C. y Missler, M. (2011). Dendritic spine formation and synaptic function require neurobeachin. *Nature Communications*, 2 (557), 1-10.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L. y Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology*, 64, 313-353.
- Nomura, J., Kannan, G. y Takumi, T. (2017), Rodent models of Genetic and Chromosomal Variations in Psychiatric disorders. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 1440-1819.
- O'Reilly, C., Lewis, J. D. y Elsabbagh, M. (2017). Is functional brain connectivity atypical in autism. A systematic review of EEG and MED studies. *PLOS ONE*, 12(5).
- Orłowski, D. y Bjarkam, C. R. (2012). A simple reproducible and time saving method of semi-automatic dendrite spine density estimation compared to manual spine counting. *Journal of neuroscience methods*, 208 (2), 128-133.
- Palau-Baduell, M; Salvadó-Salvadó, B.; Clófent-Torrentó, M.; Valls-Santasusana, A. (2012). Autismo y conectividad neural. *Revista de Neurología*, 54 (1), S31-S39.
- Papoutsis, A., Kastellakis, G., y Poirazi D. (2017). Basal tree complexity shapes functional pathways in the prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*. Jul. 12: jn00099.2017.
- Peça, J., y Feng, G. (2012). Cellular and synaptic network defects in autism. *Current Opinion in Neurobiology*, 22 (5), 866–872.

- Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J. E. y Woolfrey, K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 14 (3), 285-293.
- Persico, A. M. y Bourgeron, T. (2006). Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends in Neuroscience*, 29 (7), 349–358.
- Phillips, M. y Pozzo-Miller, L. (2015). Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neuroscience Letters*, 601, 30–40.
- Powell, E. M., Muhlfriedel, S., Bolz, J. y Levitt, P. (2003). Differential regulation of thalamic and cortical axonal growth by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Developmental Neuroscience*, 25, 197–206.
- Purpura D. P. (1974). Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science*, 186 (4169), 1126-1128.
- Rippon, G., Brock, J. Brown, C. y Boucher, J. (2007). Disordered connectivity in the autistic brain: challenges for the "new psychophysiology". *International Journal of Psychophysiology*, 63 (2), 164-172.
- Risher, W. C., Ustunkaya, T., Singh Alvarado, J., y Eroglu, C. (2014). Rapid Golgi Analysis Method for Efficient and Unbiased Classification of Dendritic Spines. *PLoS ONE*, 9 (9), e107591.
- Ritvo, E. R., Scheibel, A. B., Duong, T., Freeman, B. J., Robinson, H., Guthrie, D. y Ritvo, A. (1986). Lower Purkinje cell counts in the cerebella of four autistic subjects: initial findings of the UCLA-NSAC Autopsy Research Report. *American Psychiatric Association*, 143 (7), 862-866.
- Ryan, B. C. (2010). Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain. *Behavioral Brain Research*, 208 (1), 178-188.

- Schmeisser, M. J., Ey, E., Wegener, S., Bockmann, J., Stempel, A. V., Kuebler, A., Janssen, A. L., Udvardi, P. T., Shiban, E., Spilker, C., Balschun, D., Skryabin, B. V., Dieck St, Smalla K. H., Montag, D., Leblond, C. S., Faure, P., Torquet, N., Le Sourd, A. M., Toro, R., Grabrucker, A. M., Shoichet, S. A., Schmitz, D., Kreutz, M. R., Bourgeron, T., Gundelfinger, E. D. y Boeckers, T. M. (2012) Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature*, 486 (7402), 256-260.
- Schuh, J. M., Eigsti I. M. y Mirman D. (2016). Discourse comprehension in autism spectrum disorders: Effects of working memory load and common ground. *Autism Research*. 9 (12), 1340-1352.
- Schuster, S., Rivalan, M., Strauss, U., Stoenica, L., Trimbuch, T., Rademacher, N., Parthasarathy, S., Lajkó, D., Rosenmund, C., Shoichet, S., A., Winter, Y., Tarabykin, V. y Rosário, M. (2015). NOMA-GAP/*ARHGAP33* regulates synapse development and autistic-like behavior in the mouse. *Molecular Psychiatry*, 20, 1120–1131.
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., y Crawley, J. N. (2010). Behavioral phenotyping assays for mouse models of autism. *Neuroscience*, 11(7), 490–502.
- Song, J. Y., Ichtchenko, K., Südhof, T. C., y Brose, N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (3), 1100–1105.
- Soria, F. C. y Pérez, V. M. (2012). Actin-binding proteins and signalling pathways associated with the formation and maintenance of dendritic spines. *Neurología*, 27 (7), 421-431.
- Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and Neurexins Link Synaptic Function to Cognitive Disease. *Nature*, 455 (7215), 903–911.

- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M. R., Hammer, R. E., Liu, X., Powell, C. M. y Sudhof, T. C. (2007). A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science*, 318 (5847), 71–76.
- Tang, G., Gudsruk, K., Kuo, S-H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A. y Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*, 83 (5), 1131–1143.
- The Jackson Laboratory (2013). C58/J inbred mice develop leukemia at one year of age, and are susceptible to diet-induced atherosclerotic aortic lesions. They may also be useful in inflammation and immunology studies due to their lack of IL-3R. *MOUSE STRAIN DATASHEET – 000669*. Recuperado de <https://www.jax.org/strain/000669>.
- Tønnesen, J. y Nägerl, U. V. (2016), Dendritic Spines as Tunable Regulators of Synaptic Signals, *Frontiers in Psychiatry*, 7 (101), 1-10.
- Urbain, C. M., Pang, E. W., y Taylor, M. J. (2015). Atypical spatiotemporal signatures of working memory brain processes in autism. *Translational Psychiatry*, 5:e617.
- Vandamme T. F. (2015). Rodent models for human diseases. *European Journal of Pharmacology*, 759, 84–89.
- Villegas Piña, J. A. (2016). La función de la trombospondina-1 (TSP-1) en la plasticidad neuronal (tesis de Maestría) Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. De México.
- Wang, S., Chen, M., Li, Y., Shao, Y., Zhang, Y., Du, S., y Wu, J. (2016). Morphological analysis of dendrites and spines by hybridization of ridge detection with twin support vector machine. *PeerJ*, 4,
- Wang, X., McCoy, P. A., Rodriguez, R. M., Pan, Y., Je, H. S., Roberts, A. C., Kim, C. J., Berrios, J., Colvin, J. S., Bousquet-Moore, D., Lorenzo, I., Wu, G., Weinberg, R. J., Ehlers, M. D., Philpot, B. D., Beaudet, A. L., Wetsel, W. C. y Jiang, Y. (2011). Synaptic

dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of *Shank3*. *Human Molecular Genetics*, 20 (15), 3093–3108.

- Wefelmeyer, W., Puhl, C. J. y Burrone, J. (2016). Homeostatic plasticity of subcellular neuronal structures: from inputs to outputs. *Trends in Neuroscience*, 39 (10): 656-667.

- Yang, G., Pan, F. y Gan, W-B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 462 (7275), 920–924.

- Zhang, C., Milunsky, J. M., Newton, S., Ko, J., Zhao, G., Maher, T. A., Tager Flusberg, H., Bolliger, M. F., Carter, A. S., Boucard, A. A., Powell, C .M. y Sudhof, T. C. (2009). A neuroligin-4 missense mutation associated with autism impairs neuroligin-4 folding and endoplasmic reticulum export. *The Journal of the Society for Neuroscience*, 29 (35), 10843–10854.

- Zikopoulos, B., y Barbas, H. (2010). Changes in prefrontal axons may disrupt the network in autism. *The Journal of Neuroscience*, 30 (44), 14595–14609.

- Zoghbi, H. Y. (2003). Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science*, 302 (5646), 826–830.

- Zoghbi, H. Y. y Bear, M. F. (2012). Synaptic Dysfunction in Neurodevelopmental Disorders Associated with Autism and Intellectual Disabilities. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4 (3), 1-22.