



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DEL FACTOR
NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO Y SU
RELACIÓN CON EL NÚMERO DE ESPINAS
DENDRÍTICAS EN LA REGIÓN CA1 DEL
HIPOCAMPO EN UN MODELO MURINO CON
FENOTIPO AUTISTA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

EMELY MAQUEDA MARTÍNEZ



Ciudad de México

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Elena Zambrano González

Vocal: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Secretario: Dra. Aliesha Araceli González Arenas

1° Suplente: Dr. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña

2° Suplente: Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Instituto de Investigaciones Biomédicas

ASESOR DEL TEMA

Dra. Aliesha Araceli González Arenas

SUPERVISOR TÉCNICO

cDra. Isabel Cristina Barón Mendoza

SUSTENTANTE

Emely Maqueda Martínez

Agradecimientos

El presente escrito no habría sido posible sin todas las personas que conforman a la Universidad Nacional Autónoma de México, permitiendo una educación de excelencia. Gracias.

Particularmente, agradezco a los profesores quienes me alentaron a escribir una tesis, a la Dra. Aliesha González por darme la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación más alegre de la comunidad científica, así como a la Dra. Elena Zambrano, la Dra. Marisol de la Fuente y al Dr. Ignacio Camacho por enriquecer mi trabajo teórico-práctico e indiscutiblemente a la cDra. Isabel Barón, mi mentora en todo el proceso, este trabajo es nuestro.

"Science and everyday life cannot and should not be separated. Science, for me, gives a partial explanation of life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment."

Rosalind Franklin

Índice

Lista de Abreviaturas	III
Lista de Figuras	IV
Resumen	V
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1. Trastorno del Espectro Autista	2
2.1.1. Definición	2
2.1.2. Diagnóstico	3
2.1.3. Epidemiología	4
2.1.4. Etiología	5
2.1.4.1. Factores de Riesgo	5
2.1.4.2. Genética	6
2.1.5. Anormalidades Neurobiológicas	6
2.2. Cambios en la Plasticidad Neuronal Asociados al TEA	8
2.2.1. Definición de Plasticidad Neuronal	8
2.2.2. Cambios en la Plasticidad Estructural	9
2.2.3. Espinas Dendríticas	10
2.3. Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro	12
2.3.1. Síntesis y Función Biológica	12
2.3.2. Implicaciones en el TEA	14
2.4. Hipocampo	14
2.4.1. Neuroanatomía	14
2.4.2. Función, Circuitos y su Relación con el TEA	16
2.5. Modelos Murinos para el Estudio del TEA	17
2.5.1. Cepas	17
2.5.2. Cepa C58/J	18

3. Planteamiento del Problema	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
6. Procedimiento Experimental	20
6.1. Reactivos	20
6.2. Animales	21
6.3. Tinción de Golgi-Cox y Preparación de la Muestra	21
6.4. Conteo de Espinas Dendríticas	22
6.5. Evaluación del Contenido Proteico	23
6.6. Procesamiento de Datos	24
7. Resultados	25
7.1. Contenido de BDNF	25
7.2. Densidad de Espinas Dendríticas	26
7.3. Espinas Dendríticas y BDNF	28
8. Discusión	29
9. Conclusión	32
10. Perspectivas	32
11. Referencias	33

Lista de Abreviaturas

A	Cepa con fenotipo autista
APA	Asociación americana de psiquiatría (American Psychiatric Association)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor)
CICUAL	Comisión institucional de uso de animales de laboratorio
CNV	Variaciones en el número de copias (Copy Number Variations)
DSM	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales
KD	Knockdown
KO	Knockout
LTD	Depresión a largo plazo (Long Time Depression)
LTP	Potenciación de largo plazo (Long Time Potentiation)
WHO	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
TEA	Trastorno del espectro autista
WT	Cepa neurotípica

Lista de Figuras

Figura 1. Distribución de genes asociados al TEA involucrados en el neurodesarrollo.

Figura 2. Características geométricas de las espinas dendríticas.

Figura 3. Mecanismo de acción de BDNF.

Figura 4. Anatomía del hipocampo de diferentes especies.

Figura 5. Contenido de BDNF.

Figura 6. Espinas dendríticas teñidas por la técnica de Golgi-Cox.

Figura 7. Densidad de espinas dendríticas.

Figura 8. Relación de BDNF y espinas dendríticas.

Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA) es el término utilizado para describir personas con déficit persistente en la comunicación e interacción social, conductas repetitivas e intereses o actividades restringidas en etapas tempranas del desarrollo. En individuos con TEA, se ha observado que las alteraciones en la plasticidad estructural podrían estar relacionadas con cambios en las espinas dendríticas. A su vez, se ha reportado la participación de BDNF en la edad adulta para el mantenimiento y maduración de éstas.

Al determinar las diferencias en el contenido de BDNF en el hipocampo de la cepa C58/J con fenotipo autista en comparación con la cepa neurotípica C57 BL/6 y su relación con la población de espinas dendríticas de la región CA1 del hipocampo, se observó un menor contenido de la neurotrofina, así como una mayor densidad de espinas dendríticas en dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales hipocampales en la cepa con fenotipo autista, lo cual podrían sugerir que BDNF tiene un efecto en la plasticidad estructural distintiva del TEA.

Introducción

El trastorno del espectro autista (TEA) es un grupo de trastornos del neurodesarrollo cuya prevalencia ha incrementado a nivel global en los últimos años. La Organización Mundial de la Salud y sus asociados reconocen la necesidad de promover el bienestar óptimo para las personas con TEA, por lo cual dentro de sus esfuerzos se fomenta el desarrollo de evidencia para la evaluación y tratamiento del TEA (World Health Organization [WHO], 2019).

Dentro de las anormalidades neurobiológicas que han sido relacionadas con el trastorno, se ha sugerido que una alteración en la formación y maduración de las espinas dendríticas podría estar involucrada con las diferencias en la conectividad neuronal asociadas con el TEA. Por otra parte, se ha reportado que las neurotrofinas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) participan durante la formación y maduración de las espinas dendríticas.

Hoy en día, los modelos animales son ampliamente utilizados para tratar de elucidar los cambios neurobiológicos relacionados con el TEA. Particularmente, la cepa C58/J ha sido utilizada como modelo de estudio por presentar la heterogeneidad característica del trastorno y su caracterización conductual. Por lo tanto, el estudio de esta cepa permite identificar la influencia de BDNF en alteraciones neurobiológicas como los cambios en la densidad de espinas dendríticas.

Antecedentes

Trastorno del Espectro Autista

Definición

El manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales en su 5° edición (DSM-V) define a los trastornos del neurodesarrollo como un grupo de afecciones que se manifiestan en etapas tempranas del desarrollo, generalmente antes de la etapa escolar, los cuales se caracterizan por deficiencias del funcionamiento personal, social, académico y ocupacional (American Psychiatric Association [APA], 2013). Dentro de este grupo de trastornos se encuentra el trastorno del espectro autista (TEA).

En 1911, el psiquiatra alemán Eugen Bleuler acuñó el concepto autismo para describir un síntoma de los casos más severos de esquizofrenia. De acuerdo con Bleuler, el “pensamiento autista” se caracterizaba por deseos infantiles de evitar realidades insatisfactorias y el reemplazo de éstas por fantasías o alucinaciones (Evans, 2013). Posteriormente el término fue redefinido por la necesidad de describir nuevos modelos del desarrollo infantil, siendo explicado por Kanner y Asperger en 1943-1944 y aceptado para diagnóstico hasta 1980 (Jumah et al., 2016).

La definición y el diagnóstico del autismo se ha ampliado a través de los años con la finalidad de incluir las diversas condiciones presentes en el trastorno. Actualmente el término “trastorno del espectro autista” es utilizado para englobar los diferentes niveles de severidad y características diagnósticas de lo que anteriormente fue considerado autismo (Faras et al., 2010).

Diagnóstico

El DSM-V de la Asociación Americana de Psiquiatría (APA, 2013) es la referencia estándar para el diagnóstico de afecciones mentales y conductuales, incluyendo al TEA, cuyos criterios de diagnóstico se enlistan a continuación.

- A) Déficit persistente en la comunicación e interacción social en múltiples contextos.
 - 1. Déficit en la reciprocidad socioemocional.
 - 2. Déficit en comunicación no verbal para interacción social.
 - 3. Déficit en la comprensión, desarrollo y mantenimiento de relaciones.
- B) Conductas, intereses o actividades restringidas y repetitivas.
 - 1. Movimientos motores repetitivos, uso de objetos o habla estereotipada.
 - 2. Insistencia o monotonía, apego inflexible a las rutinas o patrones ritualizados de comportamiento verbal y no verbal.
 - 3. Intereses altamente restringidos, anormales en intensidad o enfoque.
 - 4. Hiper o hiporeacción a entradas sensoriales o interés inusual en aspectos sensoriales del ambiente.
- C) Los síntomas deben presentarse en etapas tempranas del desarrollo.
- D) Los síntomas causan discapacidades sociales, ocupacionales u otras áreas importantes de funcionamiento.
- E) Estas alteraciones no pueden ser explicadas por discapacidad intelectual o retraso en el desarrollo global.

Los criterios relevantes para el diagnóstico son A-B, donde dependiendo del apoyo necesario para realizar actividades diarias se clasifica la severidad de estos síntomas en una escala del 1-3, siendo 1 el menos severo y 3 el más severo, a su vez es necesario evaluar la presencia de discapacidad intelectual y de lenguaje, otros trastornos del neurodesarrollo, catatonia, así como condiciones médicas, genéticas o ambientales asociadas con el trastorno (APA, 2013).

Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud estima que a nivel global 1 de 160 niños es diagnosticado con TEA. La prevalencia del trastorno es independiente de la nación de origen, los rasgos culturales y el nivel socioeconómico; sin embargo presenta una incidencia mayor en el sexo masculino respecto al femenino, en una proporción 4:1 (Elsabbagh et al., 2012; WHO, 2019; Zhang et al., 2020).

De acuerdo con los estudios epidemiológicos de los pasados cincuenta años, la prevalencia del trastorno ha incrementado a nivel mundial. Este cambio podría estar asociado con la ampliación de los criterios diagnósticos, la evolución de las herramientas de diagnóstico y la divulgación del trastorno o bien a factores de riesgo a los que se encuentra expuesta la población en la actualidad, como la contaminación ambiental y disruptores endocrinos, como los pesticidas, los cuales se ha sugerido tienen un papel en el desarrollo del trastorno (Costa et al., 2017; Lord et al., 2020; Moosa et al., 2018; WHO, 2019).

En México sólo existe un estudio epidemiológico en 2016 realizado en una población de 12116 niños nacidos en 2003, quienes asistían a una de las 134 escuelas primarias de educación regular o especial en León, Guanajuato. El grupo de trabajo a partir de un análisis documental y validación diagnóstica estimó una prevalencia del TEA de 0.87% a nivel nacional (Fombonne et al., 2016), es decir 1 de cada 115 personas.

Etiología

El TEA presenta una etiología compleja, heterogénea y multifactorial. Se han descrito distintos factores que podrían desencadenar el riesgo de presentar TEA a través de varios mecanismos, como los genéticos, epigenéticos e inmunológicos, involucrados en la variedad de alteraciones fisiológicas (Lyall et al., 2017; Parellada et al., 2014),

Factores de Riesgo. Existen diversos factores ambientales frecuentemente asociados y validados con el riesgo de TEA, descritos a continuación, los cuales podrían tener un papel importante para el desarrollo de condiciones implicadas en la variabilidad fenotípica del trastorno (Sealey et al., 2016).

La edad avanzada de ambos padres al concebir ha sido relacionada con un mayor riesgo de que la descendencia presente TEA asociado con una discapacidad intelectual (Idring et al., 2014). Así mismo, durante la etapa gestante, se ha sugerido que la exposición a antidepresivos, antiasmáticos y antiepilépticos que atraviesan la placenta y la barrera hematoencefálica es un importante factor de riesgo. Particularmente, el uso de ácido valproico aumenta el riesgo de desarrollar malformaciones congénitas, deficiencias cognitivas y la presencia trastornos neuropsiquiátricos, como el TEA (Croen et al., 2011; Mandy & Lai, 2016; Smith & Brown, 2014).

Por otro lado, se ha propuesto que las infecciones, como la rubeola, el virus de la influenza u otras desregulaciones inmunológicas en la etapa gestante, al activar la respuesta inflamatoria de la madre, promueven la producción de citocinas proinflamatorias que podrían afectar el estado de la placenta o el neurodesarrollo del feto, asociándose así con el TEA. (Meltzer & Van De Water, 2017).

Genética. La contribución genética en la etiología del TEA ha sido evidenciada a partir de estudios de heredabilidad y entre gemelos homocigotos/heterocigotos que presentan el trastorno. Actualmente, existe un aproximado de 1000 genes asociados con el TEA en los cuales se ha identificado diversas mutaciones *de novo*, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y variaciones en el número de copias (CNV) (Gene, 2019; Sandin et al., 2014).

Courchesne et ál. (2019) identificaron 72 genes asociados al TEA, los cuales son reportados frecuentemente en estudios genéticos del trastorno y son considerados potencialmente penetrantes en el TEA, es decir producen un efecto característico en el trastorno. Al analizar su función, se observó que 58 de estos genes están involucrados en al menos uno de los cuatro principales procesos del neurodesarrollo, los cuales se presentan en la figura 1.

Anormalidades Neurobiológicas

A partir de muestras *postmortem* y estudios de imagenología en personas con TEA, se ha identificado un mayor volumen cerebral además de alteraciones en estructuras esenciales para procesos de sociabilidad, toma de decisiones, memoria, aprendizaje y control motor que frecuentemente se presentan alteradas en el TEA (Aylward et al., 2002), como las descritas a continuación.

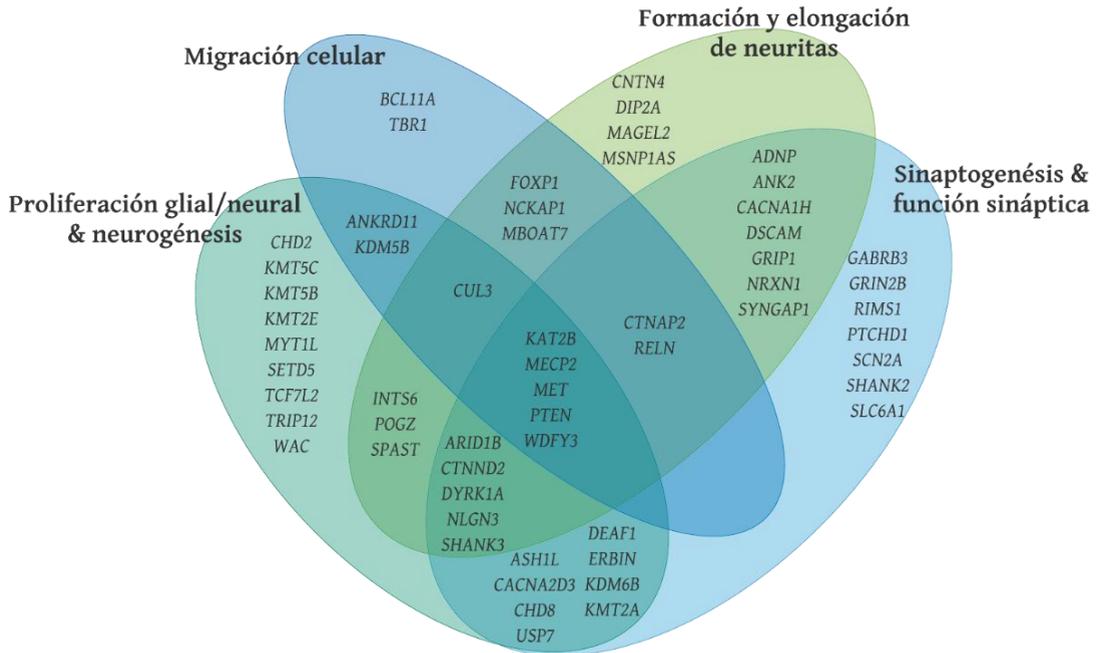


Figura 1. Distribución de genes asociados al TEA involucrados en el neurodesarrollo. La mayoría de los genes son pleiotrópicos y se encuentran involucrados en procesos de proliferación glial/neuronal, neurogénesis, migración celular, formación/elongación de neuritas, sinaptogénesis y función sináptica. Adaptada de “The ASD Living Biology: from cell proliferation to clinical phenotype” por Courchesne et ál. (2019, p. 94).

La corteza prefrontal es una estructura indispensable para el establecimiento de las funciones ejecutivas. Entre los cambios encontrados en esta región en personas con TEA, destacan las variaciones en el área superficial y grosor cortical, así como una pobre diferenciación en el límite entre la materia gris y blanca (Jumah et al., 2016).

El cerebelo está relacionado con alteraciones del control motor en el TEA. En esta estructura se ha observado un aumento en el volumen total, así como una disminución significativa de células de Purkinje (Jumah et al., 2016).

En el hipocampo de personas con TEA diversos estudios han encontrado cambios en el volumen total, lo cual ha sido asociado con alteraciones en la memoria; a su vez, se han identificado variaciones en la forma interna del subículo que correlacionan con déficits intelectuales (Dager et al., 2007; Schumann et al., 2004).

Es importante destacar que tanto las mutaciones asociadas al TEA que influyen en el neurodesarrollo así como los cambios estructurales y de conectividad, podrían estar relacionados con anomalías en la plasticidad cerebral de personas con TEA (Bourgeron, 2015).

Cambios en la Plasticidad Neuronal Asociados al TEA

Definición de Plasticidad Neuronal

Las neuronas del sistema nervioso central convierten un estímulo o impulso entrante en una señal de salida donde la información se codifica como la frecuencia de potenciales de acción que se propagan a través del axón (Beck & Yaari, 2008). La plasticidad es un proceso por el cual las neuronas pueden cambiar sus propiedades a partir de neurogénesis, sinaptogénesis e inactivación o eliminación de neuronas y contactos neuronales como respuesta a la actividad (Castrén & Antila, 2017). Cuando el cambio se da a nivel de la regulación de la fuerza o eficiencia de la transmisión sináptica a partir de fenómenos de potenciación de largo plazo (LTP) o depresión a largo plazo (LTD) en sinapsis preexistentes, es conocido como plasticidad sináptica (De Pittà et al., 2016). Por otra parte, el cambio morfológico de los subcompartimentos neuronales, incluyendo a las espinas dendríticas, el segmento inicial del axón y los botones presinápticos es considerado como plasticidad estructural (Wefelmeyer et al., 2016).

Cambios en la Plasticidad Estructural

Dentro de las anomalías neurobiológicas que han sido relacionadas con el TEA, se ha sugerido que una alteración en la formación y maduración de neuritas, como dendritas y espinas dendríticas, podría estar involucrada con cambios en la conectividad asociados con el trastorno.

En muestras postmortem de personas con TEA se ha observado una menor complejidad del árbol dendrítico de las neuronas piramidales de la región CA1 y CA4 del hipocampo, así como una disminución general en la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales, particularmente en la corteza prefrontal se ha reportado una mayor densidad de espinas dendríticas, respecto a sujetos control, en dendritas apicales de neuronas piramidales de la capa II (Hutsler & Zhang, 2010; Martínez-Cerdeño, 2017; Raymond et al., 1995).

Adicionalmente, estudios de la arborización dendrítica y del estado de las espinas dendríticas en modelos animales de fenotipo autista han sido útiles para relacionar las observaciones previas en humanos. Por ejemplo, en la cepa murina C58/J se han encontrado una disminución en la complejidad dendrítica de neuronas piramidales en la corteza prefrontal e hipocampo (Barón-Mendoza et al., 2019). En el modelo *Cytip*-KO (Proteína 1 que interactúa con FMR1 citoplasmática) se han observado una disminución en la complejidad dendrítica y cambios en la madurez de las espinas en neuronas de la región CA1 del hipocampo (Pathania et al., 2014).

En el modelo del síndrome de X frágil se han encontrado un aumento en la población de espinas dendríticas inmaduras de la capa V de neuronas piramidales (Irwin et al., 2002). Cabe destacar que este síndrome no forma parte del trastorno, pero es frecuentemente co-diagnosticado con TEA, por lo cual la información reportada aporta al estudio del trastorno.

En ratones con expresión aumentada de SHANK, proteína principal en el andamiaje proteico en sinapsis excitatoria, se ha encontrado un aumento en el largo de las espinas dendríticas en la región hipocampal, por su parte, ratones *Shank3-KO* presentan una disminución en la conectividad cortical (Monteiro & Feng, 2017; Sala et al., 2001).

Esta evidencia sugiere que las diferencias tanto en la complejidad del árbol dendrítico, así como en el número y forma de espinas dendríticas podrían estar asociados con las alteraciones neuronales en individuos con TEA e involucradas con el comportamiento tipo autista observado en los animales.

Espinas Dendríticas

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias especializadas en las dendritas de las neuronas donde ocurre la mayor parte de las sinapsis excitatorias en el cerebro. Su compleja estructura consiste en una densa red de filamentos de actina, proteínas transmembranales y de andamiaje, así como receptores de superficie. Las espinas dendríticas tienen la capacidad de reorganizarse rápidamente dependiendo del estímulo, microambiente y localización, destacando así su importancia en la plasticidad sináptica y estructural (Chidambaram et al., 2019; Maiti et al., 2015).

Se ha propuesto que el desarrollo de las espinas dendríticas, conocido como espinogénesis, empieza por la formación de protuberancias, las cuales se elongan como resultado del dinamismo del citoesqueleto y en condiciones óptimas dan lugar a formas más estables (Bakos et al., 2015; Maiti et al., 2015).

Estos cambios morfológicos están directamente relacionados con modificaciones en la función sináptica, por lo que han sido clasificadas a partir de sus características estructurales de acuerdo con las dimensiones de la cabeza y el cuello espinal (Nimchinsky et al., 2002; Risher et al., 2014), dicha clasificación se resume en la figura a continuación.



Figura 2. Características geométricas de las espinas dendríticas.

Ilustración representativa de los tipos de espinas dendríticas que se encuentran comúnmente en las neuronas piramidales y su principal característica de identificación. La madurez de las espinas evoluciona (de izquierda a derecha) desde estructuras largas y delgadas de tipo filopodia hasta espinas de cabeza ancha tipo hongo y ocasionalmente la espina ramificada. Adaptada de “Rapid Golgi Analysis Method for Efficient and Unbiased Classification of Dendritic Spines” por Risher et ál. (2014, p. 2).

Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro

Síntesis y Función Biológica

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) pertenece a la familia de factores de crecimientos polipeptídicos, las neurotrofinas, las cuales se caracterizan por su rol en el neurodesarrollo en procesos como la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte de células neuronales y no neuronales. Particularmente, BDNF participa en múltiples procesos en el sistema nervioso adulto, regulando el establecimiento y mantenimiento de la estructura sináptica, la regulación de la neurotransmisión, la plasticidad, el crecimiento axonal, la morfología y el crecimiento de las dendritas (Chao, 2003; Poo, 2001; Song et al., 2017).

La transcripción del gen *BDNF* es altamente regulada en neuronas glutamatérgicas del sistema nervioso central por la actividad neuronal. BDNF es inicialmente sintetizada en el retículo endoplásmico como proteína precursora, pre-proBDNF. La proneurotrofina es procesada en múltiples sitios como el aparato de Golgi y las proteasas extracelulares, ya que tanto proBDNF como BDNF son secretadas al espacio sináptico por medio de vesículas para unirse a sus respectivos receptores transmembranales (Brigadski & Leßmann, 2014; Sasi et al., 2017; Song et al., 2017).

BDNF forma dímeros por interacciones no covalentes para activar al receptor de tropomiosina cinasa B (TrkB), el cual desencadena cascadas de señalización que contribuyen con el desarrollo y remodelamiento de neuritas, así como con la promoción de la plasticidad sináptica (Kowiański et al., 2018). Las principales vías de señalización están representadas en la figura 3.

Aunado a lo anterior, se ha demostrado experimentalmente que BDNF es un regulador de la expresión de LTP en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, en la capa II/III de la corteza somatosensorial, corteza visual y la amígdala basolateral (De Vincenti et al., 2019; Itami et al., 2003; Meis et al., 2012).

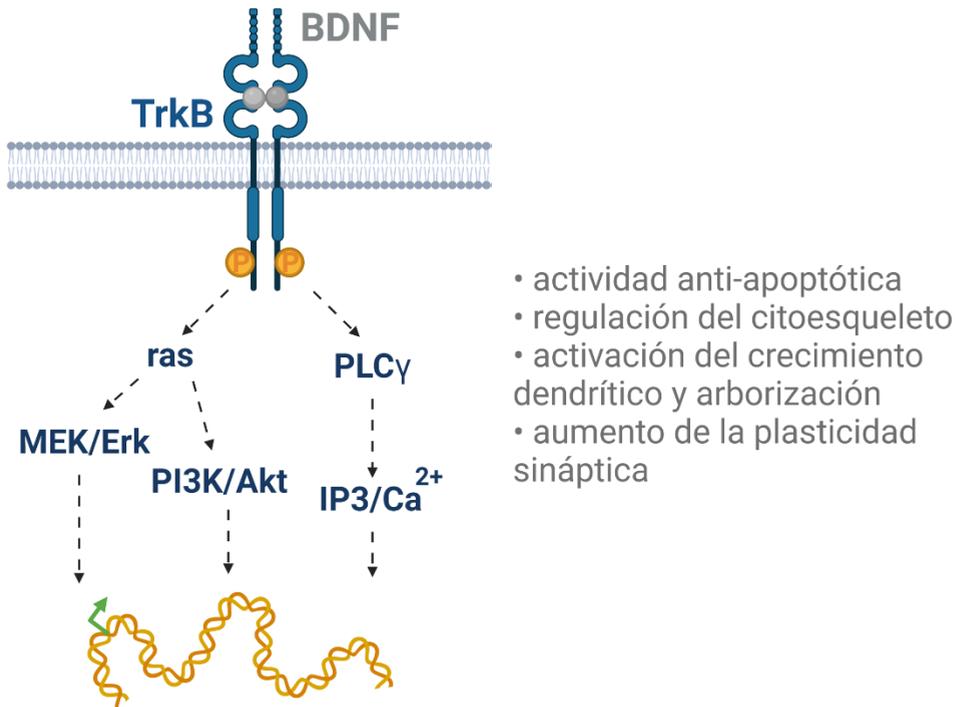


Figura 3. Mecanismo de acción de BDNF. La fosforilación de TrkB por BDNF promueven la activación de vías de señalización como MEK/Erk (proteínas cinasas activadas por mitógenos), PI₃K/Akt (fosfoinositol-3 cinasa/ proteína cinasa B), PLCγ (fosfolipasa C gama) las cuales regulan diversos procesos neuronales e inducen factores de transcripción que regulan la expresión de genes, incluyendo a BDNF. Modificada de “Integral Characterization of Defective BDNF/TrkB Signalling in Neurological and Psychiatric Disorders Leads the Way to New Therapies” por Tejeda & Díaz-Guerra (2017, p.3).

Implicaciones en el TEA

Los cambios en los niveles de BDNF se han asociado a diferentes alteraciones neurológicas, incluyendo el TEA. En niños diagnosticados con TEA y dificultades intelectuales, se ha encontrado una disminución de BDNF en la concentración sérica, además recientemente se reportaron niveles bajos de BDNF sérico en recién nacidos con alto riesgo de presentar el trastorno. Así mismo, una menor expresión de BDNF en niños con TEA se ha correlacionado con una reducción de neurogénesis cortical (Francis et al., 2018; Schmeisser & Boeckers, 2017; Skogstrand et al., 2019).

Por otra parte, en modelos animales de fenotipo autista se ha demostrado que mutaciones y alteraciones en la expresión de BDNF influyen en el comportamiento social y de ansiedad (Moy et al., 2004). Los anteriores hallazgos podrían sugerir un papel relevante de las diferencias en el estado y contenido de la neurotrofina en la etiología del TEA.

Hipocampo

Neuroanatomía

La formación hipocampal es una estructura continua altamente homóloga en todos los mamíferos y se encuentra doblada hacia el interior de la corteza cerebral. Esta región del cerebro incluye la corteza entorrinal, el subículo y el hipocampo propiamente dicho (*cornu ammonis*, CA1-3 y giro dentado), los cuales están relacionados entre sí por distintos circuitos neuronales y son conformados por una arquitectura celular diferente (von Bohlen und Halbach & von Bohlen und Halbach, 2018).

Los principales tipos de células de la formación hipocampal son las neuronas piramidales glutamatérgicas ubicadas en las áreas corticales y las regiones CA y las neuronas granulares ubicadas en el giro dentado e interneuronas hipocampales. Las neuronas piramidales en las regiones CA se encuentran densamente empaquetadas en una sola capa, el *stratum pyramidale*. Las dendritas de estas células que reciben información de otras regiones de la formación hipocampal se encuentran en ambos lados del *stratum oriens* y el *stratum radiatum/lacunosum moleculare* (The Human Protein Atlas, 2020).

La región CA1 es muy susceptible a cambios como el estrés oxidativo, en comparación con la células granulares del giro dentado (Alkadhi, 2019). La región CA2 se conforma por una pequeña población de células en el eje transversal del hipocampo y es una región con mayor resistencia a daños con un alto índice de plasticidad sináptica (Dudek et al., 2016; Tzakis & Holahan, 2019). La región CA3 es la porción más larga y enriquecida de interconexiones hipocampales (Cherubini & Miles, 2015). La porción terminal cercana al giro dentado corresponde a la región CA4 y contiene células polimórficas. La figura 4 ilustra la anatomía del hipocampo de diferentes especies.

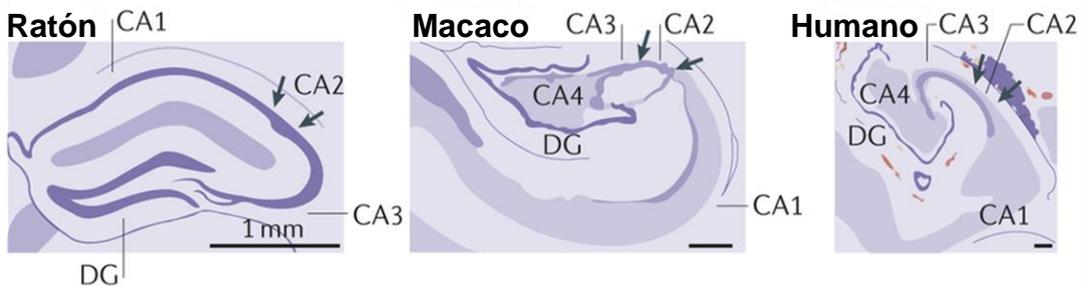


Figura 4. Anatomía del hipocampo de diferentes especies. DG: giro dentado. Adaptada de “Functional organization of the hippocampal longitudinal axis” por Strange et ál. (2014, p. 656).

Función, Circuitos y su Relación con el TEA

El hipocampo es fundamental para formar y almacenar la memoria a largo plazo al consolidar la información de la memoria a corto plazo, además de procesar la información espacial y de navegación (S. Zhong et al., 2020). La información fluye hacia y a través del hipocampo por las siguientes vías:

1. La vía perforante desde la corteza entorrinal a las células granulares del giro dentado.
2. La vía de las fibras musgosas desde las células granulares del giro dentado hasta las células piramidales de la región CA3. Las neuronas piramidales de la región CA3 tienen proyecciones a la región CA1 y recibe señales de la corteza entorrinal y el giro dentado (Cherubini & Miles, 2015).
3. La vía colateral Schaffer desde la región CA3 a CA1. Las neuronas piramidales de la región CA2 reciben señales de neuronas en la capa II-III de la corteza entorrinal media y proyectan eferencias, en la región CA1. Las neuronas piramidales de la región CA1 reciben información glutamatérgica principalmente de la región CA3 y la amígdala, además de estímulos GABAérgicos locales de interneuronas. La región dendrítica apical está innervada principalmente por entradas glutamatérgicas de la corteza entorrinal y el tálamo (Klausberger & Somogyi, 2008; Tzakis & Holahan, 2019).

Las conexiones del hipocampo se resumen en aferencias de los núcleos septales, el giro dentado y subículo, el giro parahipocampal, el hipotálamo, el tálamo, la amígdala y eferencias hacia los núcleos septales, la parte anterior del hipotálamo, los cuerpos mamilares, el núcleo anterior del tálamo y el tegmento del mesencéfalo (Patestas & Gartner, 2016).

Debido a los cambios estructurales antes descritos en el hipocampo de personas con TEA y su relevancia en procesos de memoria y aprendizaje, esta estructura podría ser considerada clave en el estudio del trastorno, pues las alteraciones en su funcionalidad y plasticidad podrían estar asociadas con la conectividad atípica de los circuitos cerebrales presentes de estas personas.

Modelos Murinos para el Estudio del TEA

Cepas

Los modelos animales son esenciales para entender los procesos biológicos asociados al TEA, así como para el establecimiento de estrategias terapéuticas. Las cepas validadas para el estudio del TEA se agrupan en modelos genéticos, inducidos y endógamos.

Los modelos genéticos incluyen mutaciones, variaciones en el número de copias de genes asociados directamente con el TEA y genes implicados en síndromes comórbidos. Entre los modelos genéticos destacan *Mecp2*-KD en el cromosoma X que ocasiona el síndrome de Rett; la duplicación del cromosoma 17p11.2 asociado al síndrome de Potocki-Lupski y *Shank3*-KO, los cuales conservan el comportamiento conductual tipo autista y permiten estudiar el impacto de estos cambios genéticos en el trastorno (Bey & Jiang, 2014).

Los modelos no genéticos incluyen los inducidos y endógamos. Los modelos inducidos consisten en manipulaciones ambientales (químicas o biológicas) para desarrollar el fenotipo autista, entre los cuales destaca la inducción por ácido valproico durante la etapa gestante (Wagner et al., 2006). Estos modelos permiten realizar estudios de aquellos factores no genéticos asociados al TEA.

Las cepas BTBR, BALB/cByJ y C58/J son endógamas y son consideradas como modelos para el estudio del TEA debido a su caracterización conductual, que incluyen déficit en memoria, aprendizaje y sociabilidad, además de alteraciones motoras, ansiedad e hiperactividad (Moy et al., 2007, 2014)

Cepa C58/J

La cepa C58 tiene origen en 1921 por MacDowell a partir de la endogamia consecutiva de 20 generaciones de la cepa C57BL y se caracteriza por conservar mutaciones en el receptor de interleucina 3, cadherina 23 y el receptor de aril-hidrocarburos (Maze Engineers, 2018).

La reproducción de la cepa se da mediante la cruce de hembras y machos C58/J, donde se ha observado un bajo rendimiento reproductivo con camadas promedio de 6 ratones, a su vez se ha reportado una disminución en el aumento de peso de las crías a causa del comportamiento materno, donde se ha observado tasas menores para acurrucarse y lactar (Festing, 1998; Hadsell et al., 2012; Ryan et al., 2010).

Su perfil de comportamiento refleja características conductuales asociadas con el TEA, como déficit en la interacción social y la presencia de movimientos estereotipados y repetitivos. Además, se ha reportado que su conducta inusual es independiente del sexo y se presenta desde el nacimiento, la cual incluye ansiedad incrementada, bajo reconocimiento social, hiperactividad motora en forma de saltos verticales, acicalamiento repetitivo y “backflipping” (Moy et al., 2014; Ryan et al., 2010).

Planteamiento del Problema

Se ha reportado que BDNF participa activamente en la edad adulta para el mantenimiento y maduración de las espinas dendríticas. En individuos con TEA, se ha observado que las alteraciones en la plasticidad estructural podrían estar relacionadas con cambios en las espinas dendríticas.

A su vez, alteraciones en la conectividad del hipocampo están relacionadas con cambios en la memoria y aprendizaje identificados en el trastorno.

Hipótesis

La cepa C58/J con fenotipo autista presentará una disminución en el contenido de la neurotrofina BDNF impactando en la densidad de espinas dendríticas de la región CA1 del hipocampo en comparación con la cepa C57 BL/6.

Objetivos

Objetivo General

Determinar si existe diferencia en el contenido de BDNF en el hipocampo de la cepa C58/J con fenotipo autista en comparación con la cepa neurotípica C57 BL/6 y su relación con la densidad de espinas dendríticas de la región CA1 del hipocampo.

Objetivos Particulares

- Evaluar el contenido de BDNF en el hipocampo.
- Determinar la densidad de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo.
- Analizar la relación de BDNF y la densidad de espinas dendríticas.

Procedimiento Experimental

Reactivos

- Amortiguador de Laemmli: Tris base 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, azul de bromofenol, Glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, Amortiguador Tris (TBS): Tris base 0.05 M, NaCl 0.15 M.
- Amortiguador de lisis RIPA: 50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 1% Tritón, 0.1% SDS, inhibidor de proteasas SIGMAFAST.
- FD Rapid GolgiStain Kit: FD NeuroTechnologies, Inc.
- Forezen Section Compound (FSC 22): Surgipath Medical Industries.
- Glicina ácida: glicina pH 2.5, SDS 10%.
- Sustrato comercial de quimioluminiscencia (ECL): Pierce ECL Western Blotting Substrate.
- Resina Cytoseal 60: Thermo Fisher Scientific.
- Solución de bloqueo: 2% albúmina sérica bovina.
- Tris (TBS): Tris base 0.05 M, NaCl 0.15 M.

Anticuerpos

- Anti-IgG de ratón, acoplado a peroxidasa: AP127P. Millipore
- Anti-IgG de conejo, acoplado a peroxidasa: 111-035-003. Jackson Immuno Research
- Anti-BDNF: anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, sc-546. Santa Cruz Biotechnology
- Anti- α -tubulina: anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón, sc-398103. Santa Cruz Biotechnology

Animales

El mantenimiento y uso de los animales se realizaron con las directrices del estándar oficial mexicano para la protección animal (NOM-067-ZOO-1999). El proyecto fue aprobado por el comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL, ID 189) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo las guías internacionales del cuidado y uso ético de los animales, los ratones macho C57 BL/6J (n=6) y C58/J (n=6) fueron adquiridos en The Jackson Laboratory. Ambas cepas fueron amamantadas por nodrizas C57 BL/6J hasta las tres semanas de edad para evitar deficiencias nutricionales generales. Se mantuvieron en un sistema de cajas ventiladas individualmente bajo condiciones estándar en cama de aserrín esterilizado, en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los ratones recibieron una dieta comercial peletizada (TG rodent diet T2018S.15, ENVIGO) y agua a voluntad de un sistema de agua automatizado durante siete semanas. Ambos grupos experimentales fueron sacrificados a las 10 semanas de edad mediante decapitación.

Tinción de Golgi-Cox y Preparación de la Muestra

La tinción de Golgi es un conjunto de técnicas donde se lleva a cabo una fijación con sales dicromáticas, seguidas por la exposición a sales metálicas que se precipitan, formando un fijado característico que marca los cuerpos neuronales y sus prolongaciones al formar aductos en la membrana celular (F. Zhong et al., 2019). Para la evaluación de neuritas, los cerebros completos de ambas cepas se tiñeron mediante la técnica de Golgi-Cox con FD Rapid Golgi Stain Kit, bajo los lineamientos del manual de usuario.

Cada cerebro fue sumergido en 3 mL de la solución de impregnación preparada con una mezcla de las soluciones de cloruro de mercurio, cromato de potasio y dicromato de potasio. Después de 24 horas, la solución fue remplazada por solución fresca y los cerebros fueron almacenados durante 2 semanas a 25° C en la oscuridad. Posteriormente los cerebros fueron sumergidos en la solución crioprotectora, la cual fue reemplazada por solución fresca después de 24 horas y fueron almacenados por una semana más bajo las mismas condiciones.

Una vez teñidos, los cerebros se cortaron en rebanadas de 70 μm a una temperatura de -25 °C en criostato y fueron montados en portaobjetos cubiertos con gelatina, para el análisis del hipocampo (bregma -0.95, -3.87 mm). Cada corte fue montado en portaobjetos cubiertos con gelatina (2.5 g grenetina; 0.2 g $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ / 500 mL) y enmarcado con plumón hidrofóbico (Super Pap Pen, BioCare Medical, USA). El revelado de la tinción se realizó sumergiendo las rebanadas en una mezcla de soluciones: hidróxido de amonio 20%, tiosulfato de sodio 1% y agua Mili-Q en una proporción 1:1:2. Las muestras fueron lavadas con agua Mili-Q, después se dejaron secar naturalmente y se protegieron con resina Cytoseal 60 y cubreobjetos.

Conteo de Espinas Dendríticas

Las muestras se observaron en el microscopio óptico Olympus Bx51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) en la Unidad de Microscopia del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las neuronas piramidales de la región CA1 se identificaron por su morfología y su ubicación respecto al giro dentado.

Las imágenes se tomaron con un aumento de 100x en el eje x, y, z en 4 campos por neurona, cada campo contiene de 18 a 25 capturas en el eje z incluyendo la parte proximal y distal de las dendritas apicales y basales.

La densidad espinal se evaluó de acuerdo con la metodología propuesta por Risher et ál. (2014). realizando un conteo manual, ejecutado a través del programa Reconstruct. Posterior a la calibración del programa (0.064 px/ μ m), se contabilizaron todas las espinas dendríticas en segmentos de 25 μ m de las partes proximales y distales de las dendritas apicales y basales.

Para el análisis estadístico de la base de datos se hizo una relación del número de espinas dendríticas por micrómetro de las dendritas apicales y basales, incluida la parte proximal y distal correspondiente, en 3 neuronas por ratón de cada grupo experimental (n=3).

Evaluación del Contenido Proteico

Se realizó la disección del hipocampo (bregma -0.95, -3.87 mm) de ambos grupos experimentales (n=3), posteriormente las estructuras se homogeneizaron en 500 μ L de amortiguador de lisis con inhibidores de proteasas (RIPA), las proteínas totales se obtuvieron por centrifugación a 14000 rpm, 4°C por 15 minutos y se cuantificaron en el espectro NanoPhotometer® N60/N50 (IMPLEN). Posteriormente a 100 μ g de proteína se les adicionó amortiguador de Laemmli y fueron separadas por electroforesis en SDS-PAGE 15% a 80 mV. Se incluyeron marcadores teñidos para la determinación del peso molecular. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en condiciones semisecas durante 2 horas a 60 mA.

La membrana se sumergió en la solución de bloqueo por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario, anti-BDNF (0.34 µg/mL), por 24 horas a 4° C. Después del lavado con TBS-Tween 0.1%, se incubó con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo (1:15 000) conjugado con peroxidasa de rábano por 40 minutos a temperatura ambiente. El complejo proteína-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia y las membranas se revelaron por autorradiografía.

Para validar la caga proteica en la membrana después de la detección de BDNF, se trató la membrana con glicina ácida 2% por 2 horas a temperatura ambiente para retirar los complejos proteicos, técnica de stripping. Posteriormente se realizó el procedimiento anteriormente descrito, con las siguientes modificaciones: incubación de anticuerpo primario, anti- α -tubulina (0.4 µg/mL) por 12 horas a 4° C; anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón (1:15 000) conjugado con peroxidasa de rábano.

Las bandas correspondientes a BDNF maduro y α -tubulina, obtenidas de la revelación por autorradiografía, fueron sometidas a un análisis densitométrico mediante el programa Image J, para el análisis estadístico se normalizó el contenido de BDNF maduro respecto al contenido de α -tubulina.

Procesamiento de Datos

El manejo de la base de datos obtenida de la densitometría y del conteo de espinas dendríticas se realizó en RStudio para la obtención de los gráficos y análisis estadístico, mediante la prueba t de Student no pareada. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados

Contenido de BDNF

En la evaluación del contenido proteico de BDNF en el hipocampo, se observó una disminución significativa de la neurotrofina BDNF madura (14 kDa) en la cepa C58/J con fenotipo autista (Figura 5).

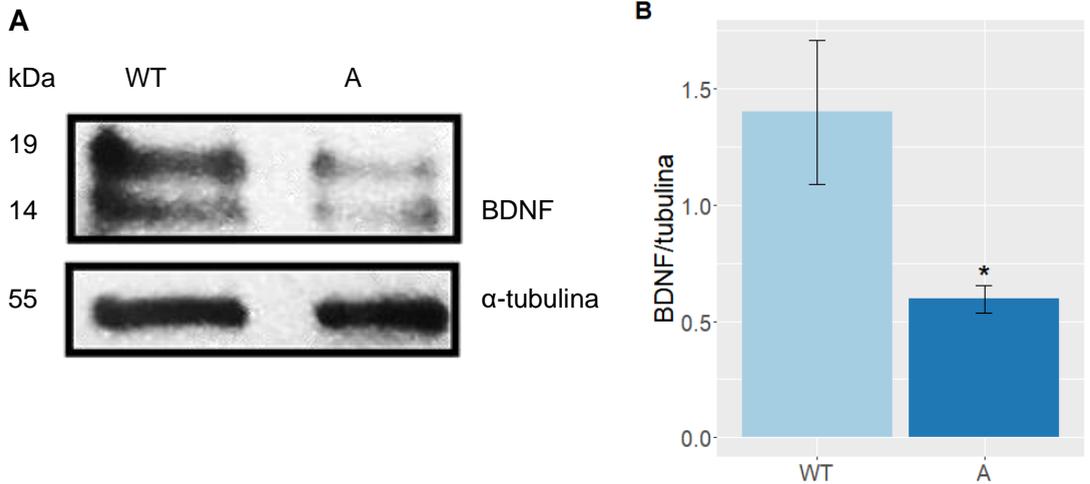


Figura 5. Contenido de BDNF. (A) Western Blot representativo del contenido BDNF en hipocampo. (B) Análisis densitométrico a partir del Western Blot. Los resultados se expresan como media \pm EEM, n=3 ratones de cada grupo experimental. Prueba de t: *p<0.05 vs WT. Cepa neurotípica (WT) y con fenotipo autista (A).

Densidad de Espinas Dendríticas

En el conteo manual de espinas dendríticas totales en las dendritas apicales y basales de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo se observó un aumento significativo en la densidad de espinas dendríticas (Figura 7) en la cepa con fenotipo autista respecto a la cepa neurotípica. En la figura 6 se resalta el aumento de la densidad de espinas dendríticas en las dendritas de los grupos experimentales.

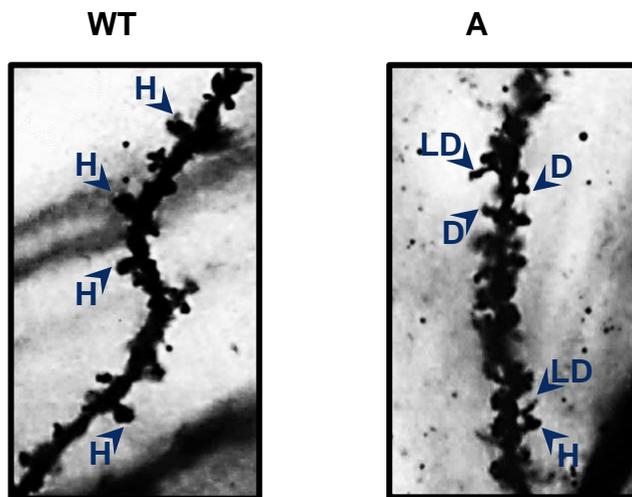


Figura 6. Espinas dendríticas teñidas por la técnica de Golgi-Cox. Imagen representativa de las observaciones a microscopio con aumento de 100x en segmentos dendríticos de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Las flechas señalan algunas de las espinas dendríticas en diferentes morfologías: hongo (H), larga delgada (LD), delgada (D). Cepa neurotípica (WT) y con fenotipo autista (A).

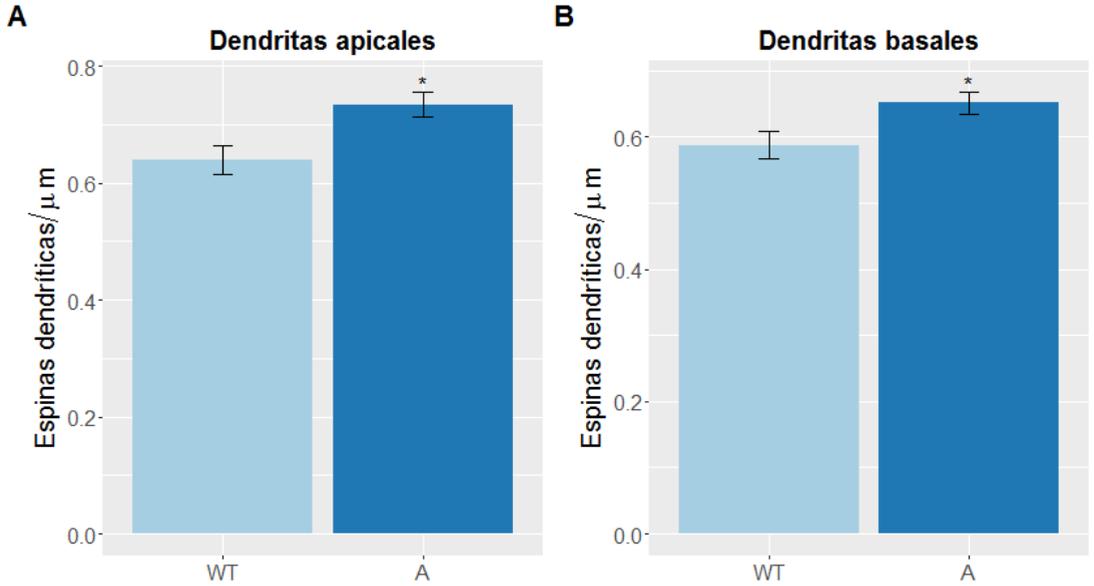


Figura 7. Densidad de espinas dendríticas. (A-B) Relación de la población de espinas dendríticas por μm en dendritas apicales y basales de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo por grupo experimental. Los resultados se expresan como media \pm EEM, $n = 3$ ratones. Prueba de t: * $p < 0.05$ vs WT. Cepa neurotípica (WT) y con fenotipo autista (A).

Espinas Dendríticas y BDNF

La siguiente figura sintetiza los resultados observados en la evaluación del contenido proteico de BDNF y las espinas dendríticas, en ambos grupos experimentales.

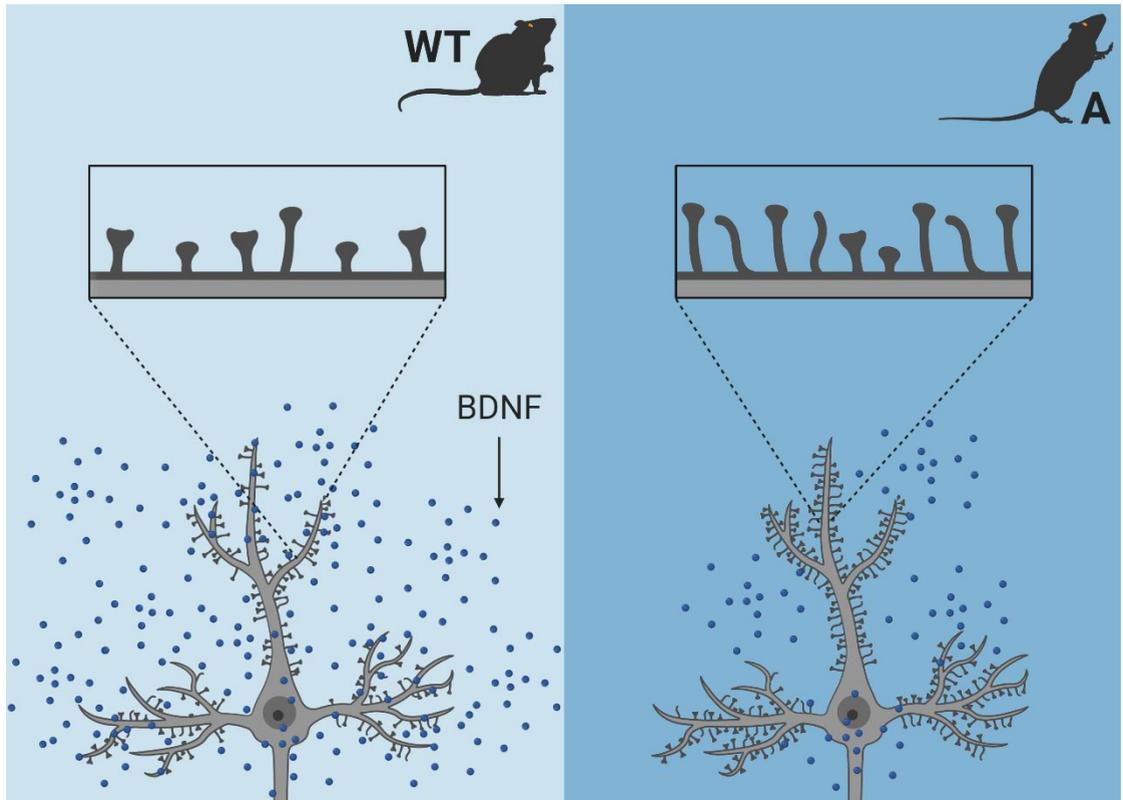


Figura 8. Relación de BDNF y espinas dendríticas. Ilustración representativa del contenido de BDNF y su relación con la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Cepa neurotípica (WT) y con fenotipo autista (A).

Discusión

El TEA ha sido asociado con alteraciones en procesos de memoria y aprendizaje, cuyo establecimiento está estrechamente relacionado con la funcionalidad del hipocampo. Previamente, se encontró que el hipocampo de ratones C58/J con fenotipo autista presenta diferencias en las disposición de las ramificaciones y una disminución en la longitud total de la arborización dendrítica, así como cambios en el contenido de ciertas proteínas involucradas en la remodelación del citoesqueleto (Barón-Mendoza et al., 2019).

Por su parte, se ha sugerido que la neurotrofina BDNF promueve la proliferación y diferenciación neuronal, además de que se ha asociado con un papel fundamental en diferentes procesos involucrados en la regulación de la plasticidad neuronal, incluyendo la formación y la remodelación morfológica de las espinas dendríticas (Chapleau et al., 2009). En el estudio realizado, se observó una disminución en el contenido proteico de BDNF en el hipocampo de la cepa C58/J en comparación con la cepa WT (Figura 5), lo que podría estar asociado con cambios en la regulación del citoesqueleto e impedimento del crecimiento dendrítico y arborización, como se ha observado en diversos estudios donde se ha validado el papel de la neurotrofina en el incremento de la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales del SNC, participando en la madurez y funcionalidad de las mismas (Harward et al., 2016; von Bohlen und Halbach & von Bohlen und Halbach, 2018).

En cultivos primarios de neuronas hipocampales maduras se ha observado que BDNF de origen endógeno tiene un efecto en el mantenimiento de la densidad y madurez de las espinas dendríticas, a partir de la modulación del citoesqueleto por medio de filamentos de actina (Alonso et al., 2004; Kellner et al., 2014).

Estas observaciones sugieren que la diferencia de la neurotrofina en la cepa con fenotipo autista podría influir en el establecimiento de la sinapsis y a su vez estar asociado a los cambios cognitivos observados en la cepa, así como se ha reportado en estudios donde los bajos niveles de BDNF se correlacionan con deterioro cognitivo, trastornos neurodegenerativos (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson) y esquizofrenia (Bawari et al., 2019; Karim et al., 2019).

Por otro lado, la evaluación de la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo demostró que la cepa C58/J presenta una mayor densidad de espinas dendríticas, resaltado en la figura 7, tanto en las dendritas basales como apicales. Este resultado ha sido reportado en otros modelos animales relacionados con el TEA, como el modelo del síndrome del X frágil (*Fmr1-KO*), donde se ha observado un incremento en la densidad e inmadurez de las espinas sinápticas, en la misma región (Jawaid et al., 2018). Estas observaciones sugieren una disrupción en el balance entre la formación y eliminación de espinas dendríticas, insinuando alteraciones en otras células como la microglía, la cual es responsable de la poda sináptica, donde se ha observado que la sobreexpresión de eIF4E (Factor de iniciación de la traducción eucariota 4E) da lugar a comportamientos de tipo autista y presenta un aumento en la densidad de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo (Xu et al., 2020). Estos hallazgos permiten inferir que el cambio en la densidad de espinas dendríticas observado en el fenotipo autista es de origen multifactorial y podría representar diferencias en la conectividad de los circuitos neuronales, sugiriendo un efecto en la memoria y consecuentemente en el aprendizaje.

Para aproximar la participación funcional de las espinas dendríticas independiente de la población de éstas, dentro de nuestro grupo de trabajo se realizó la clasificación morfológica de las espinas dendríticas en segmentos de 10 μm de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de la cepa C58/J, donde se observó un mayor densidad de espinas tipo largas delgadas y delgadas, así como un menor número de tipo hongo en las dendritas apicales, mientras que en las dendritas basales se observó una mayor densidad de espinas tipo filopodia, largas delgadas y delgadas, así como una menor densidad de tipo regordetas en la cepa con fenotipo autista en comparación con la WT (Barón-Mendoza & González-Arenas, n.d., 2020), es decir un aumento en la población de espinas dendríticas inmaduras, sugiriendo así una importante participación de BDNF en la maduración de las espinas dendríticas y en conjunto con la densidad de espinas dendríticas podría ser indicador de un establecimiento sináptico diferente al neurotípico dados los cambios estructurales, ya que se ha reportado que los cambios en la morfología de las espinas dendríticas correlacionan con la actividad sináptica en la adultez (Chidambaram et al., 2019).

La hipótesis experimental fue validada al observarse una disminución en el contenido de la neurotrofina BDNF con efecto en la densidad de las espinas dendríticas de la cepa con fenotipo autista, representado en la figura 8, donde se observó una relación inversamente proporcional entre estos cambios, la evidencia experimental y documental permite inferir que el cambio en el contenido proteico de BDNF tiene un impacto en la estructura neuronal.

Conclusión

La cepa con fenotipo autista C58/J en el hipocampo presenta un menor contenido de la neurotrofina BDNF, así como una mayor densidad de espinas dendríticas en dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales, en comparación con la cepa neurotípica, lo cual podrían sugerir que BDNF tiene un efecto en la plasticidad estructural distintiva del TEA.

Perspectivas

Identificar el contenido proteico de BDNF *in situ*.

Evaluar los cambios en la transcripción de genes inducida por BDNF.

Referencias

- Alkadhi, K. A. (2019). Cellular and Molecular Differences Between Area CA1 and the Dentate Gyrus of the Hippocampus. *Molecular Neurobiology*, *56*(9), 6566–6580. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1541-2>
- Alonso, M., Medina, J. H., & Pozzo-Miller, L. (2004). ERK1/2 Activation Is Necessary for BDNF to Increase Dendritic Spine Density in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Learning and Memory*, *11*(2), 172–178. <https://doi.org/10.1101/lm.67804>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Fifth Edit). American Psychiatric Association.
- Aylward, E. H., Minshew, N. J., Field, K., Sparks, B. F., & Singh, N. (2002). Effects of age on brain volume and head circumference in autism. *Neurology*, *59*(2), 175–183. <https://doi.org/10.1212/WNL.59.2.175>
- Bakos, J., Bacova, Z., Grant, S. G., Castejon, A. M., & Ostatnikova, D. (2015). Are Molecules Involved in Neuritogenesis and Axon Guidance Related to Autism Pathogenesis? *NeuroMolecular Medicine*, *17*(3), 297–304. <https://doi.org/10.1007/s12017-015-8357-7>
- Barón-Mendoza, I., Del Moral-Sánchez, I., Martínez-Marcial, M., García, O., Garzón-Cortés, D., & González-Arenas, A. (2019). Dendritic complexity in prefrontal cortex and hippocampus of the autistic-like mice C58/J. *Neuroscience Letters*, *703*, 149–155. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2019.03.018>
- Barón-Mendoza, I., & González-Arenas, A. (n.d.). *In progress*.
- Bawari, S., Tewari, D., Argüelles, S., Sah, A. N., Nabavi, S. F., Xu, S., Vacca,

- R. A., Nabavi, S. M., & Shirooie, S. (2019). Targeting BDNF signaling by natural products: Novel synaptic repair therapeutics for neurodegeneration and behavior disorders. *Pharmacological Research*, *148*, 1044–1058. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104458>
- Beck, H., & Yaari, Y. (2008). Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(5), 357–369. <https://doi.org/10.1038/nrn2371>
- Bey, A. L., & Jiang, Y. hui. (2014). Overview of mouse models of autism spectrum disorders. In *Current Protocols in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0566s66>
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(9), 551–563. <https://doi.org/10.1038/nrn3992>
- Brigadski, T., & Leßmann, V. (2014). BDNF: a regulator of learning and memory processes with clinical potential. *E-Neuroforum*, *5*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13295-014-0053-9>
- Castrén, E., & Antila, H. (2017). Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. *Molecular Psychiatry*, *22*(8), 1085–1095. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.61>
- Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(4), 299–309. <https://doi.org/10.1038/nrn1078>
- Chapleau, C. A., Larimore, J. L., Theibert, A., & Pozzo-Miller, L. (2009). Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: Fundamental roles in neurodevelopmental disorders

associated with mental retardation and autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 1(3), 185–196.
<https://doi.org/10.1007/s11689-009-9027-6>

Cherubini, E., & Miles, R. (2015). The CA3 region of the hippocampus: How is it? What is it for? How does it do it? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(19), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00019>

Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., & Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 92(January), 161–193.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.005>

Costa, L. G., Chang, Y. C., & Cole, T. B. (2017). Developmental Neurotoxicity of Traffic-Related Air Pollution: Focus on Autism. *Current Environmental Health Reports*, 4(2), 156–165. <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0135-2>

Courchesne, E., Pramparo, T., Gazestani, V. H., Lombardo, M. V., Pierce, K., & Lewis, N. E. (2019). The ASD Living Biology: from cell proliferation to clinical phenotype. *Molecular Psychiatry*, 24(1), 88–107.
<https://doi.org/10.1038/s41380-018-0056-y>

Croen, L. A., Connors, S. L., Matevia, M., Qian, Y., Newschaffer, C., & Zimmerman, A. W. (2011). Prenatal exposure to β 2-adrenergic receptor agonists and risk of autism spectrum disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 3(4), 307–315.
<https://doi.org/10.1007/s11689-011-9093-4>

- Dager, S. R., Wang, L., Friedman, S. D., Shaw, D. W., Constantino, J. N., Artru, A. A., Dawson, G., & Csernansky, J. G. (2007). Shape mapping of the hippocampus in young children with autism spectrum disorder. *American Journal of Neuroradiology*, *28*(4), 672–677. [https://doi.org/10.1016/s0098-1672\(08\)79136-7](https://doi.org/10.1016/s0098-1672(08)79136-7)
- De Pittà, M., Brunel, N., & Volterra, A. (2016). Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience*, *323*, 43–61. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.04.001>
- De Vincenti, A. P., Ríos, A. S., Paratcha, G., & Ledda, F. (2019). Mechanisms that modulate and diversify BDNF functions: Implications for hippocampal synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00135>
- Dudek, S. M., Alexander, G. M., & Farris, S. (2016). Rediscovering area CA2: Unique properties and functions. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(2), 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.22>
- 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>
- Evans, B. (2013). How autism became autism: The radical transformation of a central concept of child development in Britain. *History of the Human Sciences*, *26*(3), 3–31. <https://doi.org/10.1177/0952695113484320>
- Faras, H., Al Ateeqi, N., & Tidmarsh, L. (2010). Autism spectrum disorders. *Annals of Saudi Medicine*, *30*(4), 295–300. <https://doi.org/10.4103/0256->

- Festing, M. (1998). *Inbred Strains of Mice: C58*. Mouse Genome Informatics. http://www.informatics.jax.org/inbred_strains/mouse/docs/C58.shtml
- Fombonne, E., Marcin, C., Manero, A. C., Bruno, R., Diaz, C., Villalobos, M., Ramsay, K., & Nealy, B. (2016). Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato, Mexico: The Leon survey. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *46*(5), 1669–1685. <https://doi.org/10.1007/s10803-016-2696-6>
- Francis, K., Dougali, A., Sideri, K., Kroupis, C., Vasdekis, V., Dima, K., & Douzenis, A. (2018). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with ASD and their parents: a 3-year follow-up. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *137*(5), 433–441. <https://doi.org/10.1111/acps.12872>
- Gene, S. (2019). *SFARI Gene*. sfari.org/resource/sfari-gene/
- Hadsell, D. L., Wei, J., Olea, W., Hadsell, L. A., Renwick, A., Thomson, P. C., Shariflou, M., & Williamson, P. (2012). In silico QTL mapping of maternal nurturing ability with the mouse diversity panel. *Physiological Genomics*, *44*(16), 787–798. <https://doi.org/https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00159.2011>
- Harward, S. C., Hedrick, N. G., Hall, C. E., Parra-Bueno, P., Milner, T. A., Pan, E., Laviv, T., Hempstead, B. L., Yasuda, R., & McNamara, J. O. (2016). Autocrine BDNF-TrkB signalling within a single dendritic spine. *Nature*, *538*(7623), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature19766>
- Hutsler, J. J., & Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, *1309*, 83–94. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2009.09.120>

- Idring, S., Magnusson, C., Lundberg, M., Ek, M., Rai, D., Svensson, A. C., Dalman, C., Karlsson, H., & Lee, B. K. (2014). Parental age and the risk of autism spectrum disorders: Findings from a Swedish population-based cohort. *International Journal of Epidemiology*, *43*(1), 107–115. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt262>
- Irwin, S. A., Idupulapati, M., Gilbert, M. E., Harris, J. B., Chakravarti, A. B., Rogers, E. J., Crisostomo, R. A., Larsen, B. P., Mehta, A., Alcantara, C. J., Patel, B., Swain, R. A., Weiler, I. J., Oostra, B. A., & Greenough, W. T. (2002). Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *American Journal of Medical Genetics*, *111*(2), 140–146. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10500>
- Itami, C., Kimura, F., Kohno, T., Matsuoka, M., Ichikawa, M., Tsumoto, T., & Nakamura, S. (2003). Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of “silent” synapses in the developing mouse barrel cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(22), 13069–13074. <https://doi.org/10.1073/pnas.2131948100>
- Jawaid, S., Kidd, G. J., Wang, J., Swetlik, C., Dutta, R., & Trapp, B. D. (2018). Alterations in CA1 hippocampal synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *Glia*, *66*(4), 789–800. <https://doi.org/10.1002/glia.23284>
- Jumah, F., Ghannam, M., Jaber, M., Adeeb, N., & Tubbs, R. S. (2016). Neuroanatomical variation in autism spectrum disorder: A comprehensive review. *Clinical Anatomy*, *29*(4), 454–465. <https://doi.org/10.1002/ca.22717>

- Karim, Y., Siddique, A. E., Hossen, F., Rahman, M., Mondal, V., Banna, H. U., Hasibuzzaman, M. M., Hosen, Z., Islam, M. S., Sarker, M. K., Nikkon, F., Saud, Z. A., Xin, L., Himeno, S., & Hossain, K. (2019). Dose-dependent relationships between chronic arsenic exposure and cognitive impairment and serum brain-derived neurotrophic factor. *Environment International*, *131*, 105029. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105029>
- Kellner, Y., Gödecke, N., Dierkes, T., Thieme, N., Zagrebelsky, M., & Korte, M. (2014). The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *6*(MAR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00005>
- Klausberger, T., & Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: The unity of hippocampal circuit operations. *Science*, *321*(5885), 53–57. <https://doi.org/10.1126/science.1149381>
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *38*(3), 579–593. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>
- 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*, *6*(5), 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0138-4>
- Lyall, K., Croen, L., Daniels, J., Fallin, M. D., Ladd-Acosta, C., Lee, B. K., Park, B. Y., Snyder, N. W., Schendel, D., Volk, H., Windham, G. C., & Newschaffer, C. (2017). The Changing Epidemiology of Autism Spectrum

Disorders. *Annual Review of Public Health*, 38(1), 81–102.

<https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031816-044318>

Maiti, P., Manna, J., Ilavazhagan, G., Rossignol, J., & Dunbar, G. L. (2015).

Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 59, 208–237.

<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2015.09.020>

Mandy, W., & Lai, M. C. (2016). Annual Research Review: The role of the

environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, 57(3), 271–292. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12501>

Martínez-Cerdeño, V. (2017). Dendrite and spine modifications in autism and

related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Developmental Neurobiology*, 77(4), 393–404.

<https://doi.org/10.1002/dneu.22417>

Maze Engineers. (2018). *C58/J Mouse Strain*. mazeengineers.com/c58-j-mouse-strain/#2

Meis, S., Endres, T., & Lessmann, V. (2012). Postsynaptic BDNF signalling regulates long-term potentiation at thalamo-amygdala afferents. *Journal of Physiology*, 590(1), 193–208.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.220434>

Meltzer, A., & Van De Water, J. (2017). The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 284–298.

<https://doi.org/10.1038/npp.2016.158>

Monteiro, P., & Feng, G. (2017). SHANK proteins: Roles at the synapse and in

autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(3), 147–157. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>

Moosa, A., Shu, H., Sarachana, T., & Hu, V. W. (2018). Are endocrine disrupting compounds environmental risk factors for autism spectrum disorder? *Hormones and Behavior*, 101, 13–21. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2017.10.003>

Moy, S. S., Nadler, J. J., & Perez, A. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3, 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00076.x>

Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Perez, A., Holloway, L. P., Barbaro, R. P., Barbaro, J. R., Wilson, L. M., Threadgill, D. W., Lauder, J. M., Magnuson, T. R., & Crawley, J. N. (2007). Mouse behavioral tasks relevant to autism: Phenotypes of 10 inbred strains. *Behavioural Brain Research*, 176(1), 4–20. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2006.07.030>

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>

Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and Function of Dendritic Spines. *Annual Review of Physiology*, 64(1), 313–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008>

Parellada, M., Penzol, M. J., Pina, L., Moreno, C., González-Vioque, E., Zalsman, G., & Arango, C. (2014). The neurobiology of autism spectrum

disorders. *European Psychiatry*, 29(1), 11–19.
<https://doi.org/10.1016/J.EURPSY.2013.02.005>

Patestas, M. A., & Gartner, L. P. (2016). *A textbook of neuroanatomy* (Second). Wiley/Blackwell.

Pathania, M., Davenport, E. C., Muir, J., Sheehan, D. F., López-Doménech, G., & Kittler, J. T. (2014). The autism and schizophrenia associated gene CYFIP1 is critical for the maintenance of dendritic complexity and the stabilization of mature spines. *Translational Psychiatry*, 4(January), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/tp.2014.16>

Poo, M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(1), 24–32. <https://doi.org/10.1038/35049004>

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>

Risher, W. C., Ustunkaya, T., Singh Alvarado, J., & Eroglu, C. (2014). Rapid Golgi Analysis Method for Efficient and Unbiased Classification of Dendritic Spines. *PLoS ONE*, 9(9), e107591.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107591>

Ryan, B., Young, N., Crawley, J., Bodfis, J., & Moy, 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>

Sala, C., Piëch, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G., & Sheng, M. (2001). Regulation of Dendritic Spine Morphology and Synaptic Function by Shank and Homer. *Neuron*, 31(1), 115–130.

[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00339-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00339-7)

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>

Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., & Blum, R. (2017). Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, *469*(5–6), 593–610. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1964-4>

Schmeisser, M. J., & Boeckers, T. M. (2017). *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology: Translational Anatomy and Cell Biology of Autism Spectrum Disorder* (Vol. 224). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-52498-6>

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>

Sealey, L. A., Hughes, B. W., Sriskanda, A. N., Guest, J. R., Gibson, A. D., Johnson-Williams, L., Pace, D. G., & Bagasra, O. (2016). Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environment International*, *88*, 288–298. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.12.021>

Skogstrand, K., Hagen, C. M., Borbye-Lorenzen, N., Christiansen, M., Bybjerg-Grauholm, J., Bækvad-Hansen, M., Werge, T., Børghlum, A.,

Mors, O., Nordentoft, M., Mortensen, P. B., & Hougaard, D. M. (2019). Reduced neonatal brain-derived neurotrophic factor is associated with autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41398-019-0587-2>

Smith, V., & Brown, N. (2014). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 99(5), 198.
<https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-305636>

Song, M., Martinowich, K., & Lee, F. (2017). BDNF at the synapse: why location matters. *Molecular Psychiatry*, 22, 1370–1375.
<https://doi.org/10.1038/mp.2017.144>

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>

Tejeda, G. S., & Díaz-Guerra, M. (2017). Integral characterization of defective BDNF/TrkB signalling in neurological and psychiatric disorders leads the way to new therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms18020268>

The Human Protein Atlas. (2020). *The proteome of the Hippocampal formation*.
https://www.proteinatlas.org/humanproteome/brain/hippocampal+formation#extended_human_hippocampal_formation_tissue_section

Tzakis, N., & Holahan, M. R. (2019). Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13(233), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00233>

- von Bohlen und Halbach, O., & von Bohlen und Halbach, V. (2018). BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 729–741. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2782-x>
- Wagner, G. C., Reuhl, K. R., Cheh, M., McRae, P., & Halladay, A. K. (2006). A New Neurobehavioral Model of Autism in Mice: Pre- and Postnatal Exposure to Sodium Valproate. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 36(6), 779–793. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10803-006-0117-y>
- Wefelmeyer, W., Puhl, C. J., & Burrone, J. (2016). Homeostatic Plasticity of Subcellular Neuronal Structures: From Inputs to Outputs. *Trends in Neurosciences*, 39(10), 656–667. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.08.004>
- World Health Organization. (2019). *Autism spectrum disorders*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>
- Xu, Z.-X., Kim, G. H., Tan, J.-W., Riso, A. E., Sun, Y., Xu, E. Y., Liao, G.-Y., Xu, H., Lee, S.-H., Do, N.-Y., Lee, C. H., Clipperton-Allen, A. E., Kwon, S., Page, D. T., Lee, K. J., & Xu, B. (2020). Elevated protein synthesis in microglia causes autism-like synaptic and behavioral aberrations. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15530-3>
- Zhang, Y., Li, N., Li, C., Zhang, Z., Teng, H., Wang, Y., Zhao, T., Shi, L., Zhang, K., Xia, K., Li, J., & Sun, Z. (2020). Genetic evidence of gender difference in autism spectrum disorder supports the female-protective effect. *Translational Psychiatry*, 10(4), 1–10.

<https://doi.org/10.1038/s41398-020-0699-8>

Zhong, F., Liu, L., Wei, J. L., & Dai, R. P. (2019). Step by step golgi-cox staining for cryosection. *Frontiers in Neuroanatomy*, *13*(62), 1–6.

<https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00062>

Zhong, S., Ding, W., Sun, L., Lu, Y., Dong, H., Fan, X., Liu, Z., Chen, R., Zhang, S., Ma, Q., Tang, F., Wu, Q., & Wang, X. (2020). Decoding the development of the human hippocampus. *Nature*, *577*, 731–736.

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1917-5>