



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS  
NEURONAS DE LA REGIÓN CA1 DEL  
HIPOCAMPO EN RATONES BTBR COMO  
MODELO IDIOPÁTICO DE TEA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

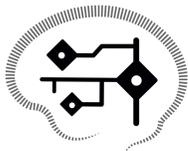
LICENCIADO EN NEUROCIENCIAS

P R E S E N T A :

ISAAC CHÁVEZ BLANCAS

TUTORA:

DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS



NEUROCIENCIAS  
UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2024



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.

## **Dedicatorias**

Por sobre todo a mi amada madre, nada de lo que me he propuesto hubiese sido posible sin ti. Muchas gracias por todo tu amor y muestras de éste. A mis hermanos, quienes desde temprana edad me inspiraron a ser curioso.

A todos quienes de una u otra forma me inspiraron y apoyaron a llegar hasta este logro.

A los grandes amigos que siempre estuvieron allí para apoyarme.

Al amor incondicional que me ha brindado mi querido Antonio.

Con gran cariño a mi mentor en el camino de la ciencia, el Dr. Marco Sanabraís.

## **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de plasticidad sináptica y estructural a cargo de la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, en el departamento de Neurodesarrollo y Fisiología de la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apoyado el programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM-IN207420) y (PAPIIT-UNAM-IN2099223).

Agradezco profundamente el apoyo incesante del M. en C. Gerardo Rodrigo Perera Murcia. Así como de la M. en C. Carmen Reyes Luna, por su colaboración y de la Lic. Karla Patricia Casas Rosas.

Agradezco a la Dra. Beatríz Aguilar Maldonado por haber sido paciente conmigo en mi primera experiencia dentro de un laboratorio, así como a la Dra. Susana Castro Obregón, quien me abrió las puertas de su laboratorio, y a todo su equipo.

Y por supuesto a mi comité tutor conformado por el Dr. Octavio García González, la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, el Dr. Daniel Reyes Haro, el Dr. Alonso Martínez Canabal y el Dr. Mario Alberto Arias García. Quienes brindaron su amable apoyo.

# ÍNDICE

I. Dedicatorias

II. Agradecimientos

Índice

Resumen

1. Antecedentes.....	2
1.1 Trastorno del espectro autista.....	2
1.2 Etiología y factores de riesgo.....	3
1.3 Modelos animales del TEA.....	4
1.3.1 Modelos genéticos.....	5
1.3.2 Modelos ambientales.....	5
1.3.3 Modelos idiopáticos.....	6
1.4 Dendritas y sus espinas.....	9
1.4.1 Las espinas en la plasticidad sináptica.....	13
1.4.2 Visualizando espinas en neuronas vivas.....	13
1.5 Alteraciones en el hipocampo del BTBR.....	16
2. Hipótesis.....	18
3. Objetivos.....	18
3.1 Objetivo general.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. Metodología.....	19
5. Resultados .....	21
5.1 Las neuronas de ratones BTBR poseen una menor cantidad de dendritas basales .....	21
5.2 La arborización de las dendritas de neuronas BTBR es menos compleja que las de los controles (C57Bl6/J).....	23
5.3 La densidad de espinas dendríticas está reducida en neuronas BTBR.....	27
6. Discusión .....	29
7. Conclusiones.....	32
8. Referencias.....	33

## Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA) aumenta su prevalencia global año con año. Este trastorno del neurodesarrollo se caracteriza por 4 ejes sintomáticos principales: 1) alteraciones en la comunicación, 2) conductas repetitivas o estereotipadas, 3) dificultades en la interacción social y 4) alteraciones sensoriales. Su diagnóstico se realiza mediante el análisis de la conducta y actualmente no existe un marcador biológico para su diagnóstico. De hecho, la gran mayoría de casos de autismo son idiopáticos.

En un esfuerzo por ampliar nuestro entendimiento del TEA, se han generado diversos modelos animales de este trastorno. Uno de los modelos idiopáticos de mayor uso es el ratón BTBR (*Black and Tan BRachyury*). La cual es una cepa endogámica recientemente considerada como modelo del TEA. Debido a que presenta conductas repetitivas, déficits en su interacción social, y comunicación alterada.

Múltiples alteraciones neurobiológicas han sido descritas en la cepa BTBR, siendo la más evidente su agenesia del cuerpo calloso. Además de esto se han realizado múltiples estudios genéticos que han arrojado grupos de genes afectados en estos ratones. Entre estos el gen *Itpr3*, cuya alteración es la causante de la pérdida de pelaje que caracteriza a este modelo.

Debido a que el uso de esta cepa ha sido ampliamente extendido resulta importante indagar más en su fondo neurobiológico. Con este propósito, este trabajo se enfocó en analizar la morfología de las neuronas piramidales de CA1 en cultivos organotípicos del hipocampo de esta cepa, a partir de imágenes obtenidas a través de microscopía de dos fotones.

La complejidad del árbol dendrítico basal de estas neuronas y su densidad de espinas dendríticas están disminuidas en comparación con la cepa C57, lo que sugiere un menor número de contactos sinápticos.

En suma, estos hallazgos muestran que las neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo de ratones BTBR tienen alteraciones morfológicas que potencialmente afectan su capacidad de comunicación, lo que contribuye al entendimiento de las bases neurobiológicas del TEA.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Trastorno del espectro autista

La palabra autismo tiene sus raíces en el término griego “*autós*”, que significa *uno mismo*. Usada por primera vez en 1911 por el psiquiatra Eugen Bleuler, para describir la desconexión del mundo externo y ensimismamiento observados en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia (Kuhn, 2004). Posteriormente Leo Kanner, en 1943, describió a una supuesta esquizofrenia de inicio temprano en niños con dificultades en la interacción y comunicación con otros bajo el mismo término: autismo (Kanner, 1943). Fue hasta 1972 que Michael Rutter definió al autismo como un trastorno del neurodesarrollo, separado de la esquizofrenia (Rutter, 1972).

Hoy reconocemos al trastorno del espectro autista (TEA) no como a un desorden único, sino un grupo de trastornos que comparten ciertas características, pero difieren en su etiología (Hirota & King, 2023). Se tienen definidos cuatro ejes sintomáticos principales: 1. Deficiencias en el lenguaje verbal y no verbal, 2. Deficiencias en la interacción social, 3. Conductas estereotipadas y/o repetitivas, y 4. Alteraciones en el procesamiento sensorial (American Psychiatric Association, 2013). Algunos sugieren que la definición de TEA que ahora incluye un espectro más amplio puede explicar parcialmente el aumento en su prevalencia con respecto a estimaciones anteriores (Hansen et al., 2015; Hirota & King, 2023).

Múltiples estudios apuntan a un incremento constante en la prevalencia del TEA, con el reporte de más reciente publicación indicando que aproximadamente 1 de cada 100 niños es diagnosticado con TEA alrededor del mundo (Zeidan et al., 2022). El dato más actual reporta una prevalencia de 1 en 36 individuos en los Estados Unidos de América (Shaw et al., 2023). Y en México un estudio realizado usando como muestra niños del estado de Guanajuato estimó una prevalencia de 1 entre cada 115 niños (Fombonne et. al., 2016). Es probable que los cambios en los criterios de diagnóstico, una mayor conciencia sobre el TEA, una mejor verificación durante el desarrollo y un mayor acceso a servicios, como la intervención conductual temprana y la educación con programas individualizados, hayan

contribuido a la mayor prevalencia de TEA (Hansen et al., 2015). Debido a esto, resulta de interés continuar con la investigación sobre la neurobiología del TEA.

## **1.2. Etiología y factores de riesgo**

El estudio de la genética del TEA ha revelado el importante papel que ésta juega en el desarrollo del trastorno. Los estudios que evaluaron la prevalencia del TEA encontraron que, en gemelos idénticos, si un gemelo tiene TEA, el otro tendrá entre un 36% y un 95% de posibilidades de desarrollar TEA. En gemelos no idénticos la probabilidad de que el otro gemelo presente TEA se reduce al 0-30% (Hallmayer et al., 2011; Rosenberg et al., 2009). Los hermanos de niños con TEA tienen un riesgo del 2 al 8% de desarrollar el trastorno, y este riesgo aumenta del 12 al 20% si el niño afectado muestra déficits en uno o dos de los dominios afectados del TEA (Bolton et al., 1994).

Los factores de riesgo genéticos para el TEA se comparten con otros trastornos psiquiátricos y del neurodesarrollo (Phil H. Lee 2019; Wu et al., 2020). El número de variantes genéticas asociadas al TEA es relativamente bajo (~100 genes) y se asocian con un riesgo significativo de presentar el trastorno (Sanders et al., 2015). Mientras que aquellas asociadas a un riesgo menor representan la mayoría de los casos, constituyendo miles de ellas (Willsey et al., 2022). Un gran número de estos genes participan en la regulación de la expresión génica, neurogénesis, modificación de la cromatina y función sináptica (Durak et al., 2016; Ip et al., 2018; Ogiwara et al., 2018; Wilkinson et al., 2015; Zhang et al., 2021).

Un metanálisis identificó que los factores maternos, como la hipertensión gestacional, el sobrepeso antes o durante el embarazo, la preeclampsia y la edad materna de 35 años o más están asociados con tasas más altas de TEA (Kim et al., 2019). Además, los estudios de cohortes y de casos control informan que la edad paterna avanzada aumenta 21% el diagnóstico de TEA en la descendencia por cada aumento de 10 años (S. Wu et al., 2017). Otros factores como el uso de medicamentos durante el embarazo y el periodo entre embarazos tanto corto (<12 meses) como largo (≥72 meses), se asociaron con un mayor riesgo de diagnóstico de TEA (Zerbo et al., 2015).

Estudios epidemiológicos proporcionan evidencia de que la exposición de las madres embarazadas, especialmente durante el primer o segundo trimestre, a infecciones virales o bacterianas, promueve la activación inmune materna (AIM) y aumenta el riesgo de enfermedades neuropsiquiátricas, incluido el TEA, en sus hijos un 13%, en comparación con los hijos de madres embarazadas no expuestas (Estes & McAllister, 2016). La exposición de las madres embarazadas a medicamentos psicotrópicos, especialmente durante el primer trimestre, también se considera un factor de riesgo para el TEA (Gardener et al., 2009). Con respecto al uso de medicamentos durante el embarazo y el riesgo de TEA, el riesgo absoluto de TEA para la descendencia fue del 4,4%; particularmente con exposiciones al ácido valproico durante el embarazo en un estudio poblacional de 655, 615 niños en Dinamarca (Christensen et al., 2013).

Se tiene un avance significativo en cuanto al entendimiento de este trastorno, pero aún se necesitan estudios clínicos adicionales para validar los factores genéticos y de riesgo encontrados hasta la fecha, así como elucidar la neurobiología y neurofisiología alrededor del TEA. Los modelos animales han cooperado en gran manera a este respecto.

### **1.3 Modelos animales del TEA**

En la actualidad no se dispone de marcadores biológicos para el diagnóstico del TEA, clínicamente se diagnostica principalmente a través de evaluaciones del comportamiento. Los modelos animales de TEA actualmente establecidos presentan comportamientos similares a los del TEA en humanos. Para explorar herramientas potenciales que puedan participar en los mecanismos neurobiológicos del TEA humano, se han propuesto y establecido modelos genéticos, ambientales e idiopáticos.

### **1.3.1 Modelos genéticos**

Las alteraciones genéticas identificadas en el humano han servido de referencia para desarrollar diversos modelos animales. Los genes alterados van desde la familia de las neurexinas, participes en la adhesión sináptica (Guang et al., 2018; Li & Pozzo-Miller, 2020), hasta las neuroliginas, moléculas de adhesión celular responsables de la estabilidad en la estructura sináptica (Chanda et al., 2016). Uno de los modelos genéticos mayormente utilizado en la actualidad es el modelo de *Shank3*, este gen codifica para SHANK3, una proteína de andamiaje de la densidad postsináptica. Este modelo se ha replicado en mosca, pez cebra, ratón, rata, perro y mono (Liu et al., 2018; Song et al., 2019; Tian et al., 2023; Song Wu et al., 2017; Zhou et al., 2019). Los ratones *Shank3* (heterocigotos y homocigotos), son considerados un modelo de TEA, debido a que presentan deficiencias en la interacción social, alteraciones sensoriales, conductas repetitivas (acicalamiento excesivo) y vocalizaciones ultrasónicas menores (Bozdagi et al., 2010). Sin embargo, no son el único modelo genético de TEA, existen modelos como MECP2 (modelo de Rett), modelo del X frágil, síndrome de la duplicación de MECP2, etcétera (Bagni & Zukin, 2019; D’Mello III, 2021; Ip et al., 2018; Zhang et al., 2017).

### **1.3.2 Modelos ambientales**

Los modelos inducidos ambientalmente afectan a la descendencia a través de la exposición de la madre a medios infecciosos/inflamatorios y a partir de sustancias químicas específicas; que promueven rasgos de comportamiento similares al TEA (Iwata et al., 2010).

Por ejemplo, el tratamiento con endotoxina y ácido policíclico polisacárido a la mitad de la gestación en roedores, induce comportamientos similares al TEA en las crías (Xuan & Hampson, 2014). Además, la exposición a infecciones virales en roedores resulta en una disminución de la conducta social en la descendencia y un aumento de los comportamientos estereotipados en la descendencia, considerándose un fenotipo tipo

TEA (Ohkawara et al., 2015). Estos modelos se pueden utilizar para explorar cambios neurológicos y de comportamiento, junto con los mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en el TEA. Sin embargo, la mayoría de estos modelos animales evalúan procesos inflamatorios globales que afectan en más de un sistema, lo cual debe ser tomado en cuenta al momento de obtener conclusiones a partir de ellos.

Uno de los modelos ambientales mayormente estudiado es el de exposición prenatal al ácido valproico (VPA). El VPA es un ácido graso de cadena corta que se utiliza ampliamente como antiepiléptico y estabilizador del estado de ánimo (Charlier et al., 2021). Los estudios clínicos reportaron un mayor riesgo de presentar defectos en el tubo neural, malformaciones extracerebrales, retrasos en el desarrollo, deterioro cognitivo y TEA cuando se toma VPA durante el embarazo (Danzer, 2019). La exposición prenatal al VPA causa el síndrome del ácido valproico fetal (FVS), los niños con FVS muestran una incidencia significativamente mayor de problemas de desarrollo, disminución de la inteligencia verbal y, a menudo, problemas de comunicación comórbidos asociados con el TEA (Mutlu-Albayrak et al., 2017). Los roedores expuestos prenatalmente al VPA exhiben un comportamiento deficiente comparable al de los individuos autistas, y por esto se han utilizado ampliamente como modelo común para estudiar la neurobiología del autismo (Jiang et al., 2022).

### 1.3.3 Modelos idiopáticos

Las cepas endogámicas de roedores que mostraron deficiencias sociales y comportamientos repetitivos sustanciales, se consideran un modelo de TEA idiopático. Un ejemplo de esto son los ratones BTBR  $T^+ Itpr3^{tf}/J$ , esta cepa se derivó de la cepa endogámica BTBR (Black and Tan BRachyury) que portaba las mutaciones  $a^t$  (nonagouti; *black and tan*),  $Itpr3^{tf}$  (receptor 3 de inositol 1,4,5-trifosfato; *tufted*) y  $T$  (braquiuria), que actualmente es una de las cepas más estudiadas (Meyza & Blanchard, 2017).

Originalmente esta cepa se utilizaba para estudios sobre resistencia a la insulina, nefropatía inducida por diabetes y fenilcetonuria, pero hace poco más de diez años se consideró un potencial modelo del TEA por mostrar comportamientos robustos asociados al TEA (Bolívar et al., 2007; Moy et al., 2007). El gen del receptor 3 de trifosfato de inositol (*Itpr3*) fue señalado como responsable del locus copetudo (*tf*) del ratón (Ellis et al., 2013), lo que resultó en un cambio del nombre de la cepa de BTBR  $T^{+tf}/J$  a BTBR  $T^{+ Itpr3^{tf}}/J$  (Fig1). Además, se descubrió que la eliminación en el gen *Itpr3* causaba indiferencia en los ratones BTBR hacia los sabores dulce, umami y amargo (Tordoff & Ellis, 2013), lo que a su vez afecta la ingesta de alimento, y favorece un consumo preferencial de grasas (Tordoff et al., 2014), respecto a una dieta rica en carbohidratos, factor destacado a considerar si se desea someterlo a condicionamiento operante.



**Figura 1. Ratón BTBR.** La fotografía muestra a un ratón BTBR adulto, que presenta el característico fenotipo del locus copetudo (*tf*), así como los patrones de pérdida de pelaje (Ellis et al., 2013).

Recientemente se señalaron muchas similitudes neuroanatómicas entre el modelo de ratón BTBR y ciertas subpoblaciones de pacientes con TEA, impulsado por el desarrollo y la popularización de técnicas de neuroimagen que permitieron una visión más sistemática de las diferencias en la morfología cerebral. Hasta 2013, la mayor parte de la información sobre la conectividad cerebral aberrante en ratones BTBR, incluida la sorprendente agenesia completa del cuerpo calloso (aCC) y la reducción de la comisura del hipocampo, provenían de evaluaciones histológicas post mortem (Bohlen et al., 2012; Jones-Davis et al., 2013; Wahlsten et al., 2003). De manera similar, recientemente se confirmaron cambios en la forma y localización de muchas estructuras cerebrales, incluidos el hipocampo y la amígdala (Mercier et al., 2012). Las aberraciones neuroanatómicas análogas en subpoblaciones de pacientes con TEA se reportaron en años recientes (Bridgman et al., 2014; Packer, 2016; Wegiel et al., 2010).

Los ratones BTBR exhiben además alteraciones importantes en la morfología de los ventrículos cerebrales y reducción de las fracciones de heparán sulfato del nicho neurogénico de la zona subventricular del ventrículo lateral, que es la matriz extracelular especializada propia de la región neurogénica (Mercier et al., 2012). El heparán sulfato (HS) es un proteoglicano de la matriz extracelular involucrado tanto en la guía axonal como en la formación de espinas dendríticas (Pérez et al., 2016). También se encontró esta deficiencia en HS en el análisis post mortem de cerebros de niños con TEA (Pearson et al., 2013).

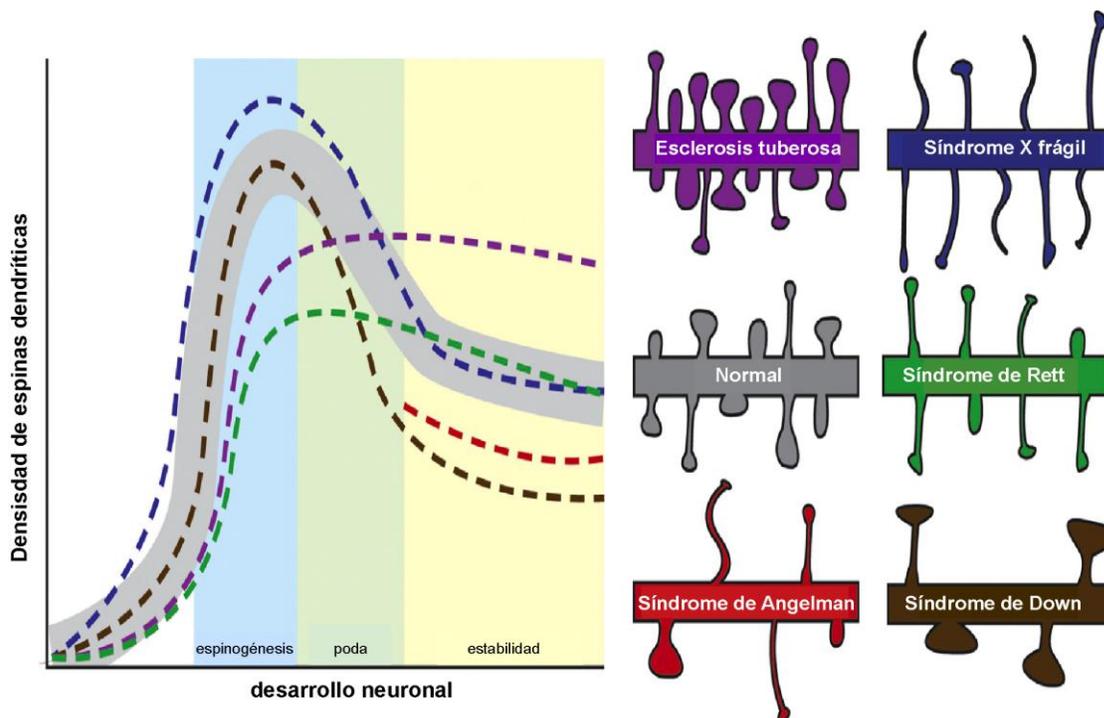
Los estudios transcriptómicos y proteómicos muestran que la guía de los axones, la neurogénesis (Daimon et al., 2015), así como la mielinización (Wei et al., 2016) y la generación de oligodendrocitos (Jasien et al., 2014) están regulados de manera diferente en los cerebros BTBR en comparación con los ratones B6. La combinación del fenotipo acaloso con una neurogénesis disminuida (Stephenson et al., 2011) propia de ratones BTBR permite estudiar el papel de ambos factores en el desarrollo de conductas sociales. Hasta ahora, solo se había informado que era necesaria la neurogénesis juvenil para el desarrollo de conductas afiliativas (Wei et al., 2011), mientras que un experimento de disección del cuerpo calloso realizado por Yang y colaboradores (Yang et al., 2009) indicó que la ausencia física postnatal temprana del cuerpo calloso no afectó la sociabilidad en ratones con desarrollo normal.

El desequilibrio de la neurotransmisión excitadora/inhibitoria (E/I), se ha propuesto como un mecanismo focal responsable de conductas similares al TEA (Uzunova et al., 2016). En consonancia con esto se observaron oscilaciones reducidas de la red coherente, así como un aumento de las corrientes GABAérgicas y reducción de las glutamatérgicas en CA3 de los hipocampos de ratones BTBR posnatales (Cellot et al., 2016). Por otro lado, se encontró que la frecuencia de la corriente postsináptica inhibitoria espontánea (IPSC), se redujo significativamente, mientras que la amplitud y la frecuencia de la corriente postsináptica excitadora espontánea (EPSC) aumentó en cortes de hipocampo BTBR de ratones adultos (6-10 meses) (Han et al., 2014); ambas corrientes fueron normalizadas mediante el tratamiento con clonazepam. Aunque este par de reportes parecen contradictorios, varios

estudios farmacológicos respaldan al último. Diferentes estudios informan la efectividad de muchas categorías de medicamentos que afectan el equilibrio E/I para revertir al menos un dominio de las conductas relevantes para el autismo en el ratón BTBR (Meyza & Blanchard, 2017).

### 1.4 Dendritas y sus espinas

Las dendritas y sus espinas son las principales estructuras neuronales que reciben información de otras neuronas y células gliales, y su morfología es uno de los factores cruciales que determinan cómo se integran las señales provenientes de las sinapsis individuales (Martínez-Cerdeño, 2017). Se han descrito modificaciones de las dendritas y sus espinas en muchos modelos de TEA (Fig. 2). Sin embargo, aún queda mucho por entender sobre las características de las dendritas y las espinas dendríticas en el TEA y trastornos relacionados.



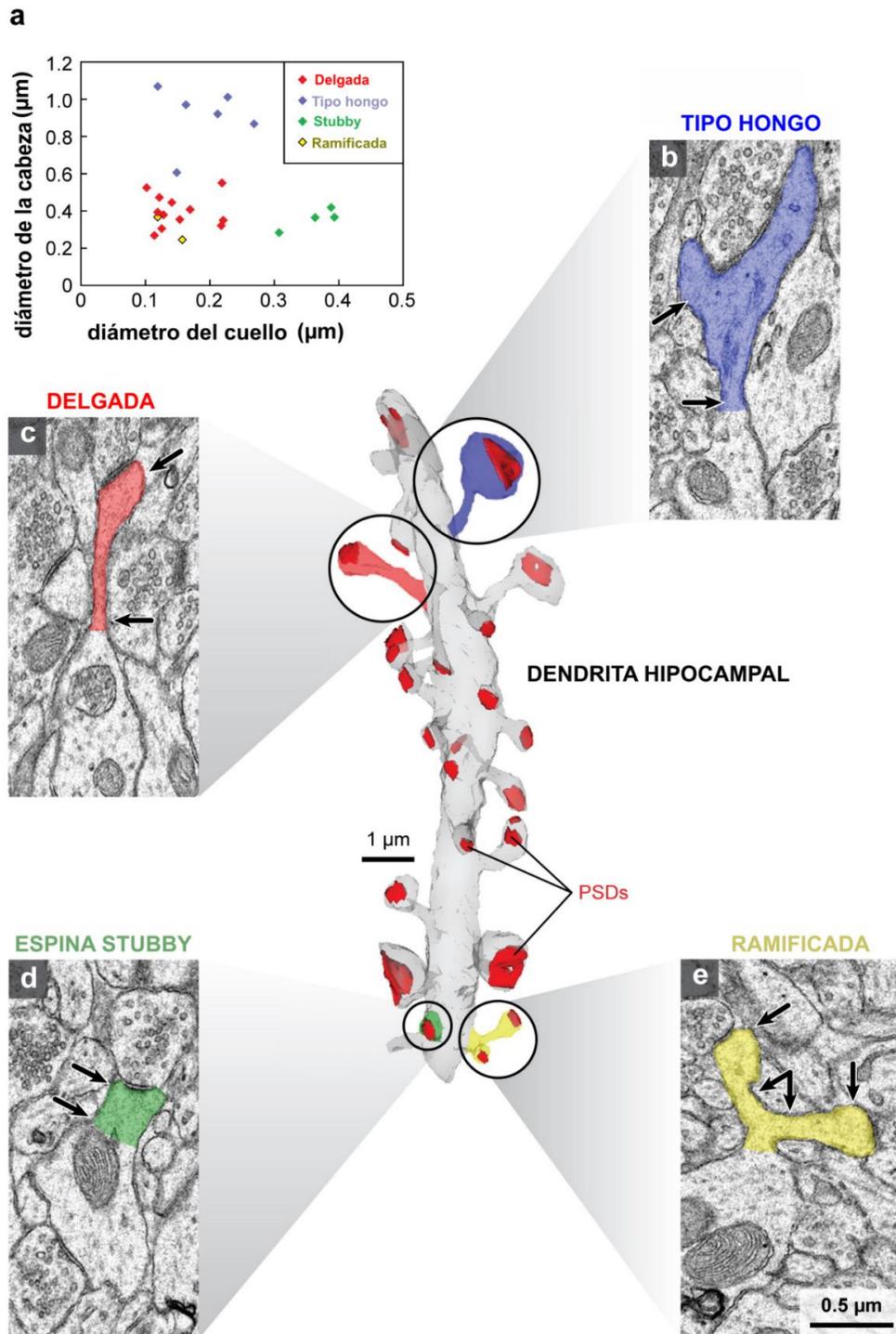
**Figura 2. Alteraciones en espinas dendríticas asociadas a trastornos del neurodesarrollo.** En la curva gris se muestra el desarrollo normal donde posterior al proceso de poda sináptica se llega a una estabilidad en el número de espinas dendríticas, mientras que en diferentes trastornos del neurodesarrollo esta dinámica se altera y la densidad de las espinas se ve disminuida o incrementada. Modificado de (Phillips & Pozzo-Miller, 2015)

Las dendritas son los principales elementos de entrada de información en las neuronas. La compleja morfología del árbol dendrítico y sus propiedades permiten a las neuronas recibir y computar las entradas provenientes de otras células. Por lo tanto, la morfología adecuada de las dendritas es crucial para el correcto funcionamiento de los circuitos sinápticos. La mayoría de las dendritas se forman durante el desarrollo, siguiendo un patrón de lento crecimiento seguido de un período muy rápido de extensión y un largo período de estabilización del árbol dendrítico (Williams & Truman, 2004).

Los procesos de desarrollo y estabilización del árbol dendrítico están regulados por un programa genético intrínseco y por una amplia variedad de señales extracelulares, tanto a nivel de células completas como localmente dentro de las dendritas (Skalecka et al., 2016). La organización del citoesqueleto de actina y microtúbulos es indispensable para la formación de una morfología adecuada de las dendritas y las alteraciones de esta organización dan como resultado defectos en la forma y el tamaño de las dendritas, fenómeno que tiene lugar en la mayoría de los trastornos del neurodesarrollo (Hasegawa & Kuwako, 2022).

Las espinas dendríticas son protuberancias de membrana microscópicas que comprenden el compartimento postsináptico receptivo de la mayoría de sinapsis excitatorias en el cerebro (Guillery, 2000). Las espinas contienen receptores, moléculas de señalización, así como canales iónicos y otras proteínas que participan en la transmisión y la plasticidad sináptica dependiente de la actividad neuronal (Sala & Segal, 2014). Las dendritas de una sola neurona pueden contener de cientos a miles de espinas. Temprano en el desarrollo se producen sinapsis en cantidades que exceden las presentes en el cerebro adulto, pero luego experimentan una estabilización y eliminación selectiva dependiente de la actividad, conocida como poda sináptica (Huttenlocher, 1979; Petanjek et al., 2011). Las espinas sufren cambios constantes y modificaciones morfológicas que dependen de los estímulos, el entorno y la ubicación, capacidades que son clave para la plasticidad sináptica (Fiala et al., 2002; Sala & Segal, 2014).

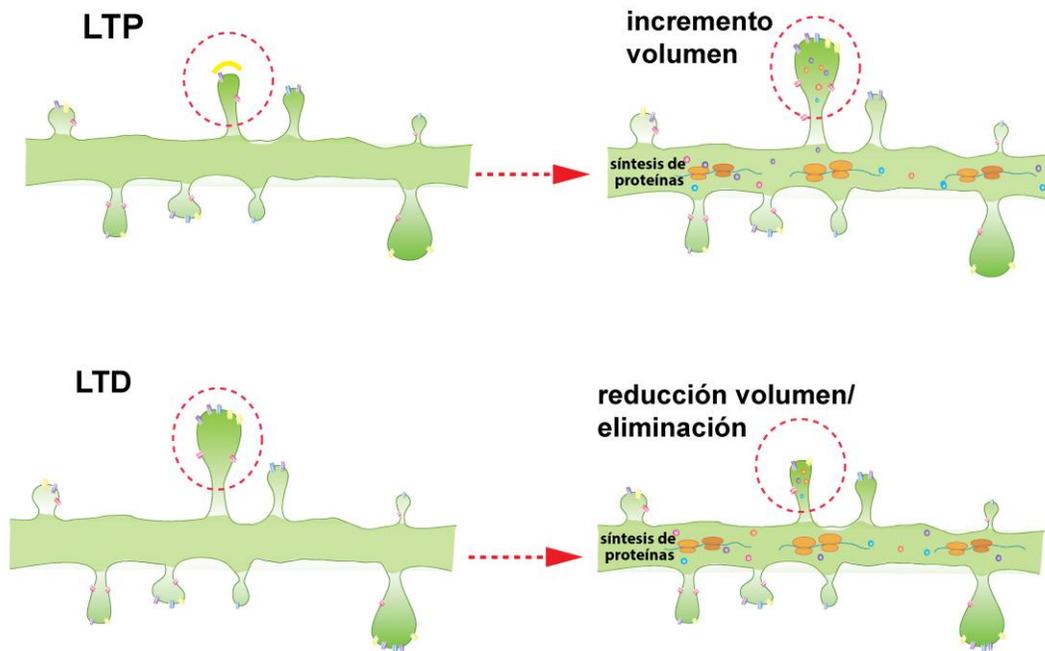
La morfología, el número y la densidad de las espinas son factores cruciales que determinan la fuerza y la estabilidad de la transmisión sináptica (Sabatini & Svoboda, 2000; Segev & London, 2000). La morfología de las espinas dendríticas es muy variable y se presentan en una amplia variedad de formas y tamaños, normalmente entre 0.5 y 2 micras de diámetro (Harris & Kater, 1994). Según su morfología, las espinas dendríticas se han clasificado en delgadas, rechonchas (“stubby”) y en forma de hongo, entre otras (Chang & Greenough, 1984). Esta clasificación depende de la relación entre el diámetro de la cabeza y el cuello (Fig. 3). Por ejemplo, las espinas tipo hongo tienen una cabeza grande y un cuello estrecho, las espinas rechonchas no tienen una constricción clara entre su cabeza y la dendrita, y las espinas delgadas tienen una cabeza más pequeña y un cuello estrecho (Nimchinsky et al., 2002). Las espinas “stubby” y hongo son estables, persisten durante largos períodos de tiempo y forman fuertes sinapsis excitadoras (Kasai et al., 2003; Trachtenberg et al., 2002), mientras que las espinas delgadas son muy móviles, inestables y, a menudo, de corta duración; representando sinapsis débiles o silenciosas (Rochefort & Konnerth, 2012). Existe una rápida plasticidad morfológica de las espinas, que plantea la posibilidad de que las categorías de espinas, en lugar de ser poblaciones de espinas intrínsecamente diferentes, representen instantes temporales de un único fenómeno dinámico (Parnass et al., 2000).



**Figura 3. Morfología de las espinas dendríticas.** Imágenes de microscopía electrónica donde se observan los diferentes tipos de espinas dendríticas y una reconstrucción tridimensional de una porción de una dendrita, donde se señala en rojo la densidad postsináptica (modificado de (Bourne & Harris, 2008)).

### 1.4.1 Las espinas en la plasticidad sináptica

Las espinas dendríticas tienen un papel importante en la plasticidad sináptica, incluida la potenciación y la depresión a largo plazo, y son consideradas un correlato anatómico de la función sináptica general (Rocheffort & Konnerth, 2012). Durante la plasticidad sináptica el número y la forma de las espinas dendríticas sufren reorganizaciones. La inducción de potenciación a largo plazo (LTP), promueve el agrandamiento de la cabeza de las espinas existentes. La depresión a largo plazo (LTD) da como resultado su contracción y retracción (Chidambaram et al., 2019).



**Figura 4. Potenciación y depresión en espinas dendríticas.** El panel superior ejemplifica una espina dendrítica que recibe un protocolo de LTP lo que promueve que aumente su volumen. En el panel inferior se ejemplifica una espina dendrítica individual que recibe un protocolo de LTD lo que induce una disminución en su volumen. En ambos casos se ejemplifican procesos de largo plazo dependientes de síntesis proteica (Govindarajan et al., 2011; Zhou et al., 2004).

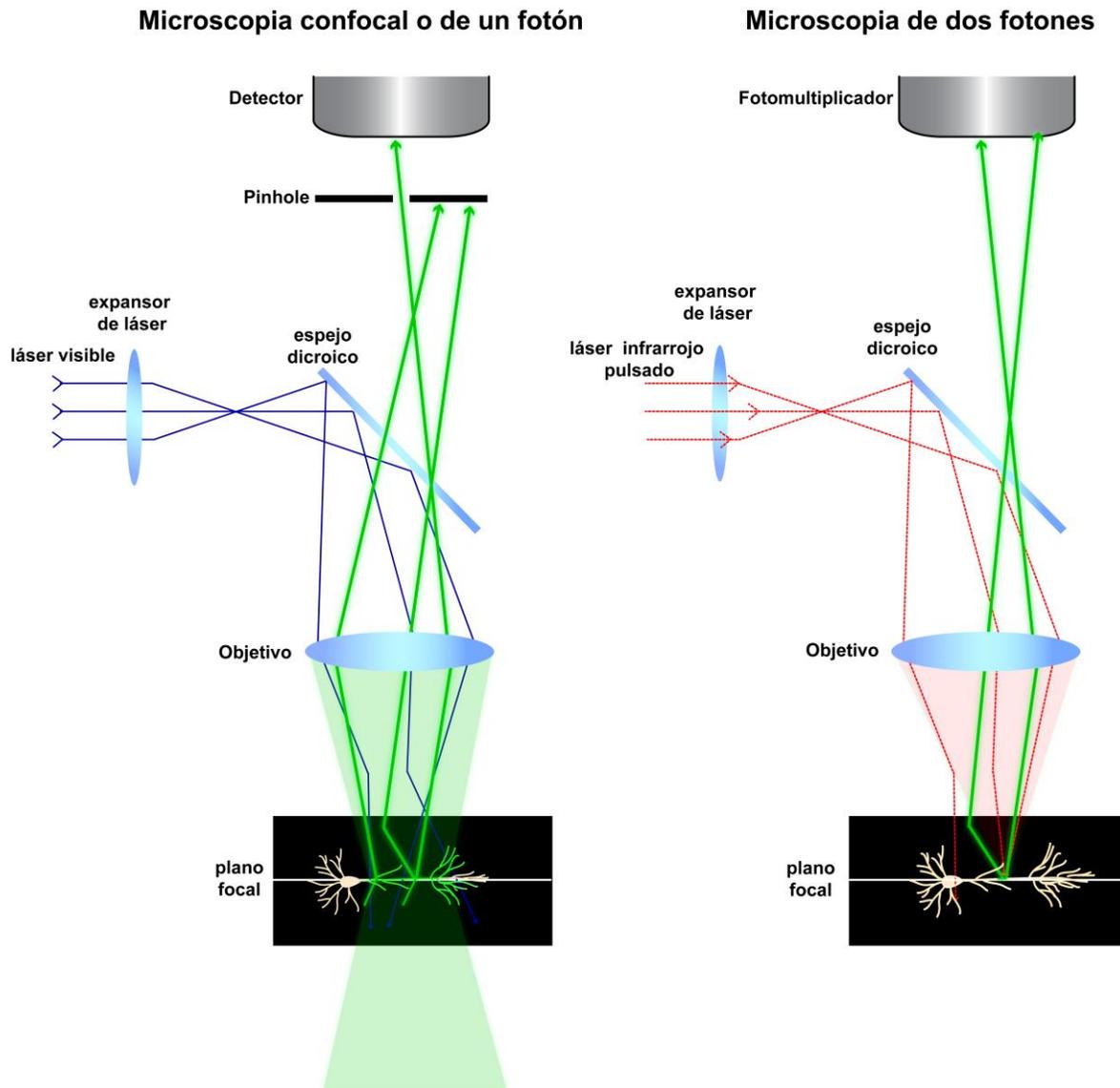
### 1.4.2 Visualizando espinas en neuronas vivas

Para el estudio estructural de dendritas y espinas es necesario hacer visibles las neuronas, y de preferencia mantener las conexiones sinápticas del circuito. Una herramienta que nos

permite establecer estos parámetros es el uso de cultivos organotípicos, los cuales ofrecen la posibilidad de marcar las neuronas con proteínas fluorescentes, y mantienen la organización estructural que es fundamental para comprender la función de la sinapsis en un contexto más natural que los métodos habituales de cultivo de neuronas disociadas, y de esta forma realizar experimentos en neuronas vivas (De Simoni & Yu, 2006).

Por otra parte, para la visualización del árbol dendrítico completo y la cuantificación precisa de las espinas dendríticas, la microscopía de excitación de dos fotones es útil, pues debido a su resolución axial, una penetración profunda a través de preparaciones espesas y opacas ( $\sim 1.2$  mm), y una baja fototoxicidad (Winifried Denk et al., 1990; W. Denk et al., 1990; Theer & Denk, 2006).

El principio de la microscopía de excitación de dos fotones consiste en la absorción de dos fotones simultáneamente en un solo evento, en un periodo de aproximadamente  $10^{-18}$  segundos. Cada fotón tiene la mitad de la energía que se usaría en un microscopio confocal convencional. De esta forma la excitación sólo ocurre en el plano focal, en un volumen de aproximadamente  $1\text{fl}^3$  (Fig. 5). Por esto, la excitación de dos fotones se considera "más eficiente", ya que la fluorescencia sólo se genera en aquellas regiones de la muestra donde se desea detectar y obtener imágenes (Benninger & Piston, 2013).



**Figura 5. Excitación y emisión en la microscopia confocal y de dos fotones.** En la microscopia confocal (izquierda), los fotones de excitación (líneas azules) tienen una mayor probabilidad de dispersarse en la muestra debido a su longitud de onda más corta (luz visible o UV), y a causa de esta dispersión la emisión (líneas verdes) tiene que ser bloqueada para reducir la fluorescencia fuera de foco, esto a través del uso del Pinhole. Sin embargo, la excitación, el fotoblanqueo y el fototoxicidad se producen en gran parte de la muestra. Por el contrario, en la microscopia de excitación de dos fotones, se utiliza un láser infrarrojo pulsado, donde la excitación sólo ocurre en el plano focal, donde los fotones coinciden en espacio y tiempo. Esto hace que no se necesite un Pinhole, pues la fluorescencia fuera de foco es despreciable. Modificado de (Denk & Svoboda, 1997).

Como se mencionó anteriormente, en la microscopia de excitación de dos fotones se utiliza un láser infrarrojo (longitud de onda de larga), contrario a la utilizada en la microscopia confocal (longitud onda corta), lo cual ópticamente debería reducir la

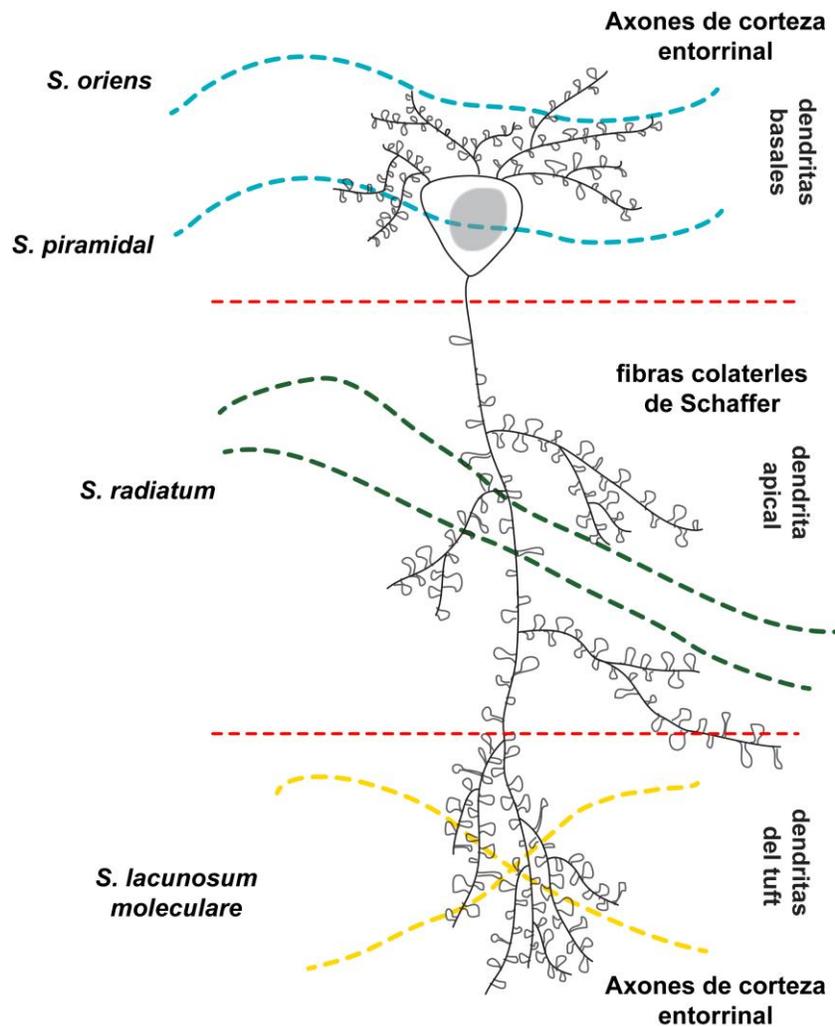
resolución, sin embargo, esto no resulta cierto. Pues esta aseveración se basa en una comparación con un hipotético microscopio confocal perfecto que tiene un “pinhole” infinitamente pequeño. A medida que se abre el pinhole, la resolución de un microscopio confocal disminuye (Centonze & White, 1998). En la práctica, la resolución efectiva lograda es resultado de muchos factores, entre ellos el número absoluto de fotones recolectados por píxel y la fracción de fotones colectados en relación con fotones dispersos (Zipfel et al., 2003).

Por otra parte, en la microscopía de excitación de dos fotones, la resolución espacial no es mejor que en la microscopía confocal. Sin embargo, la dispersión del punto de iluminación es considerablemente menor iluminación (Illumination Point Spread Function, en inglés, IPSF), esta función describe la intensidad en todas partes del espacio cerca del plano focal, y en microscopía de dos fotones define la verdadera resolución óptica (Sheppard & Gu, 1990). Esto genera que en la microscopía de excitación de dos fotones se pueda resolver ópticamente dos objetos que están muy cercanos en el espacio, como las espinas dendríticas, de esta forma se pueden realizar cuantificaciones precisas de la densidad de las espinas (Rubart, 2004).

### **1.5 Alteraciones en el hipocampo del BTBR**

En roedores, el hipocampo es una estructura rostro-caudal, constituida por dos regiones interconectadas, el Cuerno de Amón (CA) y el Giro Dentado (GD). El cuerno de Amón se subdivide en tres regiones: CA1, CA2 y CA3. El CA se subdivide en los estratos: *Oriens*, *Piramidal*, *Radiatum* y *Lacunosum moleculare* (Andersen, 2007). El hipocampo está compuesto principalmente por células de proyección denominadas neuronas piramidales, las cuales se encuentran ubicadas en la capa piramidal y granular (Kandel, 2013). Estas células utilizan el glutamato como principal neurotransmisor y cuentan con un árbol dendrítico que se divide en tres secciones o capas. Cada una de estas secciones recibe innervaciones de diferentes áreas, *Stratum oriens* y *Stratum pyramidale* (dendritas

basales), *Stratum radiatum* (dendritas apicales) y *Stratum lacunosum moleculare* (dendritas del “tuft”) (Fig. 6) (Hammond, 2015).



**Figura 6. Esquema de una neurona piramidal de CA1.** Se ejemplifica la disposición de una neurona piramidal en el área CA1, mostrando las tres capas (basales, apicales y del “tuft”) que reciben innervación de diferentes áreas.

La capa neuronal del hipocampo de ratones neonatos BTBR no está reducida en tamaño ni presenta menor densidad celular respecto a sus controles; pero se reportó que las neuronas piramidales de CA1 poseían una mayor longitud dendrítica, así como una mayor complejidad en su arborización, según los análisis de Sholl en preparaciones de Golgi-Cox (Cheng et al., 2017). Mientras que en el hipocampo de BTBR adultos se reportó una reducción de ésta misma capa de células en el hilus y el giro dentado (Stephenson et al., 2011). Así mismo, se encontró que CA2 está reducida en los ratones adultos BTBR y que

sus neuronas piramidales poseen una menor densidad de espinas dendríticas (Cope et al., 2022).

En cerebros de niños diagnosticados con TEA se encontró una reducción de la arborización dendrítica en CA1 (Raymond et al., 1996). Y un estudio reciente encontró menor arborización de las neuronas piramidales en CA1 de ratones tipo autista C58 (Barón-Mendoza et al., 2019). Además de encontrar una menor densidad de espinas maduras en esta misma área (Barón-Mendoza et al., 2021). Estas evidencias reafirman la importancia del estudio de éstas neuronas en el TEA.

## **2. Hipótesis**

La arborización y la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo de ratones BTBR T<sup>+</sup>Itpr3<sup>tf</sup> /J serán diferentes a las presentes en ratones control (C57BL/6J).

## **3. Objetivo general**

Analizar la morfología de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratones BTBR y controles (C57BL6/J).

### **3.1 Objetivos específicos**

- i. Obtener imágenes con microscopia de dos fotones de neuronas piramidales de CA1 de ratones BTBR y C57BL/6J, a partir de cultivos organotípicos de hipocampo transfectados con la proteína fluorescente verde (GFP).
- ii. Realizar el trazado de los árboles dendríticos de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo de ambas cepas.
- iii. Cuantificar y clasificar las poblaciones de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA1.

#### 4. Metodología

**Animales.** Se utilizaron ratones BTBR T<sup>+</sup> Itpr3<sup>tf</sup>/J (BTBR) (Jackson Laboratory, cepa no. 002282) ratones BTBR y C57/BL6J (controles, Jackson Laboratory, cepa no. 000664). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (protocolo no. YRC94-16).

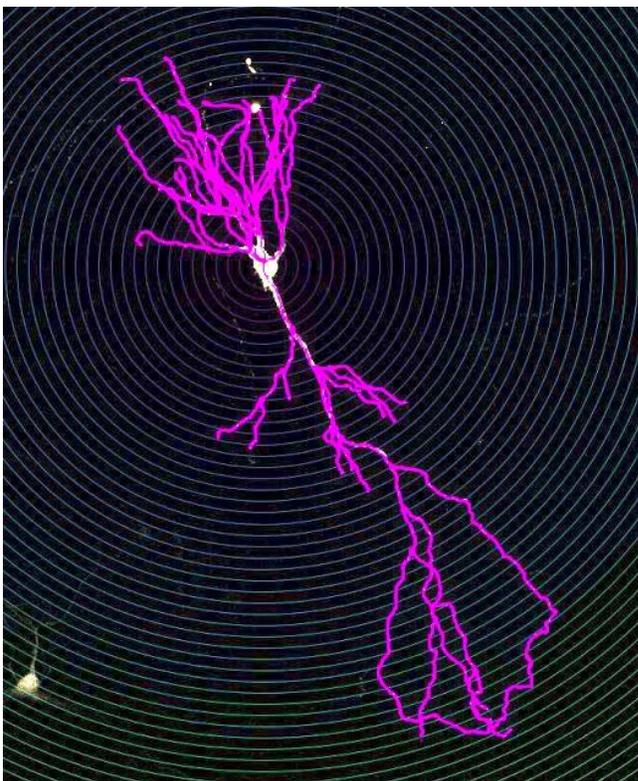
**Cultivos organotípicos.** Se obtuvieron rebanadas transversales de 350µm de grosor del hipocampo de ratones postnatales de 7 a 10 días de ambas cepas. Se mantuvieron en medio de cultivo MEM 1X (Invitrogen) suplementado con suero de caballo inactivado 20%, GlutaMAX 1mM (Invitrogen), D-glucosa 27 mM, HEPES 30 mM, NaHCO<sub>3</sub> 6 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, ácido ascórbico 25% e insulina 10 mg/ml, pH 7.3 y una osmolaridad de 300-310 mOsm (Govindarajan et al., 2011). Los cultivos se conservaron a 37 °C en una atmósfera saturada de vapor de agua con O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5% de 8 a 12 días, cambiando el medio cada dos días (Perera-Murcia, 2019).

**Transfección balística.** Los cultivos organotípicos se transfectaron usando el método balístico Helios *gene gun* (Bio-Rad). Para este método, se utilizan partículas de oro de 1.6µm de diámetro (Bio-Rad) cubiertas con ADN plasmídico (100 µg) de la proteína verde fluorescente (GFP). Estas partículas de oro cubiertas de ADN (bullets) son introducidas directamente a la rebanada utilizando helio a una presión de 180-200 PSI. La transfección se realizó después de 3-5 días in vitro, las adquisiciones de imágenes son realizadas de 2-4 días posteriores.

**Microscopía de excitación de dos fotones.** Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de excitación de dos fotones (Zeiss LSM-710), usando un láser infrarrojo de Ti:Sapphire, Coherent Ultrall controlado por el software de Zen black (Zeiss). Las rebanadas fueron perfundidas con líquido cerebrospinal artificial (ACSF) oxigenado, que contenía NaCl 127mM, KCl 2.5mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25mM, D-glucosa 25mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM y MgCl<sub>2</sub> 1mM (equilibrado con O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5%) a temperatura ambiente y un rango de perfusión de 1.5 ml/min. Para adquirir la imagen completa de las neuronas con todas sus

dendritas se usó un objetivo de inmersión en agua (C-Apochromat 10x, 1.0 NA). Las imágenes de dendritas secundarias o terciarias de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo se obtuvieron usando un objetivo de inmersión en agua (W-Apochromat 40x, 1.0 NA, Zeiss). Se adquirieron todos los planos en los que se observaba parte de las dendritas, alrededor de 30 planos por neurona, con un intervalo de 1 micra entre plano.

**Análisis morfométricos.** La medición de ancho y largo del soma se llevó a cabo utilizando el software de Zeiss Zen. Las imágenes de las neuronas junto con todas sus dendritas fueron analizadas utilizando el plugin de ImageJ *Simple Neurite Tracer*. Se trazó las dendritas de cada una de las neuronas a través de todos los niveles del plano z capturados. A partir de estos trazos se obtuvieron las longitudes de las dendritas de las neuronas; además de llevar a cabo el análisis de Sholl. Para el análisis de Sholl el programa crea una serie de capas concéntricas, esferas, alrededor del foco de un árbol neuronal y cuenta cuántas veces los vóxeles conectados que definen el árbol se cruzan con las esferas (Fig. 7). Se llevó a cabo el análisis considerando a todas las dendritas, a las basales y a las apicales y del tuft; consiguiendo tres diferentes perfiles de Sholl para cada neurona.



**Figura 7. Ejemplificación del análisis de Sholl.** Se muestra en morado el trazado de las dendritas sobre la imagen original de la microscopía de dos fotones de la neurona en blanco. Los círculos parten del soma distanciados por el radio indicado ( $0.5 \mu\text{m}$ ).

Para el conteo de espinas dendríticas y su clasificación se utilizó el plugin *Dendritic Spine Counter* de ImageJ. El plugin permite trazar segmentos dendríticos y marcar en éstos de manera manual cada una de las espinas presentes. Posteriormente se clasificaron una por una de forma manual. El plugin entrega un reporte del número de espinas encontradas y su clasificación; así como la densidad de cada uno, dividiendo el número de espinas por la longitud en micrómetros del segmento dendrítico analizado.

**Análisis estadísticos.** Los datos fueron agrupados para cada grupo y se calculó la media para cada distribución de datos; además se sometieron a pruebas de normalidad Shapiro-Wilk y D'Agostino & Pearson. Para el caso de las distribuciones que pasaron las pruebas de normalidad se hicieron pruebas "t" no pareadas de dos colas, con un valor de significancia de  $p < 0.05$ . Mientras que para aquellas distribuciones de datos que no presentaron una distribución normal se efectuaron pruebas de Mann Whitney.

## 5. Resultados

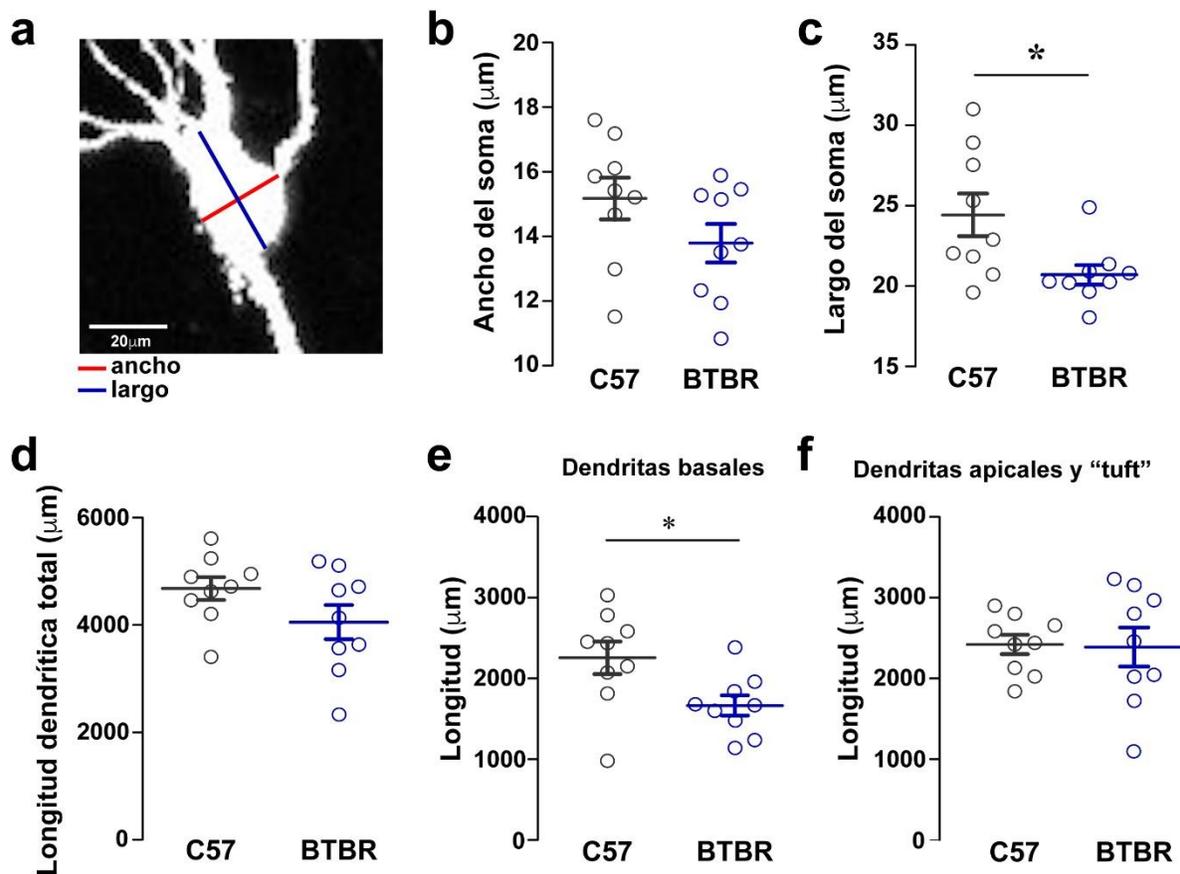
### 5.1 Las neuronas de ratones BTBR poseen una menor cantidad de dendritas basales

Con el fin de evaluar la morfología completa de las neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo de los cultivos organotípicos, se adquirieron imágenes usando el microscopio de dos fotones (LSM710 Zeiss). Las proyecciones dendríticas de cada neurona se capturaron en su totalidad, adquiriendo cada  $1\mu\text{m}$  para cubrir las neuronas completas ( $\sim 70\text{-}180\mu\text{m}$ ).

De las imágenes obtenidas para cada grupo de cultivos ( $n=9$  neuronas por cada grupo, C57 y BTBR) se midió el ancho y largo del soma para cada una de ellas (Fig. 8a). No se hallaron diferencias en las medidas del ancho de soma de las neuronas comparando entre las neuronas BTBR y las C57 (C57= $15.42\mu\text{m} \pm 0.6425$ , BTBR= $13.76\mu\text{m} \pm 0.5960$ ) (Fig. 8b). Pero sí se encontró que el largo del soma de las neuronas provenientes de ratones BTBR es

menor en comparación a los somas de los ratones C57 (C57=24.43  $\mu\text{m} \pm 1.321$ , BTBR=20.70  $\mu\text{m} \pm 0.6086$ ) (Fig. 8c).

Posteriormente se trazó a cada una de las dendritas de las neuronas, usando el plugin de *ImageJ*, *Simple Neurite Tracer* (véanse métodos). De los trazos obtenidos se obtuvo la medida de la longitud de las dendritas. La suma de la longitud de todas las dendritas, sin importar el estrato al que pertenecieran, es decir, la longitud dendrítica total, no difirió entre las neuronas de ambos fenotipos (C57= 4,716  $\mu\text{m} \pm 211.2$ , BTBR= 4,137  $\mu\text{m} \pm 393.3$ ) (Fig.8d). Si separamos a las dendritas entre aquellas pertenecientes al estrato *oriens* (basales) y aquellas de los estratos *radiatum* y *lacunosum moleculare* (apicales y del “tuft”) podemos obtener la longitud de estas dendritas por separado. La longitud de las dendritas basales de ratones BTBR resultó menor en comparación con las de los C57 (C57=2,439  $\mu\text{m} \pm 201.4$ , BTBR=1,675  $\mu\text{m} \pm 129.1$ .  $p=0.0259<0.05$ , prueba t no pareada. Fig. 8e); mas no para las dendritas apicales y del “tuft” (C57= 2,423  $\mu\text{m} \pm 119.9$ , BTBR=2,389  $\mu\text{m} \pm 240.8$ . Fig. 8f).

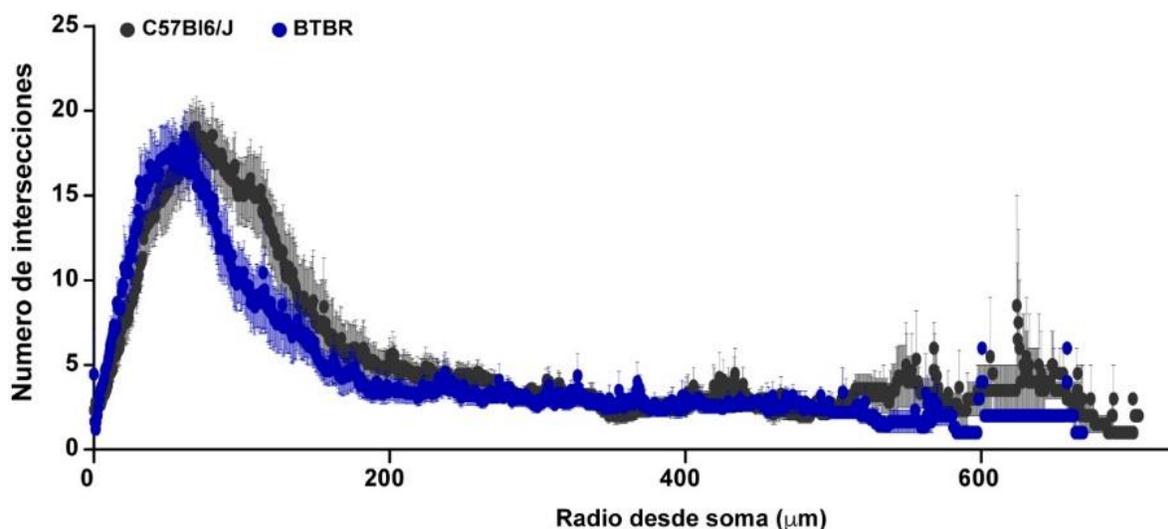


**Figura 8.** Las neuronas de la cepa BTBR presentan disminución en el largo de sus somas y en la longitud de sus dendritas basales. **a)** Esquema representativo de la medición del ancho y largo del soma de las neuronas. **b)** Cuantificación del ancho del soma. **c)** Cuantificación del largo del soma.  $p=0.0208$ , prueba T no pareada). **d)** Cuantificación de la longitud total de las dendritas de cada neurona. (C57=  $4,716 \mu\text{m} \pm 211.2$ , BTBR= $4,137 \mu\text{m} \pm 393.3$ ). **e)** Cuantificación de la longitud de dendritas basales (C57= $2,439 \mu\text{m} \pm 201.4$ , BTBR= $1,675 \mu\text{m} \pm 129.1$ .  $p<0.05$ , prueba t no pareada). **f)** Cuantificación de la longitud de dendritas apicales y "tuft", C57=  $2,423 \mu\text{m} \pm 119.9$ , BTBR= $2,389 \mu\text{m} \pm 240.8$ .  $n=9$  neuronas para cada grupo en todas las mediciones. Las líneas horizontales en las gráficas representan las medias  $\pm$  E.S., \*  $p<0.05$ .

## 5.2 La arborización de las dendritas de neuronas BTBR es menos compleja que las de los controles (C57Bl6/J)

A partir de los trazos de las dendritas se llevó a cabo un análisis de Sholl de todas las dendritas de cada neurona, tomando el centro del soma como el origen de los radios, separados  $0.5 \mu\text{m}$  (ver métodos). Se obtuvieron dos perfiles de intersección claramente diferenciados en la cercanía al soma (Fig. 9). El número de intersecciones obtenido para las

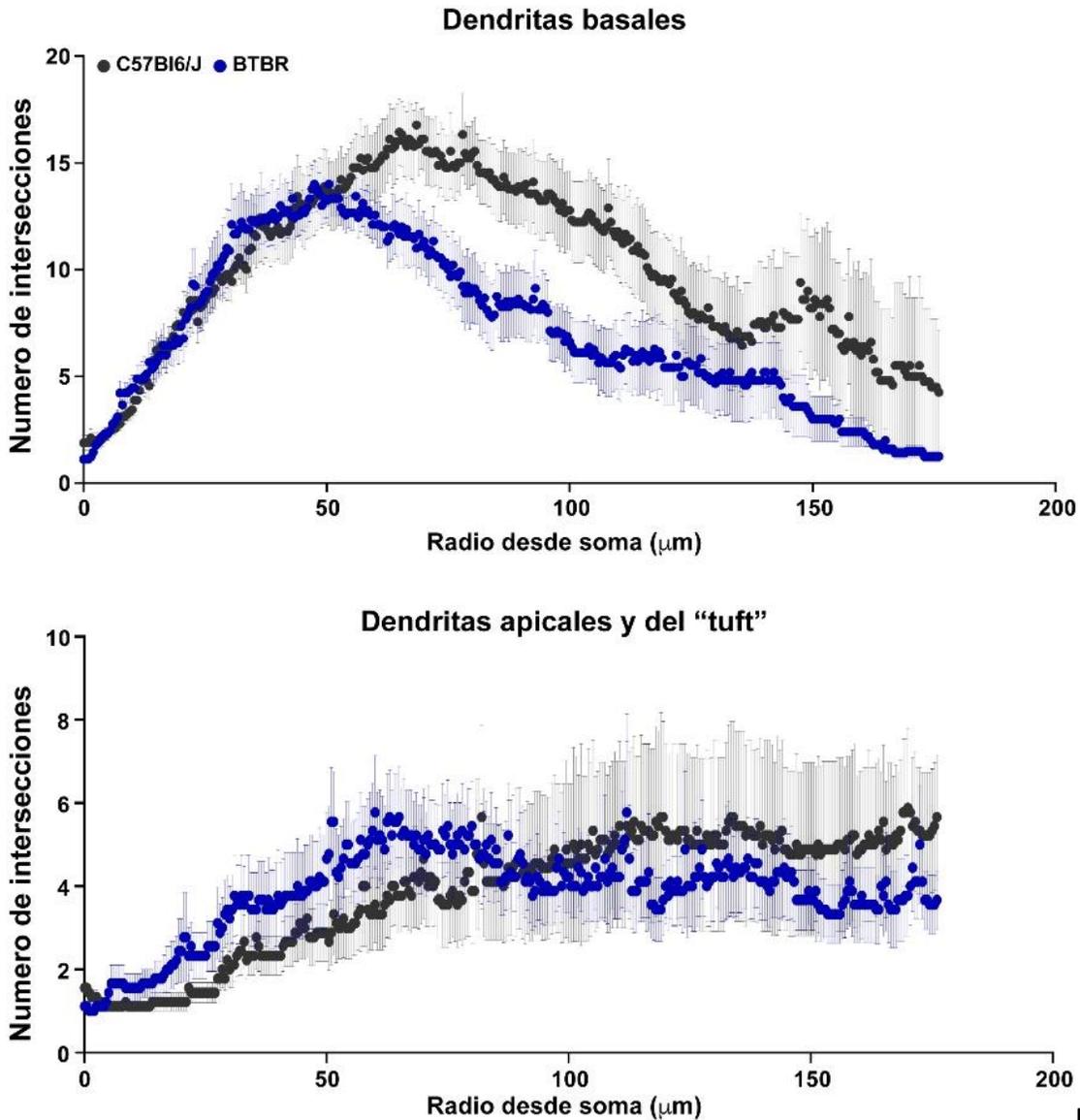
neuronas BTBR presentó una curva con un descenso más pronunciado en el número de intersecciones tras el pico máximo. Sin embargo, no existe una diferencia significativa entre los puntos máximos de ambas curvas (Fig. 11b).



**Figura 9. Perfil de Sholl diferenciado entre las neuronas C57 y BTBR.** Se muestra el valor promedio  $\pm$  S.E. del número de intersecciones de dendritas con respecto a la distancia desde el soma ( $n=9$ , neuronas de cada grupo).

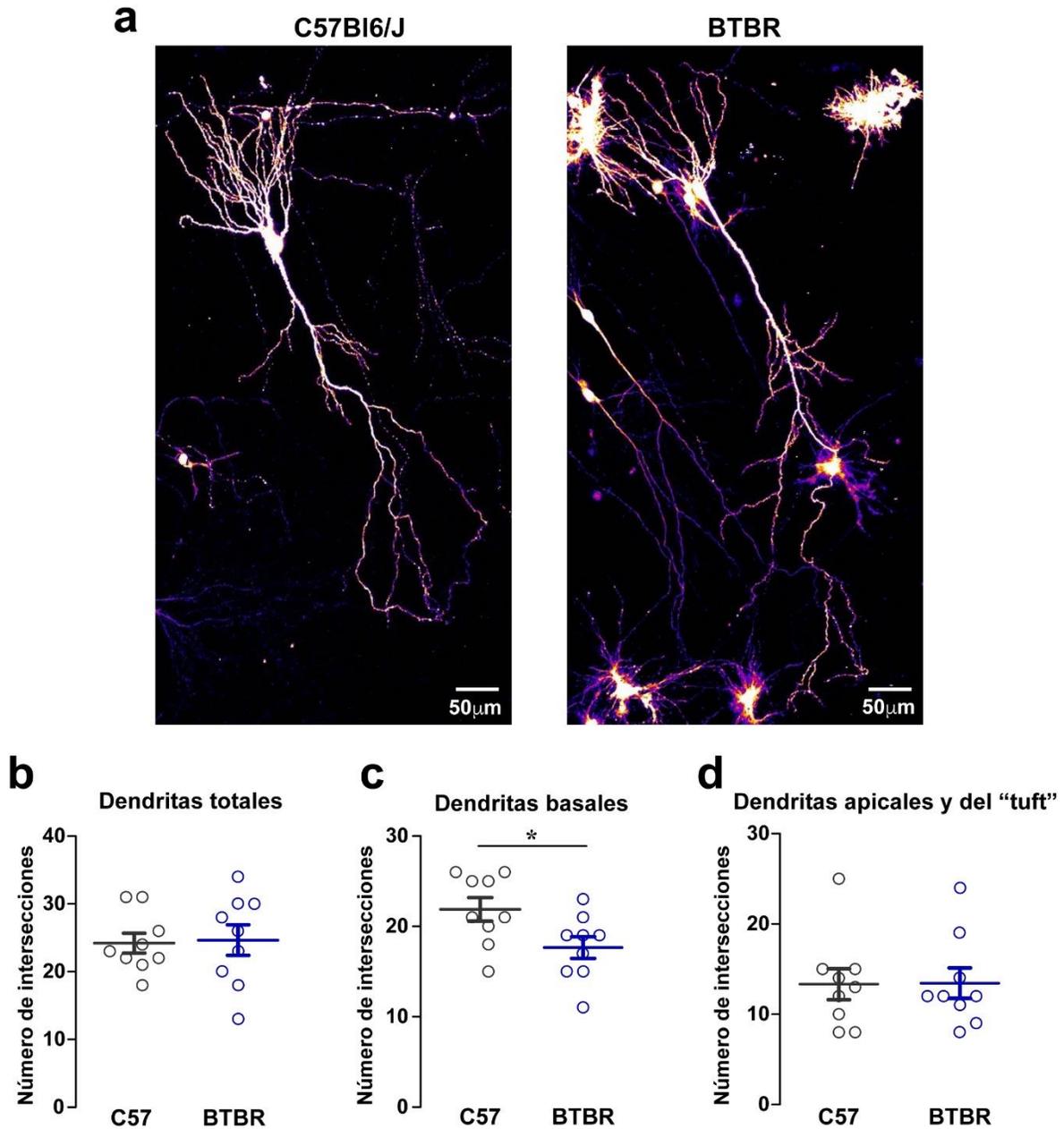
Sin embargo, analizando las dendritas de acuerdo con sus estratos, observamos que las dendritas basales de las neuronas de los ratones BTBR muestran un menor número de intersecciones respecto a los ratones control (Fig. 10, Fig. 11c) ( $C57=21.89 \pm 1.296$ ,  $BTBR=18.00 \pm 1.291$ ). Respecto a dendritas apicales y del tuft, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas de ratones (Fig. 10, Fig. 11d).

En suma, estos resultados demuestran que las neuronas de ratones BTBR presentan menores arborizaciones en las dendritas basales. Mientras que los datos del número de intersecciones respecto a la distancia, pareciera haber una diferencia por separado en los estratos piramidal y del “tuft” (Fig. 10). Al respecto, valdría la pena incrementar en número de experimentos para verificar si este dato es significativo.



Figura

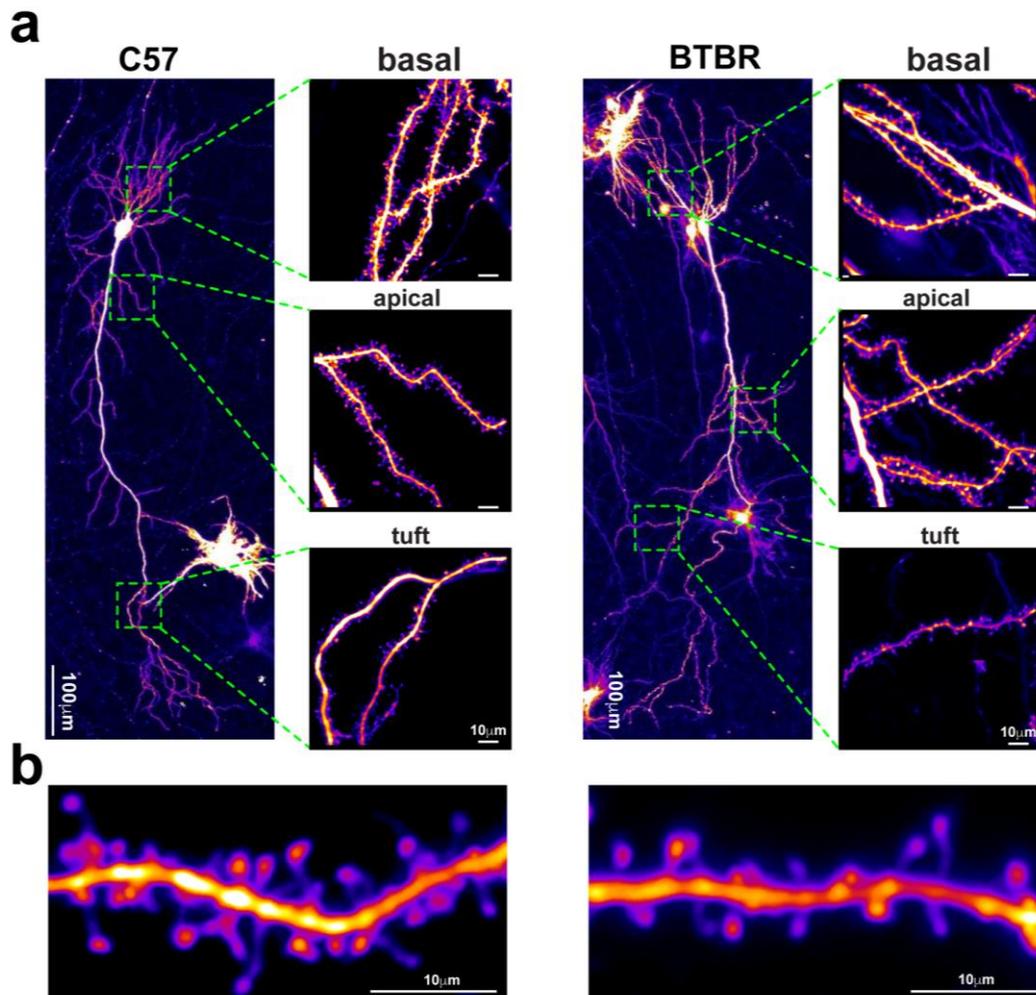
10. **Perfiles de Sholl de las dendritas basales y apicales y del "tuft"**. Perfil de Sholl promedio  $\pm$  S.E. (n=9 neuronas de cada grupo) para los grupos de neuronas de ambos fenotipos. El perfil obtenido de las dendritas basales (superior) para las neuronas de los ratones BTBR (azul) presenta un menor número de intersecciones en comparación al de los ratones C57 (negro). En el caso de las dendritas apicales y del "tuft" (inferior) ambos perfiles están claramente diferenciados; con máximos de intersecciones en distintos radios desde el soma (análisis con centro de radio desde el soma de las neuronas y distancia entre radios de 0.5 micras).



**Figura 11. Las neuronas de los ratones BTBR presentan una arborización dendrítica menor en su estrato basal. a)** Proyección en Z de neuronas piramidales representativas de CA1 positivas a GFP para ratones C57 y BTBR. **b)** Cuantificación del número máximo de intersecciones en el análisis de Sholl de las dendritas totales. **c)** Cuantificación del número máximo de intersecciones en las dendritas basales, \*  $p < 0.05$ . **d)** Cuantificación del número máximo de intersecciones en las dendritas apicales y del "tuft". Prueba t no pareada de dos colas.

### 5.3 Las neuronas de ratones BTBR presentan menor densidad de espinas dendríticas en CA1 del hipocampo.

Para el análisis de densidad de espinas dendríticas, se obtuvieron imágenes con microscopía de dos fotones de rebanadas vivas de cultivos organotípicos de hipocampo. Se adquirieron proyecciones en Z de dendritas secundarias y terciarias en los tres diferentes estratos dendríticos de neuronas CA1 (Fig. 12). Posterior a la adquisición, se utilizó el plugin *Dendritic spine counter* de *ImageJ*(métodos), de acuerdo con este análisis encontramos una menor densidad de espinas en las dendritas de los tres estratos (basal, apical y del “tuft”) de ratones BTBR (Fig. 13).



**Figura 12. Dendritas y espinas dendríticas de ratones BTBR. a)** Se muestra la morfología completa de neuronas piramidales de CA1 para ambas cepas, y un acercamiento a las dendritas de cada uno de los estratos (basal, apical y “tuft”). **b)** Segmentos dendríticos apicales de un ratón C57 (izquierda) y un BTBR (derecha).

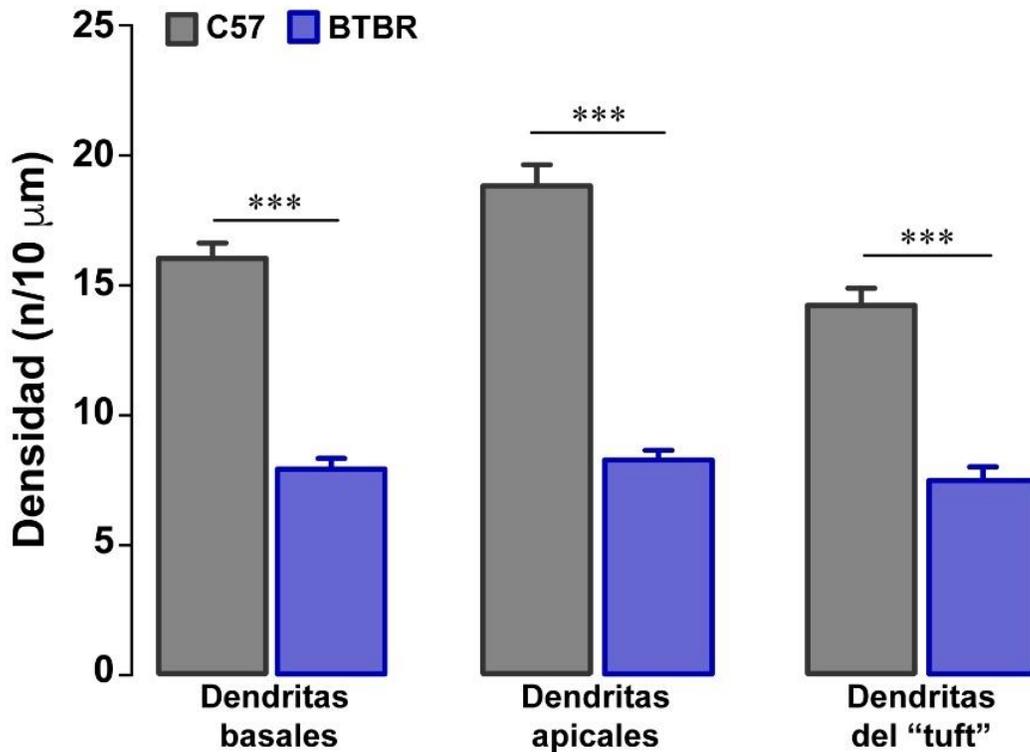
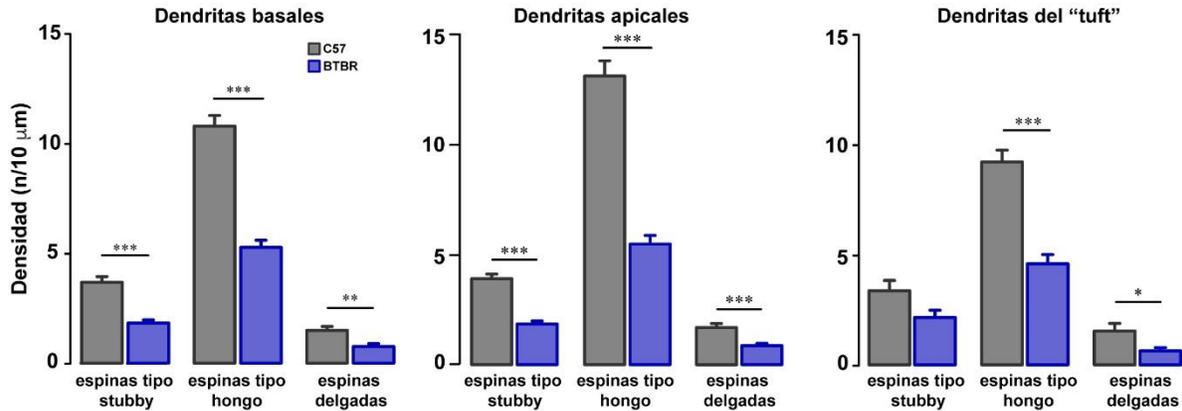


Figura 13. La densidad de espinas en los tres estratos de dendritas es menor en ratones BTBR. Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas en los tres diferentes estratos: basal, apical y "tuft". (\*\*\*) $p < 0.0001$ , prueba t no pareada. Barras representan la media  $\pm$  S.E.)

Un análisis más detallado, separando las poblaciones de espinas entre el tipo "stubby", hongo y delgadas, permitió reconocer a qué subtipo de espinas correspondía la reducción encontrada. Resultó que los tres tipos de espinas se encontraron en menor densidad dentro de las dendritas de los tres estratos de las neuronas piramidales de CA1 de ratones BTBR (Fig. 14), exceptuando a las espinas tipo "stubby" de las dendritas del "tuft". Estas últimas siguen una tendencia a la baja, sin resultar estadísticamente diferente.



**Figura 14. Las neuronas de ratones BTBR tienen menor densidad de espinas dendríticas independiente del tipo de espina.** En las dendritas basales: espinas tipo stubby ( $p < 0.0001$ , prueba t no pareada. C57=  $3.711 \pm 0.2513$  N=9 neuronas, 26 dendritas; BTBR=  $1.853 \pm 0.1450$  N=9 neuronas, 15 dendritas.); tipo hongo ( $p < 0.0001$ , prueba t no pareada. C57=  $10.81 \pm 0.4913$  N=9 neuronas, 26 dendritas; BTBR=  $5.291 \pm 0.3309$  N=9 neuronas, 15 dendritas); delgadas ( $p = 0.0058$ , prueba t no pareada. C57=  $1.522 \pm 0.1754$  N=9 neuronas, 26 dendritas; BTBR=  $0.7862 \pm 0.1308$  N=9 neuronas, 15 dendritas). En las dendritas apicales: espinas tipo stubby ( $p < 0.0001$ , prueba Mann Whitney. C57=  $3.932 \pm 0.2122$  N=9 neuronas, 24 dendritas; BTBR=  $1.881 \pm 0.1394$  N=9 neuronas, 15 dendritas); tipo hongo ( $p < 0.0001$ , prueba Mann Whitney. C57=  $13.11 \pm 0.6924$ ; BTBR=  $5.497 \pm 0.3979$ ) y delgadas ( $p = 0.0002$ , prueba Mann Whitney. C57=  $1.776 \pm 0.1866$ ; BTBR=  $0.9012 \pm 0.1044$ ). En las dendritas del "tuft": tipo hongo ( $p < 0.0001$ , prueba t no pareada. C57=  $9.244 \pm 0.5331$  N=10 dendritas; BTBR=  $4.620 \pm 0.4267$  N=10 dendritas) y delgadas ( $p = 0.0273$ , prueba t no pareada. C57=  $0.1577 \pm 0.03457$  N=10; BTBR=  $0.06775 \pm 0.01442$  N=10).

La menor densidad de espinas hallada en las dendritas de las neuronas piramidales de CA1 en ratones BTBR representa una clara alteración en la morfología de estas neuronas. La cual implica una reducción en los contactos sinápticos establecidos entre estas neuronas, y una posible alteración de su comunicación sináptica.

## 6. Discusión

La alta incidencia del TEA y el conocimiento limitado sobre su etiología demanda estudios que investiguen sobre la neurobiología de este trastorno del neurodesarrollo. El 85% del TEA a nivel global es idiopático, la cepa BTBR ha sido tomada como modelo idiopático del TEA, utilizada actualmente por múltiples grupos de investigación como modelo de estudio (Chadman & Guariglia, 2012). A la fecha se han descrito y reportado las diferentes alteraciones encontradas en este modelo relacionadas con el neurodesarrollo.

Desde su clara agenesia del cuerpo caloso (Wahlsten et al., 2003), hasta los detalles moleculares de sus células nerviosas, como la reducción de las fractonas de heparán sulfato involucradas en la formación de espinas dendríticas (Mercier et al., 2012).

El análisis de la arborización dendrítica de las neuronas piramidales de CA1 efectuado por (Cheng et al., 2017), reportó una mayor longitud en todos los segmentos de dendritas en neuronas de ratones BTBR en el día postnatal ocho. Opuesto a esto, el trabajo aquí expuesto no encontró diferencias en la longitud de las dendritas apicales y del tuft (Fig. 8f), pero sí una menor longitud en las dendritas basales (Fig. 8e). Pero debemos señalar que la longitud de las dendritas reportada por Cheng y col. (2017) es mucho menor no solo en ratones BTBR, sino además sus controles C57.

Además, obtuvieron perfiles de Sholl con un número de intersecciones mucho más bajo que los aquí reportados, de aproximadamente 10 veces menos, de nuevo en ratones BTBR y controles. Esto podría deberse a la técnica empleada, pues utilizaron microscopía de campo claro en preparaciones de Golgi-Cox; la cual no posee suficiente resolución axial en comparación a la microscopía de doble fotón aquí empleada. El marcaje de las células utilizando transfección balística con un reportero fluorescente, en combinación con la penetrancia (mayor a 1.2mm) y seccionamiento axial (de 1 $\mu$ m), que permite el microscopio de 2 fotones, dan como resultado imágenes con mayor número de planos. Lo que se traduce en una imagen más completa y fiel de las dendritas que se extienden a lo largo de diferentes planos en z.

La menor complejidad encontrada en el árbol dendrítico basal de las neuronas de ratones BTBR, dada su menor longitud (Fig. 8e) y menor número de ramificaciones (Figs. 10 y 11c) parece apuntar a que en estos ratones la capacidad receptiva de entradas sinápticas se encuentra reducida. Siendo las dendritas basales una de las zonas de contacto de los axones provenientes desde la corteza entorrinal y de las neuronas de CA2 (Piskorowski & Chevaleyre, 2012), al presentarse un menor número de dendritas basales en el ratón BTBR, las entradas que reciben estas neuronas desde las áreas señaladas se ven también disminuidas.

El perfil de Sholl obtenido para las dendritas apicales y del tuft (Fig.10), notamos que en el segmento inicial, que corresponde a las dendritas apicales que reciben entradas de CA3 a través de las colaterales de Shaffer (Fig. 6), mostró que las neuronas de BTBR presentan un mayor número de intersecciones. Esto implica que en el BTBR las dendritas apicales parecieran estar más ramificadas, lo cual se traduce en un campo receptivo mayor a las entradas de las colaterales de Schaffer. Mientras que para las dendritas del tuft, en el segmento distal del perfil de Sholl (Fig.10), el número de intersecciones se observa menor en ratones BTBR. Las dendritas del tuft reciben entradas provenientes de la corteza entorrinal a través de la vía perforante (Spruston, 2008) (Fig. 6), al igual que las dendritas basales. Esto podría implicar que en el ratón BTBR las entradas provenientes de la corteza entorrinal se encuentran disminuidas. Sin embargo, será necesario incrementar el tamaño de la muestra, y detallar los análisis de Sholl para ver si se encuentra una diferencia significativa en las dendritas apicales y del “tuft”.

En el conteo total de espinas se encontró una menor densidad de espinas en las dendritas de los tres estratos de las neuronas piramidales de ratones BTBR (Fig. 13). Cope y colegas (2022), reportaron reducida la densidad de espinas en las neuronas piramidales de CA2 en hipocampos de BTBRs adultos (3 meses de edad).

La densidad reducida no se limita a un solo estrato o a un tipo específico de espina (Fig. 14). Es importante recalcar esto, ya que implica una menor cantidad de contactos sinápticos establecidos en las neuronas de estos ratones. Lo que podría implicar una comunicación sináptica alterada.

La menor arborización observada en las dendritas basales, y posiblemente la de las dendritas del tuft sugiere que las neuronas de CA1 recibían menor número de entradas sinápticas en los BTBR. El análisis de la densidad de espinas soporta esta conclusión. Sin embargo, se requieren experimentos electrofisiológicos que nos proporcionen más información acerca de la comunicación sináptica entre estas neuronas. Como registros de *patch clamp* donde se registre a las neuronas piramidales de CA1 a la vez que se estimula a sus entradas sinápticas

## **7. Conclusiones**

Los resultados obtenidos se suman a las alteraciones previamente descritas en este modelo idiopático de TEA. Más allá de lo reportado a través de la observación de las características macroscópicas de ratones BTBR, el trabajo aquí presentado permitió describir las características de este modelo a nivel microscópico. Particularmente de las neuronas piramidales de CA1, neuronas ampliamente estudiadas y utilizadas en experimentación de procesos de plasticidad sináptica.

Estos hallazgos probaron que a nivel celular la morfología de los ratones BTBR se encuentra alterada. A saber, presenta dendritas basales de menor longitud y arborización en comparación con las de ratones control C57.

Además de esto, la marcada diferencia en la densidad de las espinas dendríticas, donde los BTBR poseen menos espinas, implica una menor cantidad de contactos sinápticos establecidos.

En conjunto, estos hallazgos parecen apuntar hacia una alteración en la comunicación sináptica entre las neuronas de CA1. Se requiere de estudios electrofisiológicos que corroboren esto. El análisis de la respuesta sináptica en espinas individuales, mediante la microscopía de dos fotones y la liberación de glutamato enjaulado, arrojará más información que permita ahondar en el estado que se presenta la comunicación entre las neuronas de este modelo de TEA. Lo que a su vez engrosará nuestro conocimiento sobre la neurobiología de este trastorno del neurodesarrollo.

## Referencias

- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.
- Andersen, P. (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Bagni, C., & Zukin, R. S. (2019). A synaptic perspective of fragile X syndrome and autism spectrum disorders. *Neuron*, *101*(6), 1070-1088.
- 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. *Neurosci Lett*, *703*, 149-155.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.03.018>
- Barón-Mendoza, I., Maqueda-Martínez, E., Martínez-Marcial, M., De la Fuente-Granada, M., Gómez-Chavarín, M., & González-Arenas, A. (2021). Changes in the Number and Morphology of Dendritic Spines in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of the C58/J Mouse Model of Autism. *Front Cell Neurosci*, *15*, 726501.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.726501>
- Benninger, R. K. P., & Piston, D. W. (2013). Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues. *Curr Protoc Cell Biol*, *Chapter 4*, 4.11.11-14.11.24.  
<https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0411s59>
- Bohlen, M. O., Bailoo, J. D., Jordan, R. L., & Wahlsten, D. (2012). Hippocampal commissure defects in crosses of four inbred mouse strains with absent corpus callosum. *Genes Brain Behav*, *11*(7), 757-766. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00802.x>
- Bolivar, V. J., Walters, S. R., & Phoenix, J. L. (2007). Assessing autism-like behavior in mice: variations in social interactions among inbred strains. *Behav Brain Res*, *176*(1), 21-26.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.09.007>
- Bolton, P., Macdonald, H., Pickles, A., Rios, P., Goode, S., Crowson, M., . . . Rutter, M. (1994). A case-control family history study of autism. *J Child Psychol Psychiatry*, *35*(5), 877-900.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.1994.tb02300.x>
- Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*, *31*, 47-67.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646>
- Bozdagi, O., Sakurai, T., Papapetrou, D., Wang, X., Dickstein, D. L., Takahashi, N., . . . Buxbaum, J. D. (2010). Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol Autism*, *1*(1), 15.  
<https://doi.org/10.1186/2040-2392-1-15>
- Bridgman, M. W., Brown, W. S., Spezio, M. L., Leonard, M. K., Adolphs, R., & Paul, L. K. (2014). Facial emotion recognition in agenesis of the corpus callosum. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, *6*(1), 1-14.
- Cellot, G., Maggi, L., Di Castro, M. A., Catalano, M., Migliore, R., Migliore, M., . . . Cherubini, E. (2016). Premature changes in neuronal excitability account for hippocampal network impairment and autistic-like behavior in neonatal BTBR T+tf/J mice. *Sci Rep*, *6*, 31696.  
<https://doi.org/10.1038/srep31696>
- Centonze, V. E., & White, J. G. (1998). Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys J*, *75*(4), 2015-2024.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77643-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77643-X)
- Chadman, K., & Guariglia, S. (2012). The BTBR T+ tf/J (BTBR) mouse model of autism. *Autism S1*, *9*(2).

- Chanda, S., Aoto, J., Lee, S. J., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2016). Pathogenic mechanism of an autism-associated neuroligin mutation involves altered AMPA-receptor trafficking. *Mol Psychiatry*, 21(2), 169-177. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.20>
- Chang, F. L., & Greenough, W. T. (1984). Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res*, 309(1), 35-46. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)91008-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)91008-4)
- Charlier, B., Coglianese, A., De Rosa, F., de Grazia, U., Operto, F. F., Coppola, G., . . . Izzo, V. (2021). The Effect of Plasma Protein Binding on the Therapeutic Monitoring of Antiseizure Medications. *Pharmaceutics*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081208>
- Cheng, N., Alshammari, F., Hughes, E., Khanbabaei, M., & Rho, J. M. (2017). Dendritic overgrowth and elevated ERK signaling during neonatal development in a mouse model of autism. *PLoS One*, 12(6), e0179409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179409>
- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., . . . Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 92, 161-193. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.005>
- Christensen, J., Grønborg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*, 309(16), 1696-1703. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
- Cope, E. C., Zych, A. D., Katchur, N. J., Waters, R. C., Laham, B. J., Diethorn, E. J., . . . Gould, E. (2022). Atypical perineuronal nets in the CA2 region interfere with social memory in a mouse model of social dysfunction. *Mol Psychiatry*, 27(8), 3520-3531. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01174-2>
- Daimon, C. M., Jasien, J. M., Wood, W. H., Zhang, Y., Becker, K. G., Silverman, J. L., . . . Maudsley, S. (2015). Hippocampal Transcriptomic and Proteomic Alterations in the BTBR Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Front Physiol*, 6, 324. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00324>
- Danzer, S. C. (2019). Valproic Acid Leads New Neurons Down the Wrong Path. *Epilepsy Curr*, 19(2), 132-133. <https://doi.org/10.1177/1535759719835366>
- De Simoni, A., & Yu, L. M. (2006). Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method. *Nat Protoc*, 1(3), 1439-1445. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.228>
- Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73-76.
- Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73-76.
- Denk, W., & Svoboda, K. (1997). Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*, 18(3), 351-357. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81237-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81237-4)
- Durak, O., Gao, F., Kaeser-Woo, Y. J., Rueda, R., Martorell, A. J., Nott, A., . . . Tsai, L. H. (2016). Chd8 mediates cortical neurogenesis via transcriptional regulation of cell cycle and Wnt signaling. *Nat Neurosci*, 19(11), 1477-1488. <https://doi.org/10.1038/nn.4400>
- D'Mello III, S. R. (2021). MECP2 and the biology of MECP2 duplication syndrome. *Journal of Neurochemistry*, 159(1), 29-60.
- Ellis, H. T., Tordoff, M. G., & Parker, M. R. (2013). Itpr3 Is responsible for the mouse tufted (tf) locus. *J Hered*, 104(2), 295-297. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess089>
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, 353(6301), 772-777. <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>

- Fiala, J. C., Spacek, J., & Harris, K. M. (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*, 39(1), 29-54.  
[https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(02\)00158-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00158-3)
- Gardener, H., Spiegelman, D., & Buka, S. L. (2009). Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry*, 195(1), 7-14. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.108.051672>
- Govindarajan, A., Israely, I., Huang, S. Y., & Tonegawa, S. (2011). The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP. *Neuron*, 69(1), 132-146.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.008>
- Guang, S., Pang, N., Deng, X., Yang, L., He, F., Wu, L., . . . Peng, J. (2018). Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder. *Front Cell Neurosci*, 12, 470.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00470>
- Guillery, R. W. (2000). Early electron microscopic observations of synaptic structures in the cerebral cortex: a view of the contributions made by George Gray (1924-1999). *Trends Neurosci*, 23(12), 594-598. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01635-0](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01635-0)
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., . . . Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*, 68(11), 1095-1102. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76>
- Hammond, C. (2015). *Cellular and molecular neurophysiology* (Fourth edition. ed.). Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Han, S., Tai, C., Jones, C. J., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2014). Enhancement of inhibitory neurotransmission by GABAA receptors having  $\alpha 2,3$ -subunits ameliorates behavioral deficits in a mouse model of autism. *Neuron*, 81(6), 1282-1289.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.016>
- Hansen, S. N., Schendel, D. E., & Parner, E. T. (2015). Explaining the increase in the prevalence of autism spectrum disorders: the proportion attributable to changes in reporting practices. *JAMA Pediatr*, 169(1), 56-62. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.1893>
- Harris, K. M., & Kater, S. B. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, 17, 341-371.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.002013>
- Hasegawa, K., & Kuwako, K. I. (2022). Molecular mechanisms regulating the spatial configuration of neurites. *Semin Cell Dev Biol*, 129, 103-114. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.02.015>
- Hirota, T., & King, B. H. (2023). Autism Spectrum Disorder: A Review. *JAMA*, 329(2), 157-168.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2022.23661>
- Huttenlocher, P. R. (1979). Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res*, 163(2), 195-205. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90349-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90349-4)
- Ip, J. P. K., Mellios, N., & Sur, M. (2018). Rett syndrome: insights into genetic, molecular and circuit mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 19(6), 368-382. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0006-3>
- Iwata, K., Matsuzaki, H., Takei, N., Manabe, T., & Mori, N. (2010). Animal models of autism: an epigenetic and environmental viewpoint. *J Cent Nerv Syst Dis*, 2, 37-44.  
<https://doi.org/10.4137/JCNSD.S6188>
- Jasien, J. M., Daimon, C. M., Wang, R., Shapiro, B. K., Martin, B., & Maudsley, S. (2014). The effects of aging on the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. *Front Aging Neurosci*, 6, 225. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00225>
- Jiang, S., He, M., Xiao, L., Sun, Y., Ding, J., Li, W., . . . Wang, F. (2022). Prenatal GABAB Receptor Agonist Administration Corrects the Inheritance of Autism-Like Core Behaviors in Offspring

- of Mice Prenatally Exposed to Valproic Acid. *Front Psychiatry*, 13, 835993.  
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.835993>
- Jones-Davis, D. M., Yang, M., Rider, E., Osbun, N. C., da Gente, G. J., Li, J., . . . Sherr, E. H. (2013). Quantitative trait loci for interhemispheric commissure development and social behaviors in the BTBR T<sup>+</sup> tf/J mouse model of autism. *PLoS One*, 8(4), e61829.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061829>
- Kandel, E. R. (2013). *Principles of neural science* (5th ed.). McGraw-Hill.
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous child*, 2(3), 217-250.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*, 26(7), 360-368.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00162-0)
- Kim, J. Y., Son, M. J., Son, C. Y., Radua, J., Eisenhut, M., Gressier, F., . . . Fusar-Poli, P. (2019). Environmental risk factors and biomarkers for autism spectrum disorder: an umbrella review of the evidence. *Lancet Psychiatry*, 6(7), 590-600. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(19\)30181-6](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30181-6)
- Kuhn, R. (2004). Eugen Bleuler's concepts of psychopathology. *Hist Psychiatry*, 15(59 Pt 3), 361-366. <https://doi.org/10.1177/0957154X04044603>
- Li, W., & Pozzo-Miller, L. (2020). Dysfunction of the corticostriatal pathway in autism spectrum disorders. *J Neurosci Res*, 98(11), 2130-2147. <https://doi.org/10.1002/jnr.24560>
- Liu, C.-x., Li, C.-y., Hu, C.-c., Wang, Y., Lin, J., Jiang, Y.-h., . . . Xu, X. (2018). CRISPR/Cas9-induced shank3b mutant zebrafish display autism-like behaviors. *Molecular Autism*, 9(1), 1-13.
- Martínez-Cerdeño, V. (2017). Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Dev Neurobiol*, 77(4), 393-404. <https://doi.org/10.1002/dneu.22417>
- Mercier, F., Kwon, Y. C., & Douet, V. (2012). Hippocampus/amygdala alterations, loss of heparan sulfates, fractones and ventricle wall reduction in adult BTBR T<sup>+</sup> tf/J mice, animal model for autism. *Neurosci Lett*, 506(2), 208-213. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.11.007>
- Meyza, K. Z., & Blanchard, D. C. (2017). The BTBR mouse model of idiopathic autism - Current view on mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, 76(Pt A), 99-110.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.037>
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Perez, A., Holloway, L. P., Barbaro, R. P., . . . Crawley, J. N. (2007). Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res*, 176(1), 4-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.07.030>
- Mutlu-Albayrak, H., Bulut, C., & Çaksen, H. (2017). Fetal Valproate Syndrome. *Pediatr Neonatol*, 58(2), 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2016.01.009>
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol*, 64, 313-353. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008>
- Ogiwara, I., Miyamoto, H., Tatsukawa, T., Yamagata, T., Nakayama, T., Atapour, N., . . . Yamakawa, K. (2018). Nav1.2 haploinsufficiency in excitatory neurons causes absence-like seizures in mice. *Commun Biol*, 1, 96. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0099-2>
- Ohkawara, T., Katsuyama, T., Ida-Eto, M., Narita, N., & Narita, M. (2015). Maternal viral infection during pregnancy impairs development of fetal serotonergic neurons. *Brain Dev*, 37(1), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2014.03.007>
- Packer, A. (2016). Neocortical neurogenesis and the etiology of autism spectrum disorder. *Neurosci Biobehav Rev*, 64, 185-195. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.002>
- Parnass, Z., Tashiro, A., & Yuste, R. (2000). Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*, 10(5), 561-568.  
[https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:5<561::AID-HIPO6>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:5<561::AID-HIPO6>3.0.CO;2-X)

- Pearson, B. L., Corley, M. J., Vasconcellos, A., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2013). Heparan sulfate deficiency in autistic postmortem brain tissue from the subventricular zone of the lateral ventricles. *Behav Brain Res*, *243*, 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.062>
- Perera-Murcia, G. (2019). *Depresión sináptica de largo plazo mediada por los receptores mGluR y NMDA en ratones haploinsuficientes de Shank3* [Master, Universidad Nacional Autónoma de México].
- Petanjek, Z., Judaš, M., Šimic, G., Rasin, M. R., Uylings, H. B., Rakic, P., & Kostovic, I. (2011). Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(32), 13281-13286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105108108>
- Phil H. Lee , V. A., Hyejung Won , Yen-Chen A. Feng , Jacob Rosenthal , Zhaozhong Zhu , Elliot M. Tucker-Drob , Michel G. Nivard , Andrew D. Grotzinger , Danielle Posthuma , Meg M.-J. Wang , Dongmei Yu , Eli A. Stahl , Raymond K. Walters , Richard J.L. Anney , Laramie E. Duncan , Tian Ge , Rolf Adolfsson , Tobias Banaschewski , Sintia Belangero , Edwin H. Cook , Giovanni Coppola , Eske M. Derks , Pieter J. Hoekstra , Jaakko Kaprio , Anna Keski-Rahkonen , George Kirov , Henry R. Kranzler , Jurjen J. Luykx , Luis A. Rohde , Clement C. Zai , Esben Agerbo , M.J. Arranz , Philip Asherson , Marie Bækvad-Hansen , Gísli Baldursson , Mark Bellgrove , Richard A. Belliveau Jr. , Jan Buitelaar , Christie L. Burton , Jonas Bybjerg-Grauholm , Miquel Casas , Felecia Cerrato , Kimberly Chambert , . (2019). Genomic Relationships, Novel Loci, and Pleiotropic Mechanisms across Eight Psychiatric Disorders. *Cell*, *179*(7), 1469-1482.e1411. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.020>
- Phillips, M., & Pozzo-Miller, L. (2015). Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. *Neurosci Lett*, *601*, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.011>
- Piskorowski, R. A., & Chevaleyre, V. (2012). Synaptic integration by different dendritic compartments of hippocampal CA1 and CA2 pyramidal neurons. *Cell Mol Life Sci*, *69*(1), 75-88. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0769-4>
- Pérez, C., Sawmiller, D., & Tan, J. (2016). The role of heparan sulfate deficiency in autistic phenotype: potential involvement of Slit/Robo/srGAPs-mediated dendritic spine formation. *Neural Dev*, *11*, 11. <https://doi.org/10.1186/s13064-016-0066-x>
- Raymond, G. V., Bauman, M. L., & Kemper, T. L. (1996). Hippocampus in autism: a Golgi analysis. *Acta Neuropathol*, *91*(1), 117-119. <https://doi.org/10.1007/s004010050401>
- Rochefort, N. L., & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep*, *13*(8), 699-708. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.102>
- Rosenberg, R. E., Law, J. K., Yenokyan, G., McGready, J., Kaufmann, W. E., & Law, P. A. (2009). Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med*, *163*(10), 907-914. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2009.98>
- Rubart, M. (2004). Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res*, *95*(12), 1154-1166. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000150593.30324.42>
- Rutter, M. (1972). Childhood schizophrenia reconsidered. *Journal of Autism & Childhood Schizophrenia*.
- Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2000). Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature*, *408*(6812), 589-593. <https://doi.org/10.1038/35046076>
- Sala, C., & Segal, M. (2014). Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*, *94*(1), 141-188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2013>
- Sanders, S. J., He, X., Willsey, A. J., Ercan-Sencicek, A. G., Samocha, K. E., Cicek, A. E., . . . Consortium, A. S. (2015). Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture

- and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*, 87(6), 1215-1233.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.016>
- Segev, I., & London, M. (2000). Untangling dendrites with quantitative models. *Science*, 290(5492), 744-750. <https://doi.org/10.1126/science.290.5492.744>
- Shaw, K. A., Bilder, D. A., McArthur, D., Williams, A. R., Amoakohene, E., Bakian, A. V., . . . Maenner, M. J. (2023). Early Identification of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 4 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR Surveill Summ*, 72(1), 1-15. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7201a1>
- Sheppard, C. R., & Gu, M. (1990). Image formation in two-photon fluorescence microscopy. *Optik (Stuttgart)*, 86(3), 104-106.
- Skalecka, A., Liszewska, E., Bilinski, R., Gkogkas, C., Khoutorsky, A., Malik, A. R., . . . Jaworski, J. (2016). mTOR kinase is needed for the development and stabilization of dendritic arbors in newly born olfactory bulb neurons. *Dev Neurobiol*, 76(12), 1308-1327.  
<https://doi.org/10.1002/dneu.22392>
- Song, T.-J., Lan, X.-Y., Wei, M.-P., Zhai, F.-J., Boeckers, T. M., Wang, J.-N., . . . Dang, W.-W. (2019). Altered behaviors and impaired synaptic function in a novel rat model with a complete Shank3 deletion. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 111.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci*, 9(3), 206-221. <https://doi.org/10.1038/nrn2286>
- Stephenson, D. T., O'Neill, S. M., Narayan, S., Tiwari, A., Arnold, E., Samaroo, H. D., . . . Morton, D. (2011). Histopathologic characterization of the BTBR mouse model of autistic-like behavior reveals selective changes in neurodevelopmental proteins and adult hippocampal neurogenesis. *Mol Autism*, 2(1), 7. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-2-7>
- Theer, P., & Denk, W. (2006). On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 23(12), 3139-3149.  
<https://doi.org/10.1364/josaa.23.003139>
- Tian, R., Li, Y., Zhao, H., Lyu, W., Zhao, J., Wang, X., . . . Zhang, Y. Q. (2023). Modeling SHANK3-associated autism spectrum disorder in Beagle dogs via CRISPR/Cas9 gene editing. *Mol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02276-9>
- Tordoff, M. G., Downing, A., & Voznesenskaya, A. (2014). Macronutrient selection by seven inbred mouse strains and three taste-related knockout strains. *Physiol Behav*, 135, 49-54.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.039>
- Tordoff, M. G., & Ellis, H. T. (2013). Taste dysfunction in BTBR mice due to a mutation of Itpr3, the inositol triphosphate receptor 3 gene. *Physiol Genomics*, 45(18), 834-855.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00092.2013>
- Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., & Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420(6917), 788-794. <https://doi.org/10.1038/nature01273>
- Uzunova, G., Pallanti, S., & Hollander, E. (2016). Excitatory/inhibitory imbalance in autism spectrum disorders: Implications for interventions and therapeutics. *World J Biol Psychiatry*, 17(3), 174-186. <https://doi.org/10.3109/15622975.2015.1085597>
- Wahlsten, D., Metten, P., & Crabbe, J. C. (2003). Survey of 21 inbred mouse strains in two laboratories reveals that BTBR T/+ tf/tf has severely reduced hippocampal commissure and absent corpus callosum. *Brain Res*, 971(1), 47-54. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02354-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02354-0)
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., . . . Bobrowicz, T. W. (2010). The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta neuropathologica*, 119(6), 755-770.

- Wei, H., Ma, Y., Ding, C., Jin, G., Liu, J., Chang, Q., . . . Yu, L. (2016). Reduced Glutamate Release in Adult BTBR Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Neurochem Res*, *41*(11), 3129-3137. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2035-5>
- Wei, L., Meaney, M. J., Duman, R. S., & Kaffman, A. (2011). Affiliative behavior requires juvenile, but not adult neurogenesis. *J Neurosci*, *31*(40), 14335-14345. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1333-11.2011>
- Wilkinson, B., Grepo, N., Thompson, B. L., Kim, J., Wang, K., Evgrafov, O. V., . . . Campbell, D. B. (2015). The autism-associated gene chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) regulates noncoding RNAs and autism-related genes. *Transl Psychiatry*, *5*(5), e568. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.62>
- Williams, D. W., & Truman, J. W. (2004). Mechanisms of dendritic elaboration of sensory neurons in Drosophila: insights from in vivo time lapse. *J Neurosci*, *24*(7), 1541-1550. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4521-03.2004>
- Willsey, H. R., Willsey, A. J., Wang, B., & State, M. W. (2022). Genomics, convergent neuroscience and progress in understanding autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*, *23*(6), 323-341. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00576-7>
- Wu, S., Gan, G., Zhang, Z., Sun, J., Wang, Q., Gao, Z., . . . Thomas, U. (2017). A presynaptic function of shank protein in Drosophila. *Journal of Neuroscience*, *37*(48), 11592-11604.
- Wu, S., Wu, F., Ding, Y., Hou, J., Bi, J., & Zhang, Z. (2017). Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*, *135*(1), 29-41. <https://doi.org/10.1111/acps.12666>
- Wu, Y., Cao, H., Baranova, A., Huang, H., Li, S., Cai, L., . . . Wang, Q. (2020). Multi-trait analysis for genome-wide association study of five psychiatric disorders. *Transl Psychiatry*, *10*(1), 209. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00902-6>
- Xuan, I. C., & Hampson, D. R. (2014). Gender-dependent effects of maternal immune activation on the behavior of mouse offspring. *PLoS One*, *9*(8), e104433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104433>
- Yang, M., Clarke, A. M., & Crawley, J. N. (2009). Postnatal lesion evidence against a primary role for the corpus callosum in mouse sociability. *Eur J Neurosci*, *29*(8), 1663-1677. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06714.x>
- Zeidan, J., Fombonne, E., Scora, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., . . . Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res*, *15*(5), 778-790. <https://doi.org/10.1002/aur.2696>
- Zerbo, O., Yoshida, C., Gunderson, E. P., Dorward, K., & Croen, L. A. (2015). Interpregnancy Interval and Risk of Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics*, *136*(4), 651-657. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-1099>
- Zhang, D., Yu, B., Liu, J., Jiang, W., Xie, T., Zhang, R., . . . Yao, H. (2017). Altered visual cortical processing in a mouse model of MECP2 duplication syndrome. *Sci Rep*, *7*(1), 6468. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06916-3>
- Zhang, H., Yang, L., Duan, J., Zeng, Q., Chen, L., Fang, Y., . . . Liao, J. (2021). Phenotypes in Children With. *Front Neurosci*, *15*, 761473. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.761473>
- Zhou, Q., Homma, K. J., & Poo, M. M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, *44*(5), 749-757. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.011>
- Zhou, Y., Sharma, J., Ke, Q., Landman, R., Yuan, J., Chen, H., . . . Menegas, W. (2019). Atypical behaviour and connectivity in SHANK3-mutant macaques. *Nature*, *570*(7761), 326-331.
- Zipfel, W. R., Williams, R. M., & Webb, W. W. (2003). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*, *21*(11), 1369-1377. <https://doi.org/10.1038/nbt899>

