



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Variaciones individuales en la circuitería neuronal de la
amígdala basolateral del gato**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Queletzú Paulina Aspra Polo

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Investigador Titular B de Tiempo Completo, Definitivo
Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas

COMITÉ TUTOR

Dra. Robyn Elizabeth Hudson, Investigador Titular C de Tiempo Completo, Definitiva
Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Miguel Pérez De la Mora, Investigador Titular C de Tiempo Completo, Definitivo
Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Variaciones individuales en la circuitería neuronal de la
amígdala basolateral del gato**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Queletzú Paulina Aspra Polo

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Investigador Titular B de Tiempo Completo, Definitivo
Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas

COMITÉ TUTOR

Dra. Robyn Elizabeth Hudson, Investigador Titular C de Tiempo Completo, Definitiva
Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Miguel Pérez De la Mora, Investigador Titular C de Tiempo Completo, Definitivo
Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de Agosto de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ASPRA POLO QUELETZU PAULINA** con número de cuenta **302209521** con la tesis titulada **"VARIACIONES INDIVIDUALES EN LA CIRCUITERIA NEURONAL DE LA AMÍGDALA BASOLATERAL DEL GATO"**, realizada bajo la dirección del Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

Presidente: DR. MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA
Vocal: DR. FRANCISCO SOTRES BAYON
Secretario: DR. MIGUEL PEREZ DE LA MORA
Suplente: DR. ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD G
Suplente: DR. GABRIEL ROLDAN ROLDAN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de septiembre de 2013.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

La autora agradece

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

El apoyo recibido como becario CONACyT número 254405.

El financiamiento fue otorgado por CONACyT (82879 otorgado al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina) y PAPIIT, UNAM (IN215208-3 y IN203912-3).

A los miembros del comité Tutor Dra. Robyn Elizabeth Hudson y Dr. Miguel Perez de la Mora

Agradecimientos

A mis padres.

A mis hermanos y a Tlalli.

A Edgar.

A Eduardo, Saraí, Leonora, Raquel, Silvia, Dannia y Jesús.

Al Dr. Miguel Pérez de la Mora y a Minerva, René y Eli.

La autora agradece el apoyo técnico brindado por el Dr. Miguel Tapia Rodríguez en el desarrollo de los protocolos de análisis morfológicos y a la M. en C. Patricia Padilla por su apoyo técnico.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIÓN	24
BIBLIOGRAFÍA	25

Resumen

Las poblaciones animales están constituidas por colecciones de individuos que comparten caracteres que definen a cada especie. Cada individuo presenta variaciones en dichos caracteres que lo hacen único. Los caracteres anatómicos están sujetos a regulación génica, epigenética y ambiental. La amígdala basolateral (AB) es una estructura anatómica que subyace a la conducta de temor y ansiedad. Estudios previos han encontrado en los árboles dendríticos de neuronas piramidales y estrelladas de la AB módulos particularmente sensibles a situaciones de estrés agudo y crónico. Nosotros hipotetizamos que es en éstos módulos donde encontraremos mayor variabilidad en los árboles dendríticos de neuronas de la AB de diferentes animales y que dicha variabilidad se hará patente durante el desarrollo de los árboles dendríticos. Nuestros datos confirman que existe un módulo hipervariable en el árbol dendrítico de neuronas de la AB que estudios ya existentes relacionaron con diferentes respuestas de temor y ansiedad.

Abstract

Any group of animals is composed by a collection of individuals that share traits that define each species. Every individual presents variations in this traits that make it unique. Anatomical traits are subject to genetic, epigenetic and environmental regulation. Basolateral Amygdala is an anatomical structure that is responsible for fear and anxiety response. Previous studies have found in dendritic trees of pyramidal and stellate neurons from basolateral amygdala a unit particularly sensitive to acute and chronic stress. We hypothesize that it is in this unit where we'll find the most variability in dendritic trees of neurons from basolateral amygdala in different animals. This variability will be present during development of dendritic trees. Our data confirms the existence of a hyper-variable unit in the dendritic tree of neurons from basolateral amygdala, a structure that previous studies have related with differential fear and anxiety response.

Introducción

Un problema central en las ciencias de la vida es el origen de la individualidad (i.e., la individuación fenotípica) en organismos animales. Para quienes han tratado de establecer las bases sociobiológicas y evolutivas de la individuación conductual, es claro que las poblaciones animales están constituidas por colecciones de individuos que si bien comparten características conductuales que definen a cada especie, también expresan conductas matizadas, por la experiencia del medio ambiente, que los hacen únicos.

Anteriormente se pensaba en una dicotomía entre la información genética (Caspi et al., 2002 y 2003) y la influencia del medio ambiente sobre los procesos de individuación. Sin embargo, actualmente existen trabajos que favorecen la idea que la individuación resulta de:

1) Un proceso de lectura, interpretación e integración de la información genética y ambiental por parte de cada organismo en desarrollo (para una visión similar ver Bendesky et al., 2011). Es decir, las respuestas conductuales individuales como producto de la *susceptibilidad diferencial*, que otorgan conjuntos de genes, ante ambientes favorables y desfavorables (Van Ijzendoorn et al., 2012, Wurzman et al., 2012).

2) Procesos de plasticidad fenotípica generados a través de mecanismos epigenéticos, asociados a cambios en los patrones de expresión de los genes durante el desarrollo (Skinner et al., 2008; Oler et al., 2010; Lajud et al., 2011; Schrey et al., 2012) todo esto bajo la influencia del ambiente.

Sin embargo, cabe preguntarse si existe una interfaz en la que convergen factores genéticos, epigenéticos y ambientales que resultan en la individuación. La primera evidencia que tenemos de diferencias inter-individuales suele ser la conducta, sin embargo existen sustratos anatómicos que la sustentan. Éste sustrato anatómico constituye una parte de la interfaz que, al modificarse durante el desarrollo, individualiza la ulterior expresión de la conducta (ver revisión por Van der Bergh et al., 2005).

Antecedentes

1.1 El árbol dendrítico de neuronas de AB

Los circuitos neuronales están configurados por elementos presinápticos, generalmente fibras aferentes, y postsinápticos, frecuentemente dendritas. La amígdala forma parte de un circuito neural que incluye a la corteza prefrontal, infralímbica, hipocampo y tálamo, entre otros. Estos circuitos son responsables, en gran medida, de conductas como temor, ansiedad, estrés post-traumático, depresión, etc. (Pare & Duvarci 2012). En este sentido, existen estudios que muestran que la modificación del número, tipo y longitud de espinas dendríticas y dendritas en las neuronas del hipocampo en la amígdala y la corteza prefrontal es susceptible a la exposición a ambientes estresantes en etapas tempranas o adultas (Cook et al., 2004; Mitra et al., 2005; Radley et al., 2006; Vyas et al 2009, también ver revisiones McEwen et al., 2012). No obstante estos resultados, aún no es claro si existen módulos anatómicos específicos que al modificarse conducen a la individualización de la conducta o si es un cambio anatómico global de la configuración de los circuitos neuronales el que la produce. A este respecto, recientemente Mitra et al (2009) presentaron datos obtenidos en ratas seleccionadas por su innata respuesta al estrés. En este estudio, los animales seleccionados por su alta respuesta al estrés, que fueron sometidos a estrés agudo mostraron una mayor longitud de las dendritas entre las 75 y 125 micras desde cuerpo neuronal en la AB. Paralelamente, animales transgénicos con aumentadas respuestas de ansiedad, muestran modificaciones en los árboles dendríticos en rangos similares de distancia al soma en la AB (Camp et al., 2012; Knafo et al., 2009 ver también Govindarajan et al., 2006).

Los estudios mencionados anteriormente consideran únicamente individuos que presentan conductas extremas, obviando que un porcentaje significativo de la población muestra respuestas cercana a la media (Bush et al., 2007) por lo cual es importante el enfoque en individuos del presente trabajo.

1.2 Neurotransmisores

La actividad de las aferentes glutamatérgicas que llegan a la AB son moduladas, aunque no exclusivamente, por aferentes dopaminérgicas y serotoninérgicas. En roedores, las fibras dopaminérgicas, provenientes del área tegmental ventral, contactan a las neuronas de la AB en el área perisomática (Brinley Reed et al., 1999). Se ha reportado que la innervación dopaminérgica sustenta la ramificación de los árboles dendríticos de la corteza prefrontal (Serren et al., 2005). Por otro lado, en roedores, las dendritas distales de las neuronas de la AB

también reciben innervación serotoninérgica proveniente de los núcleos del raquí dorsal y juegan un papel importante del estado de ánimo y de la ansiedad (Muller et al., 2007), así mismo, existen trabajos que muestran que modificaciones en la innervación serotoninérgica afecta la densidad de espinas dendríticas y la longitud de dendritas de neuronas de la AB (Wellman et al., 2007). Ambos neurotransmisores tienen efectos tróficos (Tosini et al., 2012) por lo que de ser liberados por las aferentes, podrían ejercer un efecto sobre el crecimiento de los arboles dendríticos de las neuronas de la AB. Es por lo anterior que resulta importante considerar la densidad de las aferentes serotoninérgicas y dopaminérgicas en la AB como posible agente modulador de las características morfofuncionales de las neuronas de la AB.

Con base en lo mencionado, y dadas las limitaciones de estudios previos, en el presente trabajo se intentó identificar parte del sustrato anatómico asociado con la variación individual de la expresión de las conductas de temor y ansiedad, utilizando como modelo a la AB del gato. Exploramos con mayor detalle si la emergencia ontogenética de las diferencias interindividuales de la expresión del temor y la ansiedad se relacionan con modificaciones estructurales individualizadas de compartimentos precisos del árbol dendrítico neuronal.

Hipótesis

En las neuronas de la amígdala basolateral existen módulos del árbol dendrítico particularmente variables entre animales. Estos módulos son aquellos que han sido identificados como aquellos entre las 70-120 micras de distancia al soma. Durante el desarrollo, a medida que los árboles dendríticos se ramifiquen, el módulo hipervariable se hará patente.

Objetivos

- Evaluar si existen diferencias en la configuración del árbol dendrítico de gatos adultos
- Evaluar si existen cambios en el tamaño global del árbol dendrítico
- En caso de encontrar diferencias en la configuración del árbol dendrítico en gatos adultos, evaluar si son evidentes a lo largo del desarrollo
- Evaluar si existen cambios en la densidad de innervación dopaminérgica y serotoninérgica a lo largo del desarrollo.

Materiales y Métodos

Animales

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron gatos domésticos *Felis silvestris catus*, el número de animales utilizados se explica en la Tabla 1. Después de su nacimiento los gatos fueron mantenidos en una colonia ubicada en las instalaciones del laboratorio de la Dra. Robyn Hudson, en el Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Durante su estancia, los gatos fueron alimentados y tuvieron acceso a agua *ad libitum* hasta el día de sacrificio. Los procedimientos fueron realizados de acuerdo a los lineamientos establecidos por el código de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Tabla 1

Edad	Golgi	Inmunohistoquímica
1 semana	n=4	n=3
4 semanas	n=3	n=3
8 semanas	n=3	n=3
16 semanas	n=6	n=3

El modelo de gato

A pesar de que el modelo animal más utilizado en estudios sobre anatomía y función de amígdala es el murino, ésta estructura y las conductas derivadas de su funcionamiento se han conservado a lo largo del proceso evolutivo, por lo que utilizar al gato como modelo experimental aportaría información en ese sentido (Pabba et al., 2013). Por otro lado, existen trabajos que evidencian marcadas diferencias morfofuncionales en el cerebro de diferentes gatos, particularmente en la representación corporal en corteza somatosensorial (Myasnikov et al., 1997) y se ha observado que el gato presenta aspectos conductuales medibles que caracterizan a cada individuo (Feaver et al., 1986). En los gatos, al igual que otros mamíferos, la integración de la información sensorial presenta un desarrollo apresurado en los días post-natales (Bengoetxea et al., 2012) y las primeras 12 semanas de vida son cruciales para desarrollar respuestas de aversión (Wilson et al., 1965). Lo anterior hace del gato un modelo

ideal para explorar el desarrollo de diferencias inter-individuales en el sustrato biológico responsable de la respuesta de temor y ansiedad.

Obtención de las muestras y procesamiento histológico

a) Impregnación Golgi-Cox

Animales de 1, 4, 8 y 16 semanas de edad fueron anestesiados con pentobarbital sódico (45mg/Kg de peso) y decapitados rápidamente. Los cerebros fueron entonces obtenidos y cortados para obtener fragmentos de la amígdala que se sumergieron durante 12 días en una solución compuesta por cromato de potasio, dicromato de potasio y cloruro de mercurio de acuerdo a las instrucciones del proveedor (FD Rapid GolgiStain™ Kit Neurotechnologies). Posteriormente se obtuvieron cortes coronales de 120µm de grosor con la ayuda de un vibratomo. Los cortes fueron impregnados revelados, fijados y montados de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

b) Inmunohistoquímica

Animales de 1, 4, 8 y 16 semanas de edad fueron anestesiados con pentobarbital sódico una dosis de 45mg/kg de peso. Se perfundieron con 150 o 300 ml de solución salina (NaCl 1M) dependiendo el peso, y posteriormente con 150 o 300 ml de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PB) 0.1M fosfato monobásico y 0.1M de fosfato dibásico. Sus cerebros fueron extraídos y post- fijados con paraformaldehído al 4% en PB por 2 horas y posteriormente se incluyeron en sacarosa al 30% por 96 horas a 4°C. Se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Con ayuda de un criostato, se obtuvieron cortes seriados de 50µm de grosor. Únicamente se seleccionó la región que abarca el complejo amigdalino, y se obtuvieron aproximadamente 90-110 cortes por hemisferio cerebral. Los cortes se almacenaron en solución crioprotectora (25% etilenglicol, 25% glicerol, 50% PB). Se seleccionó uno de cada 10 cortes para hacer la identificación de fibras.

Los cortes seleccionados se mantuvieron por 16 hrs en PFA 4% a 4°C sin agitación, se incubaron a 70°C en buffer de citratos de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Inmuno/DNA retriever with citrate ref. BSB0020 Bio SB), y por 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS. Los cortes se incubaron con el anticuerpo policlonal de borrego contra tirosina hidroxilasa (TH) (1:1000 Millipore Cat. # AB1542, Lote #LV 1583392) durante 168 horas a 4°C, o con el anticuerpo primario policlonal de conejo contra el

transportador de serotonina (SERT) (1:1500 InmunoStar Cat. #24330) durante 72 horas a 4°C con agitación constante. Posteriormente los cortes se lavaron en 3 ocasiones, cada una de 10 minutos con PB y tritón al 0.5%. Se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en agitación con el anticuerpo secundario de oveja conjugado a biotina (1:1000 donkey anti sheep Chemicon #Ap184B) o de conejo conjugado a biotina (1:1000 donkey anti rabbit Chemicon #Ap182 B). Se lavaron tres veces por 15 minutos con PB y se incubaron una hora a temperatura ambiente con el complejo avidina-peroxidasa de acuerdo a las instrucciones del proveedor (ABC kit, Vector Laboratories). La actividad de la enzima peroxidasa se reveló utilizando 3, 3-diaminobencidina como cromógeno y cloruro de níquel y cobalto como intensificadores de la reacción, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Peroxidase staining kit; Vector Laboratories). La reacción de peroxidasa se detuvo lavando con PB. Finalmente los cortes se colocaron sobre portaobjetos cubiertos con gelatina y se montaron con Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific)

Análisis de las muestras histológicas y cromatográficas

a) Morfometría Neuronal

Las poblaciones neuronales de la AB son heterogéneas, son constituidas por neuronas piramidales, estelares e interneuronas peptidérgicas y GABAérgicas. Enfocamos nuestro estudio a las piramidales que agrupan a 85% de la población neuronal total de la AB (McDonald et al 1992). Con ayuda del Atlas de cerebro de gato seleccionamos las rebanadas que se encontraran a 12mm del punto cero estereotáxico. En la figura 1 se observa la amígdala lateral (La) y la amígdala basolateral (Bla) que fueron las áreas consideradas como la AB en este estudio. Con ayuda de un microscopio Nikon Optiphot y del software Neurolucida (MicroBrightfield), se seleccionaron neuronas estrelladas y piramidales, cuyos árboles dendríticos no estuviesen interrumpidos (ver Figura 4). Se hicieron trazados digitales de 10 neuronas por animal. Se obtuvieron las longitudes de cada rama y se promediaron las del mismo orden. Se consideraron dendritas de primer orden aquellas que emergen del soma, las de segundo orden aquellas que emergen de las de primer orden, y así sucesivamente. El análisis de Scholl consiste en el trazado de esferas concéntricas al soma, con un diámetro de 10 micras de diferencia (ver Figura 3G). También se evaluó la longitud total de dendritas que se encuentran entre esferas (ver figura 5).

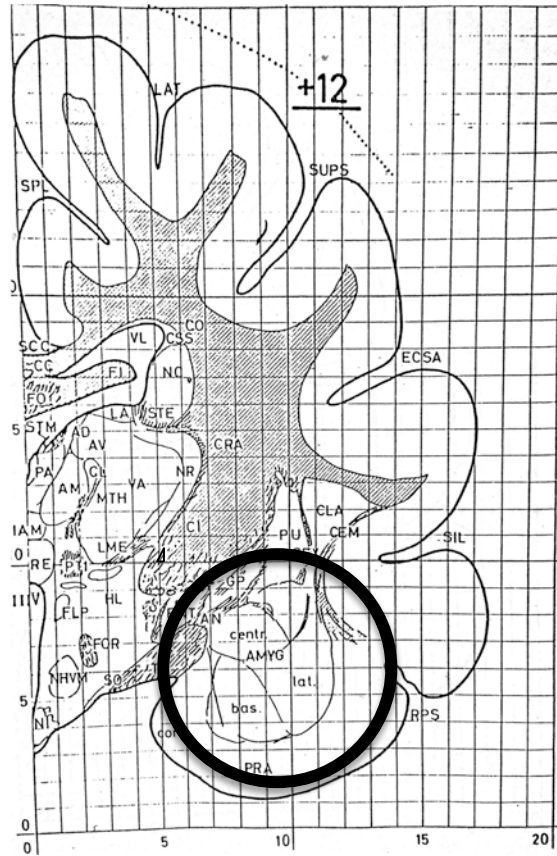


Figura 1. Esquema representativo de la amígdala basolateral de gato. Tomado de Topographischer Hirnatlas der Katze (Atlas topográfico de cerebro de gato) realizado por el Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina del Estudio General de Navarra, Pamplona, España. 1961. Señalado con el círculo negro se observan la Amígdala Basal y Lateral.

b) Densidad de inervación serotoninérgica o dopaminérgica

Las preparaciones se observaron al microscopio y se delimitó únicamente la amígdala basolateral. La cuantificación de fibras se realizó en el microscopio Olympus BX51 WI a un aumento de 60x y con ayuda del programa StereoInvestigator. El principio de este método consiste en que el volumen de un objeto puede ser obtenido considerando el área de cada una de las rebanadas seleccionadas. La estimación de la longitud de las fibras se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 1) Se trazó la extensión total de la AB en cada una de las rebanadas, desde la región más rostral hasta la caudal, con ayuda del Atlas estereotáxico de gato.
- 2) Se trazó una cuadrícula de muestreo de $X= 800\mu\text{m}$ y $Y= 800\mu\text{m}$ sobre el área seleccionada.
- 3) En cada vértice de dicha cuadrícula, se delineó una semi-esfera con radio de $20\mu\text{m}$; y zona de guarda de 5% del tejido. Con un aumento de 60x se identificaron las fibras positivas que intersectan la semi-esfera ya mencionada.
- 4) Se muestreó un promedio de 120 sitios (semiesferas) por animal.

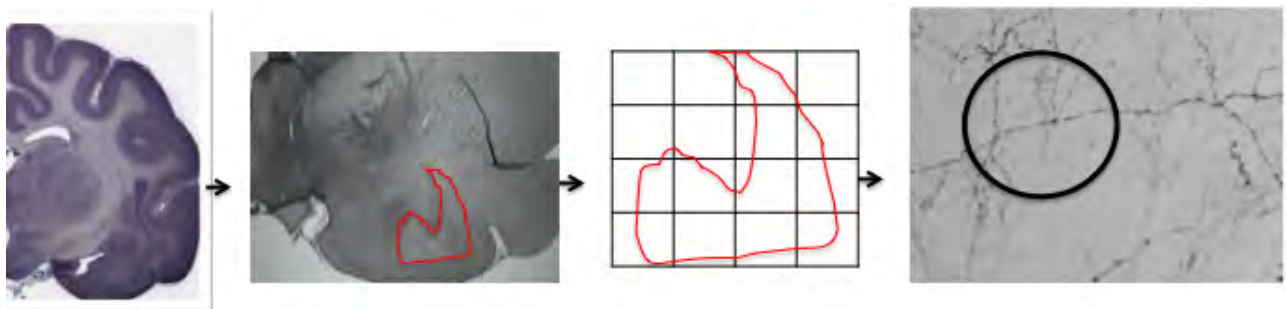


Figura 2. Esquema de flujo en donde se ejemplifica el método utilizado para la cuantificación de fibras TH+ y SERT+. En el dibujo de la izquierda, se observa un corte coronal a la altura de 12mm a partir del 0 estereotáxico de gato. Con un aumento de 10x se traza el área total de la amígdala. Posteriormente sobre esta imagen se determina una cuadrícula. En cada vértice de dicha cuadrícula se seleccionará una hemiesfera.

Resultados

La organización y composición de los arboles dendríticos de las neuronas de amígdala basolateral varía notablemente entre gatos de 4 meses de edad.

En términos generales, el árbol dendrítico de las neuronas de la AB de los gatos estudiados a las 16 semanas de edad posee una estructura conformada por dendritas que van desde el primero hasta el decimoprimer orden (Figura 3). Aunque ejemplos de dendritas pertenecientes a todos los órdenes se observan en una distancia que va desde las 0 las 410 μ m lineales desde el soma, las dendritas consideradas de primer a tercer orden son las más frecuentes en distancias cercanas al soma, mientras que aquellas clasificadas como de orden cuarto y mayores aumentan en frecuencia conforme el árbol se aleja del soma.

La excepción a esta última generalización la constituyen las dendritas de décimo y onceavo órdenes, las cuales derivan de ramas cortas profusamente ramificadas pertenecientes a órdenes inferiores. Estos datos sugieren que los arboles dendríticos de las neuronas de la AB se configuran siguiendo dos principios. Si se ramifican profusamente darán origen a ramas cortas de órdenes crecientes que conducirán a arboles dendríticos “compactos”. Si por el contrario, se ramifican poco darán origen a ramas largas de órdenes menores que conducirán a arboles dendríticos “extendidos”.

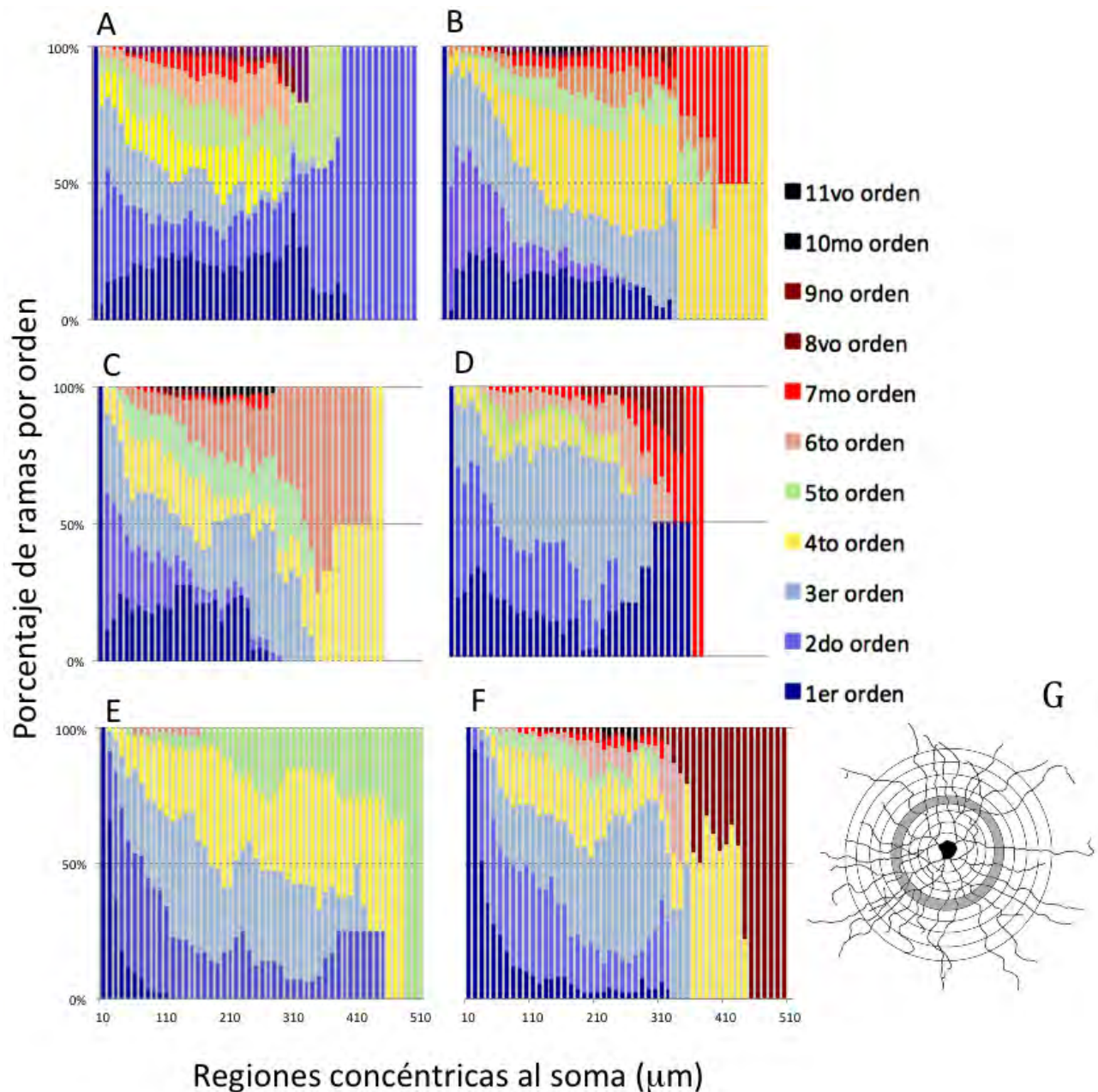


Figura 3 Cada gráfico (A-F) representa un animal de 16 semanas de edad. Se observan los promedios de 10 neuronas por animal. El eje de las abscisas expresa las regiones evaluadas en las áreas concéntricas al soma. Por lo que la distancia señalada como 10 corresponde al espacio comprendido entre la esfera con diámetro 0µm y aquella con diámetro de 10µm y así sucesivamente. El eje de la ordenada representa el componente porcentual de ramas dendríticas de neuronas de amígdala basolateral por orden de rama. Se consideraron dendritas de primer orden aquellas que emergen del soma, las de segundo orden aquellas que emergen de las de primer orden, y así sucesivamente. El orden de las ramas está indicado por el código de color. G) Se trazaron círculos concéntricos alrededor del soma, con diámetros de 10µm de diferencia, se contabilizó la longitud total de ramas que se encontraron entre los círculos (área gris) y se obtuvo el porcentaje de esa longitud de ramas que corresponden al primero, segundo, etc., orden, y así sucesivamente para cada círculo.

No obstante la descripción general dada, el análisis individualizado de las poblaciones de neuronas por gato de la AB estudiadas por gato muestra diferencias individuales notables

en la constitución y organización de los arboles dendríticos (Figura 3). En promedio los árboles dendríticos extendidos de las neuronas del gato E se observan contruidos preferentemente por dendritas de primero y segundo orden (Fig. 4 A). En contraste, los árboles dendríticos de los gatos A, B y F (Fig. 4 B) son extensos y muy ramificados, dado que están contruidos preferentemente por dendritas de tercero a octavo orden. Es interesante destacar que los arboles dendríticos compactos de los gatos C y D están contruidos preferentemente por dendritas de primer a séptimo orden aunque ambos muestran dendritas de mayor orden.

Finalmente, si se observa cuidadosamente la distribución del porcentaje de ramas de distinto orden en función de la distancia desde el soma se notará que independientemente del grado de extensión del árbol, esta distribución porcentual varía notablemente entre los individuos. La variación interindividual referida es sistemática en cualquier segmento del árbol, por lo que no se restringe a la dendritas de primero y segundo orden.

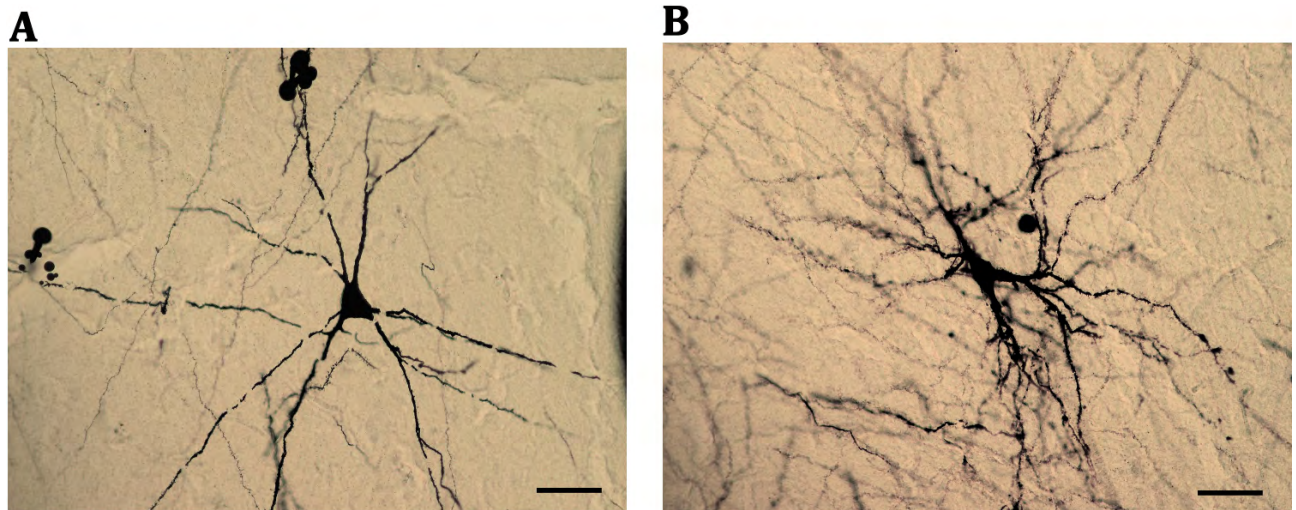


Figura 4. Fotomicrograffias de neuronas piramidales de amígdala basolateral teñidas mediante la técnica Golgi-Cox piramidal de gatos de 16 semanas de edad. (A) Neurona con un árbol dendrítico extendido y (B) compacto. Las barras indican 50 μ m.

Los arboles dendríticos de las neuronas de la AB presentan un módulo anatómico en el que se acentúa la variación interindividual.

Con base en la medición de la longitud total próximo-distal de las ramas dendríticas por segmentos de 10 μ m desde su origen en la zona peri-somática neuronal, notamos la existencia de tres módulos cuya presencia es constante entre los gatos estudiados a 16 semanas de edad (Figura 5D). Los módulos “hipovariantes” proximal y distal ubicados entre las ≈ 0 y 50 μ m y a partir de las $\approx 200\mu$ m del soma, respectivamente, mostraron segmentos dendríticos cuya longitud total, independientemente del orden dendrítico, fue similar entre

los gatos evaluados. En contraste, el análisis mediante ANOVA de una vía indicó que existe un módulo “hipervariable” intermedio ubicado entre las ≈ 70 y las $200\mu\text{m}$ desde el soma, mostró diferencias notables entre animales de la misma edad (ver Fig. 5 A,B,C y D $p < 0.05$ entre todos los animales). Es importante destacar que no obstante la existencia de estos módulos la distribución de la longitud total de los segmentos dendríticos con relación a la distancia desde el soma fue similar en todos los gatos evaluados

El módulo anatómico hipervariable intermedio de los arboles dendríticos de las neuronas de la AB está presente desde la primera semana de vida.

Debido a que el parámetro de la longitud dendrítica total por segmentos de $10\mu\text{m}$ y no la composición porcentual del árbol dendrítico con base en los órdenes dendríticos pareció un criterio más sensible para detectar constancias y variaciones entre los gatos de 16 semanas, decidimos evaluar si la composición modular del árbol dendrítico de las neuronas la AB se adquiriría progresivamente durante el desarrollo postnatal, utilizando el primero de los parámetros mencionados como referente. De acuerdo a esto, la figura 5 muestra los datos obtenidos para el parámetro de la longitud dendrítica total por segmentos de $10\mu\text{m}$ en animales de 1,4,8 y 16 semanas de vida.

Nótese que los perfiles de las curvas son muy parecidos al comparar gatos en el mismo grupo de edad o entre distintas edades. Así, estos datos sugieren que tanto los módulos proximal y distal hipovariables, como el intermedio hipervariable están presentes desde los primeros días del desarrollo postnatal. De forma interesante, la extensión relativa de los módulos es similar en todos los grupos de edad, con excepción hecha de los gatos que tienen una semana de vida en los que la extensión del módulo intermedio es más corta con relación a la observada en gatos de mayor edad (Fig. 5A). Cabe mencionar que la variabilidad entre neuronas del mismo animal se ve acentuada a las 16 semanas de edad (test Bartlett, varianzas diferentes en los rangos que van de las $100\text{-}140\mu\text{m}$ de distancia del soma).

Así, la composición de todos los módulos cambia conforme el desarrollo postnatal avanza al menos hasta alcanzar la cuarta semana de vida (Figuras 5 y 6). De esta forma, debido a que la composición del módulo hipervariable intermedio cambia con el tiempo, resulta imposible adscribir a uno o a algunos elementos del árbol dendrítico la variabilidad individual (e.g., dendritas primarias y secundarias). En otras palabras, la variabilidad

individual debe estar distribuida entre todos los segmentos dendríticos ubicados en el módulo hipervariable del árbol, independientemente del orden de las dendritas que lo conformen.

La densidad de fibras dopaminérgicas y serotoninérgicas se mantiene constante durante el desarrollo.

La innervación de fibras dopaminérgicas y serotoninérgicas en la AB de diferentes gatos de una semana de vida muestra una alta variabilidad (Fig 7 A). Entre el primer y cuarto mes de vida de los gatos la densidad de fibras SERT+ y TH+ se mantiene alrededor de las $2\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$, aunque la variabilidad entre los animales disminuye (ver Figura 8). Cabe destacar que, aunque la densidad de fibras se mantiene constante, el tamaño de la amígdala cuadruplica su tamaño en los primeros 16 semanas de vida (Fig. 7 B)

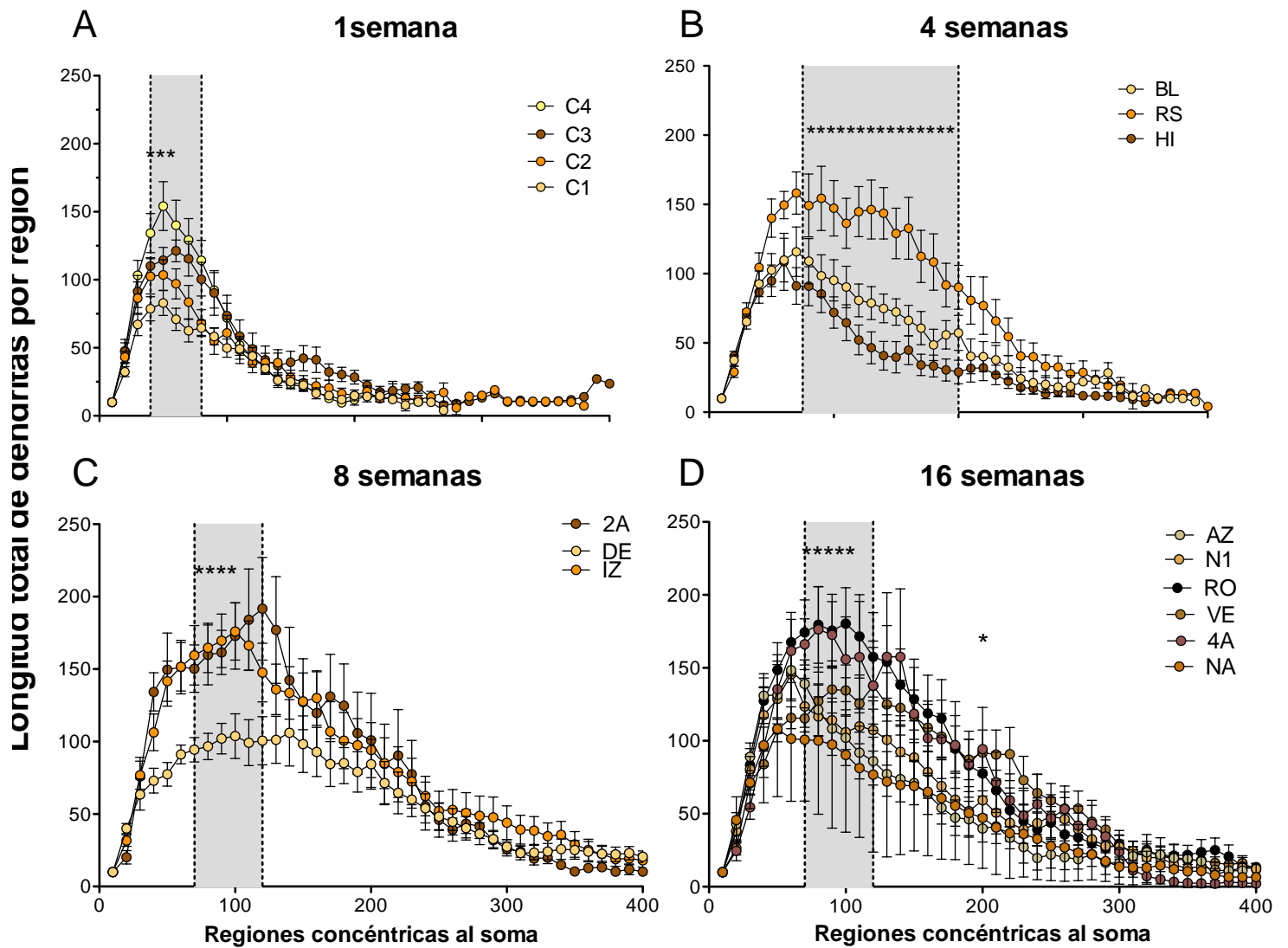


Figura 5. El módulo anatómico hipervariable intermedio de los árboles dendríticos de las neuronas de la AB. Cada serie de puntos representa un animal diferente de la misma edad. Cada punto representa la longitud total de ramas dendríticas por cada región de círculos concéntricos de 10 micras de diferencia. Las barras expresan el error estándar en 10 neuronas por animal. El eje de las abscisas indica las regiones evaluadas en las regiones concéntricas al soma con diámetros de 10 μm de diferencia. El eje de la ordenada representa la longitud total de ramas dendríticas por cada región (μm). El área sombreada es el módulo hipervariable. (A) Animales de una semana de edad (n=4), el área hipervariable está señalada entre las 40-100 μm. (B) Animales de 4 semanas de edad (n=3) el área hipervariable se señala entre las 70-200 μm (C) Animales de 8 semanas de edad (n=3) el área hipervariable se señala entre las 70-100 μm (D) 16 semanas de edad (n=6) el área hipervariable se señala entre las 70-120 μm (* P<0.05 ANOVA en las secciones señaladas entre animales de la misma edad).

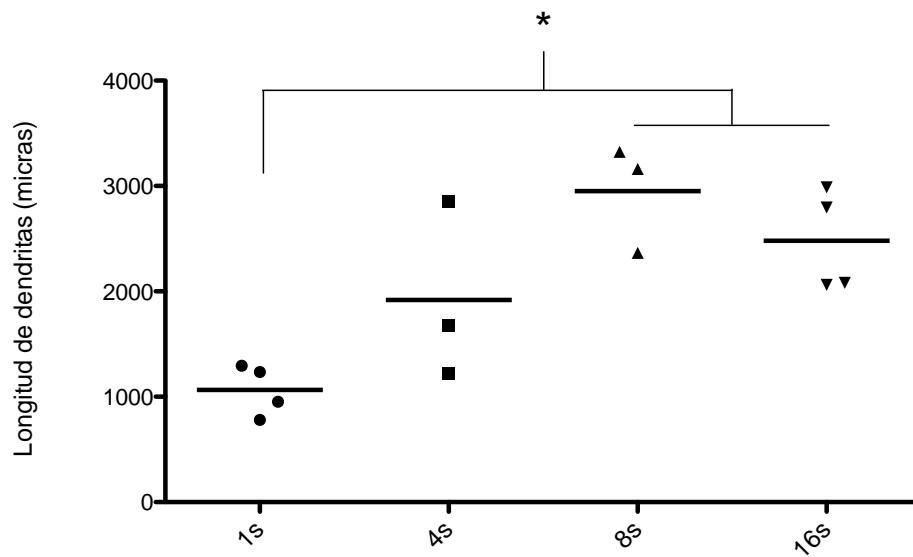


Figura 6. Longitud del total del árbol dendrítico de neuronas de la AB en animales de 1,4,8 y 16 semanas de edad (* $P < 0.05$ entre 1era semana y 8 y 16 semanas de edad Kruskal-Wallis).

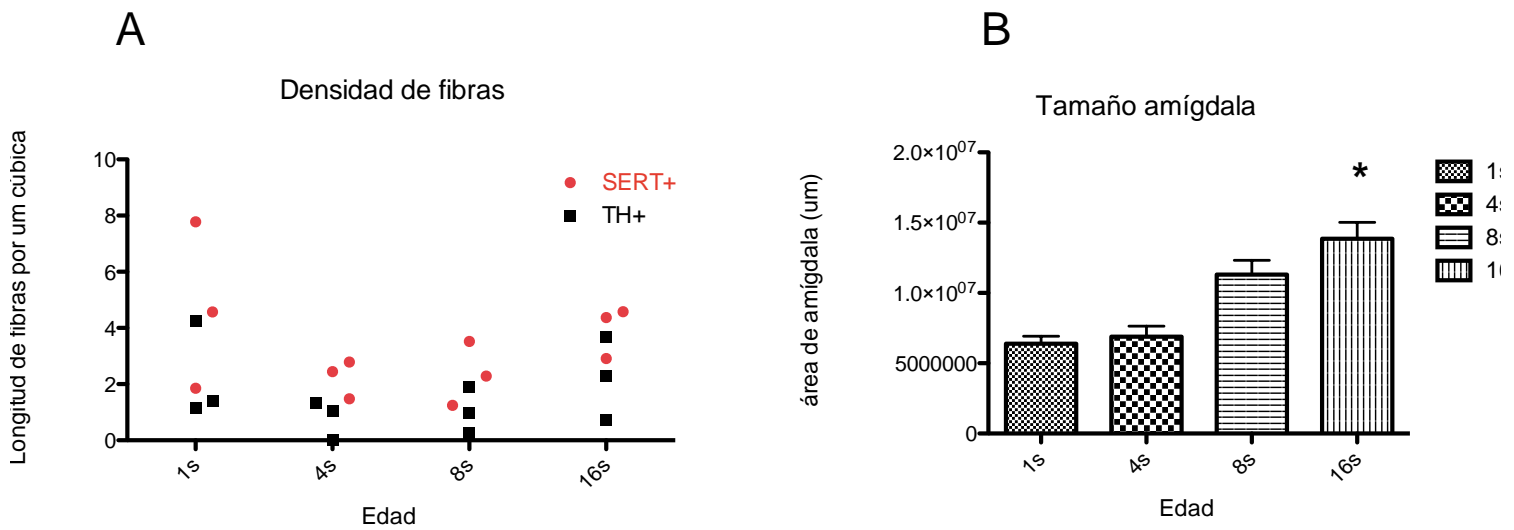


Figura 7. (A) Densidad de fibras, por unidad de volumen, marcadas positivamente para SERT o TH en la amígdala basolateral de animales de 1, 4, 8 y 16 semanas de edad. (B) Área de amígdala muestreada en 3 animales por edad. Se muestran animales de 1, 4, 8 y 16 semanas de edad, las medias de animales de 1 semana son diferentes a las de 8 y 16 semanas de edad (* $P < 0.05$ ANOVA).

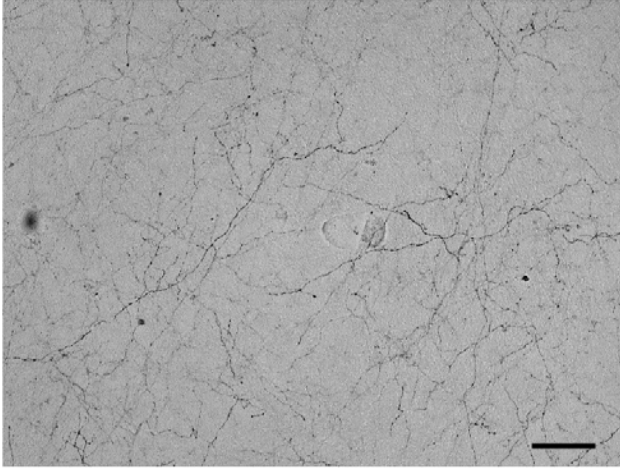
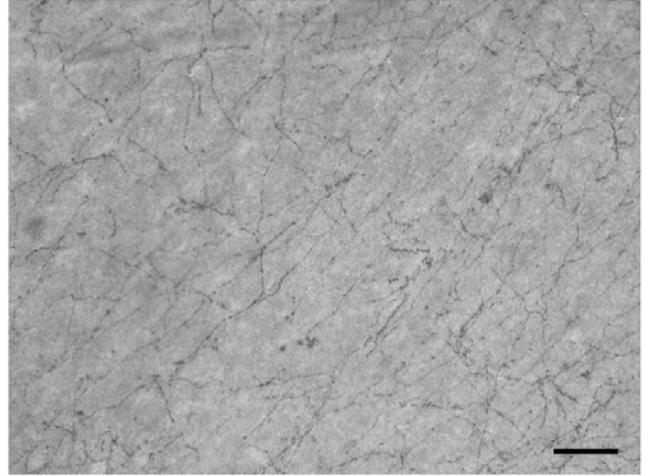
A**B**

Figura 8. Fotomicrografías representativas de las fibras de la AB de animales de 1 semana de vida. (A)Fibras positivas para TH. (B) Fibras positivas para SERT. La barra oscura indica 50 μ m.

Discusión

Uno de los problemas centrales en las biociencias es la individuación de la conducta animal. Al respecto, se cree que la individuación conductual emerge a partir de un sustrato anatómico que presenta plasticidad. Este sustrato es individualizado a través de un proceso de interacción entre el genoma y el medio ambiente pre y postnatal (Balazsi et al., 2011).

Morfología

Existen trabajos que documentan asociaciones entre la reorganización de la arquitectura dendrítica y sináptica que ocurre en respuesta a la exposición de los animales a estrés (Mitra et al 2009, Vyas et al 2002, Camp et al 2012), modificando subsecuentemente la expresión de la conducta evaluada. Sin embargo, existe poca evidencia empírica que apoye la relación entre las variaciones individuales del sustrato anatómico y de la conducta en animales en desarrollo, no sometidos a manipulaciones experimentales de ninguna índole. Es en respuesta a este déficit que el presente trabajo cobra importancia. Nosotros estudiamos la variabilidad individual de la estructura del árbol dendrítico de las neuronas de la AB en crías de gato en la primera, cuarta, octava y decimosexta semana de edad. Nuestras observaciones sugieren que si bien los árboles dendríticos incrementan su complejidad con la edad en todos los gatos, existe una región del árbol que es particularmente variable entre los individuos. Dicha región, definida por nosotros como el módulo hipervariable, va de las 70-200 μ m de distancia desde el soma. Es en este módulo en el que existen diferencias notables en la longitud de los segmentos dendríticos que lo conforman al comparar entre gatos. Dichas diferencias se atenúan considerablemente en regiones proximales y distales de los árboles. Cabe mencionar que la variabilidad entre las neuronas de un mismo individuo aumenta considerablemente a las 16 semanas de edad, dado que seleccionamos neuronas de regiones equivalentes entre animales, es posible que tal variabilidad se deba a que los árboles presentan árboles dendríticos asimétricos (es decir que dos ramas secundarias tienen diferentes longitudes) resultado del proceso de eliminación/producción ya mencionado. Para resolver si existen diferentes poblaciones neuronales en neuronas piramidales y estrelladas de la AB sólo podríamos identificarlas evaluando su actividad mediante técnicas electrofisiológicas. De esta forma, nuestros datos apoyan la existencia de un sustrato anatómico diferenciado entre individuos. Adicionalmente, las observaciones obtenidas apoyan la noción de que dicho sustrato, a nivel dendrítico en la neuronas de la AB, está

organizado modularmente en zonas de alta variación y en aquellas con baja variación interindividual.

Desarrollo

En este trabajo también exploramos la emergencia de la individualidad durante el desarrollo y un resultado interesante es que el módulo dendrítico hipervariable está presente desde la primera semana de vida, aunque su localización varía conforme el árbol dendrítico crece. Este hecho sugiere que el módulo hipervariable se establece durante etapas prenatales y/o se desarrolla rápidamente. Observaciones publicadas por otros autores apoyan la posibilidad de que una fracción importante del árbol dendrítico proximal sea generado prenatalmente mediante mecanismos de auto-ensamblaje independientes de la actividad neuronal provocada (e.g., Sadun et al., 1978, Calvet et al., 1985; Ramoa 1988). Adicionalmente, debido a que la expresión de la conducta inicia prenatalmente (e.g., Kleven et al., 2009) no sería raro que la individuación de la misma y del sustrato anatómico que la pudiese sustentar se originase también prenatalmente en respuesta a factores gestacionales, como estrés o ansiedad materna, mediante mecanismos epigenéticos (para revisión ver Monk et al., 2012 y Canli et al., 2006). Estudios posteriores deberán evaluar la ontogenia de los árboles dendríticos de las neuronas de la AB al nacimiento e incluso en etapas postnatales tempranas, para verificar la existencia de diferencias interindividuales prenatales y perinatales.

El módulo dendrítico hipervariable en las neuronas de la AB está constituido por ramas dendríticas de distintos órdenes aunque exista un cierto predominio de las ramas de menor orden particularmente de aquellas consideradas entre el primero y quinto órdenes (ver figura 3). Esto significa que las diferencias individuales de este módulo se originan con base en la modificación de todo el árbol dendrítico ubicado a cierta distancia del cuerpo (ver también Adamec 2009, 2012).

Una de las teorías dominantes en la neurobiología del desarrollo aduce que durante el desarrollo postnatal temprano las conexiones en diversas zonas cerebrales son producidas en números que exceden las necesarias para lograr un funcionamiento óptimo. Esta situación se “corrige” a través de un proceso de “poda” o eliminación de aquellos procesos dendríticos con mayor actividad neuronal (e.g., Hata et al 1999). Nuestros datos sugieren, sin embargo, que la maduración de los circuitos neuronales en la AB no encaja completamente en el modelo clásico, debido a que documentamos la eliminación de algunas de las ramas distales entre los órdenes séptimo y onceavo, en paralelo al incremento en longitud de los procesos remanentes

lo que conllevó a incremento neto de la longitud de los árboles. Aún cuando no sabemos si la remodelación de los arboles dendríticos en nuestro modelo sigue un criterio de actividad, nuestros resultados sugieren que existe un proceso de eliminación y producción de dendritas (Uribe-Querol et al., 2013). Esta conclusión, sin embargo, no parece aplicarse a las aferentes serotoninérgicas y catecolaminérgicas cuya densidad se mantiene relativamente estable en la AB durante los primeros cuatro meses de vida postnatal. Es presumible sin embargo que estas aferentes también transiten por un proceso de remodelación de sus terminales para el que el parámetro de la densidad de fibras no sea sensible. En el caso de las fibras serotoninérgicas cabría hacer un análisis considerando a los botones como las unidades funcionales como los que se han hecho recientemente (Miceli et al., 2013). También se debe considerar que aún cuando la densidad de fibras sea estable, tanto la serotonina como la dopamina pueden ejercer sus efectos, no sólo de manera sináptica, sino también volumétrica, sobre post-sinapsis con receptores variables (ver Pérez de la Mora et al 2012, Asan et al., 2013). Estudios futuros de trazado anterógrado deberán establecer el patrón de desarrollo postnatal de la aferentes serotoninérgicas y catecolaminérgicas para resolver la estrategia que siguen para ensamblar los circuitos neuronales en la AB.

Finalmente la AB participa en el circuito neural responsable de las respuestas de ansiedad y temor, entre otras expresiones conductuales, (Pare & Duvarci 2012) y es una estructura que forma parte de un circuito que incluye a la corteza prefrontal, al tálamo sensorial y al hipocampo (Pinard CR et al.,2012; Muller et al., 2006). En conjunto, estas estructuras mediante el procesamiento de la información sensorial brindan la posibilidad de matizar la percepción los estímulos (e.g. Kong et al., 2013). Así, es posible que las variaciones interindividuales observadas en el módulo dendrítico hipervariable se asocien a las diferencias individuales que en la expresión de la conducta de ansiedad han sido recientemente reportadas en gatos de las mismas edades, pertenecientes a la misma camada, de las aquí estudiadas por el grupo de la Dra. Hudson (datos no publicados). Este grupo también ha documentado que si bien la expresión conductual gatuna individualizada de la ansiedad está presente al nacimiento y perdura hasta las 16 semanas de edad, la intensidad de la misma se atenúa con el avance de la edad. En este contexto resulta interesante remarcar el hecho de que la eliminación de ramas distales de las neuronas de la AB y la disminución de la variabilidad en la densidad de fibras serotoninérgicas y catecolaminérgicas parecen ocurrir en periodos de tiempo similares a la atenuación de la intensidad de las respuestas de ansiedad en

los animales muestreados. Es claro que estudios posteriores se requerirán para corroborar las implicaciones de la coincidencia temporal de los eventos estructurales y conductuales referidos, en torno a la emergencia de individualidad y de su sustrato anatómico .

Conclusión

Este trabajo confirma la hipótesis de la existencia de un módulo hipervariable, entre 70-200 micras del soma, en los árboles dendríticos de la AB entre diferentes individuos de una misma especie, en este caso *Felis catus*. Este módulo se había descrito en modelos murinos de condicionamiento aversivo, sin embargo nosotros encontramos que es un módulo que existe en los animales sin inducir condicionamiento. Un resultado inesperado fue encontrar dicho módulo en los árboles dendríticos de neuronas de la AB desde la primera semana de edad, lo que indica que la ramificación de los árboles de neuronas de ésta estructura es muy temprana.

Con base en los resultados mostrados en este trabajo, es indispensable correlacionar las diferencias morfológicas que encontramos con la conducta presentada por animales de la misma edad en un estudio futuro.

Bibliografía

- Adamec R, Hebert M, Blundell J, Mervis RF. 2012. **Dendritic morphology of amígdala and hippocampal neurons in more and less predator stress responsive rats and more and less spontaneously anxious handled controls.** Behav Brain Res. Jan 1;226(1):133-46
- Balázsi G, van Oudenaarden A, Collins JJ. 2011. **Cellular decision making and biological noise: from microbes to mammals.** Cell. Mar 18;144(6):910-25.
- Bendesky A, Bargmann CI. 2011. **Genetic contributions to behavioural diversity at the gene-environment interface.** Nat Rev Genet. Nov 8;12(12):809-20.
- Bengoetxea H, Ortuzar N, Bulnes S, Rico-Barrio I, Lafuente JV, Argandoña EG. 2012. **Enriched and deprived sensory experience induces structural changes and rewires connectivity during the postnatal development of the brain.** Neural Plast.;2012:305693.
- Brinley-Reed M, McDonald AJ. 1999. **Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amígdala.** Brain Res. Dec 11;850(1-2):127-35.
- Bush DE, Sotres-Bayon F, LeDoux JE. 2007. **Individual differences in fear: isolating fear reactivity and fear recovery phenotypes.** J Trauma stress. 20(4):413-22
- Calvet MC, Calvet J, Camacho-Garcia R. 1985. **The Purkinje cell dendritic tree: a computer-aided study of its development in the cat and in culture.** Brain Res. Apr 8;331(2):235-50
- Camp MC, Macpherson KP, Lederle L, Graybeal C, Gaburro S, Debrouse LM, Ihne JL, Bravo JA, O'Connor RM, Ciochi S, Wellman CL, Lüthi A, Cryan JF, Singewald N, Holmes A. 2012. **Genetic strain differences in learned fear inhibition associated with variation in neuroendocrine, autonomic and amygdala dendritic phenotypes.** Neuropsychopharmacology. May;37(6):1534-47
- Canli T, Qiu M, Omura K, Congdon E, Haas BW, Amin Z, Herrmann MJ, Constable RT, Lesch KP. 2006. **Neural correlates of epigenesis.** Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 24;103(43):16033-8.
- Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, Taylor A, Poulton R. 2002. **Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children.** Science. Aug 2;297(5582):851-4
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. 2003. **Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene.** Science. 2003 Jul 18;301(5631):386-9.
- Cook SC, Wellman CL. 2004. **Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex.** J Neurobiol. Aug;60(2):236-48.
- Feaver JA; Mendl M and Bateson P. 1986. **A method for rating the individual distinctiveness of domestic cats.** Anim Behav. 34:1016-1025
- Govindarajan A, Rao BS, Nair D, Trinh M, Mawjee N, Tonegawa S, Chattarji S. 2006. **Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects.** Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 29;103(35):13208-13
- Hata Y, Tsumoto T, Stryker MP. 1999. **Selective pruning of more active afferents when cat visual cortex is pharmacologically inhibited.** Neuron. Feb;22(2):375-81
- Inoue T, Li XB, Abekawa T, Kitaichi Y, Izumi T, Nakagawa S, Koyama T. 2004 **Selective serotonin reuptake inhibitor reduces conditioned fear through its effect in the amygdala.** Eur J Pharmacol. Aug 30;497(3):311-6.
- Kleven GA, Ronca AE. 2009. **Prenatal behavior of the C57BL/6J mouse: a promising model for human fetal movement during early to mid-gestation.** Dev Psychobiol. Jan;51(1):84-94.

- Knafo S, Venero C, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Gonzalez-Soriano J, Ferrer I, Santpere G, DeFelipe J. 2009. **Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.** *J Pathol. Sep*;219(1):41-51
- Kong L, Chen K, Tang Y, Wu F, Driesen N, Womer F, Fan G, Ren L, Jiang W, Cao Y, Blumberg HP, Xu K, Wang F. **Functional connectivity between the amygdala and prefrontal cortex in medication-naïve individuals with major depressive disorder.** *J Psychiatry Neurosci.* 2013 Aug 20;38(5):120117.
- Lajud N, Roque A, Cajero M, Gutiérrez-Ospina G, Torner L. 2012. **Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hypo-responsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood.** *Psychoneuroendocrinology.* Mar;37(3):410-20.
- McEwen BS, Getz L. 2013. **Lifetime experiences, the brain and personalized medicine: an integrative perspective.** *Metabolism.* Jan;62 Suppl 1:S20-6.
- Miceli S, Negwer M, van Eijs F, Kalkhoven C, van Lierop I, Homberg J, Schubert D. 2013. **High serotonin levels during brain development alter the structural input-output connectivity of neural networks in the rat somatosensory layer IV.** *Front Cell Neurosci.* 7:88.
- Mitra R, Adamec R, Sapolsky R. 2009. **Resilience against predator stress and dendritic morphology of amygdala neurons.** *Behav Brain Res.* Dec 28;205(2):535-43.
- Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. 2005. **Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 28;102(26):9371-6.
- Monk C, Spicer J, Champagne FA. 2012. **Linking prenatal maternal adversity to developmental outcomes in infants: the role of epigenetic pathways.** *Dev Psychopathol.* 2012 Nov;24(4):1361-76.
- Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. 2006. **Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons.** *J Comp Neurol.* 494(4):635-50
- Myasnikov AA, Dykes RW, Leclerc SS. 1997. **Correlating cytoarchitecture and function in cat primary somatosensory cortex: the challenge of individual differences.** *Brain Res.* Mar 7;750(1-2):95-108.
- Oler JA, Fox AS, Shelton SE, Rogers J, Dyer TD, Davidson RJ, Shelledy W, Oakes TR, Blangero J, Kalin NH. 2010. **Amygdalar and hippocampal substrates of anxious temperament differ in their heritability.** *Nature.* Aug 12;466(7308):864-8.
- Pabba M. 2013. **Evolutionary development of the amygdaloid complex.** *Front Neuroanat.* Aug 28; 7:27
- Pare D, Duvarci S. 2012. **Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction.** *Curr Opin Neurobiol.* Aug;22(4):717-23.
- Perez de la Mora M, Gallegos-Cari A, Crespo-Ramirez M, Marcellino D, Hansson AC, Fuxe K. **Distribution of dopamine D(2)-like receptors in the rat amygdala and their role in the modulation of unconditioned fear and anxiety.** *Neuroscience.* 2012 Jan 10;201:252-66.
- Pinard CR, Mascagni F, McDonald AJ. 2012. **Medial prefrontal cortical innervation of the intercalated nuclear region of the amygdala.** *Neuroscience.* Mar 15;205:112-24.
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2006. **Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex.** *Cereb Cortex.* Mar;16(3):313-20.
- Ramoas AS, Campbell G, Shatz CJ. 1988. **Dendritic growth and remodeling of cat retinal ganglion cells during fetal and postnatal development.** *Journal of Neuroscience.* 8, 4239-4261

- Sadun AA, Pappas GD. 1978. **Development of distinct cell types in the feline red nucleus: a Golgi-Cox and electron microscopic study.** J Comp Neurol. Nov 15;182(2):325-65.
- Schrey AW, Richards CL, Meller V, Sollars V, Ruden DM. 2012. **The role of epigenetics in evolution: the extended synthesis.** Genet Res Int.;2012:286164.
- Sherren N, Pappas BA. 2005. **Selective acetylcholine and dopamine lesions in neonatal rats produce distinct patterns of cortical dendritic atrophy in adulthood.** Neuroscience. 2005;136(2):445-56
- Skinner MK, Anway MD, Savenkova MI, Gore AC, Crews D. 2008. **Transgenerational epigenetic programming of the brain transcriptome and anxiety behavior.** PLoS One.;3(11):e3745.
- Tosini G, Ye K, Iuvone PM. 2012. **N-acetylserotonin:neuroprotection, neurogenesis and the sleepy brain.** Neuroscientist. Dec;18(6):645-53.
- Uribe-Querol E, Martínez-Martínez E, Hernández LR, Padilla-Cortés P, Merchant-Larios H, Gutierrez-Ospina G. 2013. **Selective and constructive mechanisms contribute to neural circuit formation in the barrel cortex of the developing rat.** Advances in Bioscience and Biotechnology 4: 785-797
- Van den Bergh BRH, Mulder EJH, Mennes M, Glover V. 2005. **Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review.** Neuroscience and biobehavioral Reviews 29:237-258
- van Ijzendoorn MH, Belsky J, Bakermans-Kranenburg MJ. 2012. **Serotonin transporter genotype 5HTTLPR as a marker of differential susceptibility? A meta-analysis of child and adolescent gene-by-environment studies.** Transl Psychiatry. Aug 7;2:e147
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana R, Chattarji S. 2002. **Chronic Stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons.** Neuroscience. 22(15):6810-6818
- Wellman CL, Izquierdo A, Garrett JE, Martin KP, Carroll J, Millstein R, Lesch KP, Murphy DL, Holmes A. 2007. **Impaired stress coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice.** J Neurosci Jan 17;27(3):684-91.
- Wurzman R, Giordano J. 2012. **Differential susceptibility to plasticity: a 'missing link' between gene-culture co-evolution and neuropsychiatric spectrum disorders?** BMC Med. Apr 17;10:37.