



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**Expresión de trombospondina-1 (TSP-1) en hipocampo de  
ratones expuestos a separación materna.**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

**P R E S E N T A :**  
**EDWIN ROBERTO RAMÍREZ BENÍTEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**  
**DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ**

**REVISORA:**  
**DRA. OLGA ARACELI ROJAS RAMOS**

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2019



**Facultad  
de Psicología**



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.

Proyecto apoyado por PAPIIT-IN304817

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

## Agradecimientos

A mis padres, a quienes dedico este trabajo, gracias por criarme con amor, con valores y con una educación de calidad, por su incondicional apoyo en las decisiones que he tomado, por hacer un sinnúmero de sacrificios y pudiera dedicarme exclusivamente a estudiar, quiero que se sientan orgullosos, porque gracias a ustedes he podido concluir una etapa más en mi vida. A mi hermano, un exitoso Ingeniero Químico y una gran persona, te agradezco por tu apoyo y por tus acertados consejos, tus ganas por aprender y buscar nuevos retos me han motivado desde que era muy pequeño y me han impulsado a superar mis límites, te quiero hermano.

A toda mi familia, a mis abuelos, aunque sólo esté con nosotros mi abuela materna, gracias por haber criado a tan buenos padres, por darles todo lo necesario. A mis tíos y tías por su apoyo y cariño, a mis primos, con los que crecí jugando, riendo y aprendiendo, no tengo duda que cumplirá todo lo que se propongan, les deseo éxito en todos sus proyectos de vida.

La consumación de este trabajo también refleja la motivación que adquirí por grandes personas (maestro, amigos y compañeros) que conocí durante mi desarrollo profesional, especialmente desde mi paso por el Colegio de Ciencias y Humanidades, una etapa invaluable, que me introdujo por primera vez en el ámbito científico, impulsándome a desarrollar un pensamiento crítico y valorar lo bello que es conocer y aprender.

Le agradezco a la UNAM por permitirme conocer y disfrutar de sus grandes instalaciones, así como de su diversidad de eventos culturales, deportivos y de divulgación científica, por poder aprender de grandes investigadores y darme las habilidades que necesitaré como futuro investigador. A mis amigos y compañeros que compartieron esta etapa de mi formación Alvaro, Fernanda, Diana, Tabatha, Brenda, Lorena, Jazmin, Arturo, Jesús, Mich, Cesar, Ilse, Silvia, Paola, Issac, y Areli. A ti Lau que llegaste en el momento ideal a mi vida, tu que siempre me animabas cuando me estresaba midiendo espinas o mientras escribía la tesis, gracias por ayudarme a mejorar mis ponencias, por siempre ser tan alegre y positiva conmigo, quedan en nuestras memorias las increíbles experiencias que hemos pasado juntos, gracias por todo tu apoyo, confianza y cariño.

Al Dr. Octavio por darme su confianza y la oportunidad de entrenarme en su laboratorio, por el tiempo que dedicó a resolver mis dudas y a corregir mi trabajo, por permitirme exponer mis resultados en diversos congresos, pero sobre todo por iniciarme en la investigación, por la motivación y los consejos para realizar un posgrado, sin duda, la estancia de investigación al extranjero será una experiencia enriquecedora, la cual no hubiera podido ser sin su asesoría, estaré eternamente agradecido, definitivamente vi en un usted un ejemplo de cómo hacer ciencia y me quedo con una frase que menciona constantemente “uno siempre debe de estar actualizado y desarrollar la habilidad de maravillarse por los fenómenos de la naturaleza”.

A mis amigos del laboratorio, porque eso son, mis amigos, me llevo grandes recuerdos de ustedes, por esas pláticas eternas en el laboratorio, acompañado de grandes risas y chistes, por permitirme conocerlos mejor, cómo olvidar todas las divertidas salidas que tuvimos, sin duda los llevaré en mis circuitos neuronales, son grandes personas y grandes psicólogos, aprendí mucho de cada uno de ustedes Enrique, Miroslava, Jazmín, Arturo, Omar, sofía, Luz y Celeste.

Miroslava, gracias por instruirme en mis inicios en el laboratorio, por enseñarme a trabajar y retroalimentar mi proyecto.

Arturo, por ayudarme en el laboratorio siempre que lo necesitaba y por tus consejos sobre mi trabajo.

A mis asesores por sus amables y atinadas correcciones en este trabajo.

“Hay un concepto que proviene de la religión, pero es más amplio que ese contexto que la origina: la fe. Tener fe es creer en lo que no se ve, es la certeza de lo que se espera y se quiere y es la convicción de lo que no aparece ante nuestros ojos. Como decía alguien: las batallas en la vida no son para los más fuertes o los más veloces. Tarde o temprano, los que ganan son lo que creen que pueden ganar.  
-Corral Herrera

La importancia de la ciencia y de su divulgación es porque finalmente lo que hacen es democratizar el conocimiento y motivar a las siguientes generaciones, definitivamente es un derecho de la humanidad.  
-Antonio Lazcano.

## Índice

Lista de abreviaturas .....	7
Resumen.....	8
Introducción .....	9
1. Las Trombospondinas (TSPs) .....	11
1.1 Trombospondina-1 (TSP-1) .....	12
1.2 Trombospondina-1 (TSP-1) y sus funciones cerebrales .....	14
2. Espinas dendríticas .....	15
3. Separación materna.....	17
3.1 Modelos de separación materna .....	18
3.2 Cambios neuroanatómicos relacionados con la SM.....	20
3.3 Hipocampo y SM.....	21
3.4 Espinas dendríticas y SM .....	22
4. Justificación.....	26
5. Objetivos .....	27
6. Hipótesis.....	27
7. Materiales y Método .....	28
7.1 Animales .....	28
7.2 Procedimiento.....	29
7.3 Disección hipocampal. ....	32
7.4 Cuantificación de TSP-1. ....	33
7.5 Impregnación de Golgi .....	34
7.6 Análisis de la morfología neuronal.....	34
7.7 Análisis estadístico .....	36
8. Resultados .....	37
9. Discusión.....	46
10. Conclusiones .....	50
11. Referencias .....	51

## Lista de abreviaturas

<b>AC</b>	Corteza del Cíngulo
<b>AMPA</b>	Acido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>BLA</b>	Amígdala basolateral
<b>CA</b>	Cuerno de Ammon
<b>CAMKII</b>	Calcio Calmodulina quinasa II
<b>CF</b>	Corteza Frontal
<b>CM</b>	Corteza Motora
<b>CPF</b>	Corteza Prefrontal
<b>CR</b>	Corteza Retrosplenial
<b>DPN</b>	Día postnatal
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidermal
<b>GluR</b>	Receptor Glutamatérgico
<b>LTD</b>	Depresión a Corto Plazo
<b>LTP</b>	Potenciación a Largo Plazo
<b>MT</b>	Manipulación temprana
<b>NA</b>	Núcleo <i>Accumbens</i>
<b>NMDA</b>	De N-metil-D-aspartato
<b>PL</b>	Corteza Prelímbica
<b>SM</b>	Separación materna
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SSC</b>	Corteza Somatosensorial
<b>TSP-1</b>	Trombospondina-1
<b>TSP</b>	Trombospondina
<b>TSRs</b>	Regiones con secuencias repetidas tipo 1

## Resumen

La Trombospondina-1 (TSP-1), es una glicoproteína de matriz extracelular, de origen sanguíneo implicada en procesos de cicatrización, angiogénesis y migración celular. En el cerebro, la TSP-1 es sintetizada y secretada por los astrocitos, donde participa en la modulación de la sinaptogénesis, espinogénesis y diferenciación neuronal en las primeras etapas del desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC). La TSP-1 mejora el aprendizaje espacial y favorece la recuperación motora después de un evento isquémico en ratones, sugiriendo su participación en procesos de plasticidad cerebral.

La separación materna (SM), es un modelo utilizado para producir experiencias tempranas adversas durante las primeras semanas de vida en los mamíferos. Roedores expuestos a una SM presentan alteraciones en la generación de neuronas, modificación de la arborización dendrítica, así como alteraciones en la densidad sináptica y número de espinas dendríticas. Sin embargo, se desconoce si la TSP-1 podría participar en estos procesos, por lo que en esta tesis se buscó establecer si la SM modifica la expresión de TSP-1 y esto correlacionaba con alteraciones en la morfología de las espinas dendríticas hipocampales. Nuestros resultados demuestran que la SM produce una disminución de casi un 70% en los niveles de TSP-1. Un análisis detallado de la morfología de las espinas dendríticas reveló que la SM produce alteraciones en el área de la cabeza de las espinas, pero no en su diámetro, adicionalmente la SM produce cambios en el ancho y longitud del cuello de la espina, sugiriendo espinas con cabezas con mayor volumen y cuellos más largos y delgados. Además, se encontró que los niveles de TSP-1 correlacionaron con los cambios en la morfología de la espina dendrítica. Estos resultados sugieren que la TSP-1 podría estar involucrada en los cambios en la morfología neuronal inducidos por la SM.

**Palabras clave:** Trombospondina-1 (TSP-1), separación materna (SM), dendritas, espinas dendríticas, plasticidad neuronal.

## Introducción

Las Trombospondinas (TSPs) son glicoproteínas oligoméricas que pertenecen a un grupo de proteínas de membrana extracelular. Las TSPs están involucradas en diversos procesos celulares y de acuerdo con su estado de multimerización y de dominio estructural se dividen en dos grupos: subgrupo A, conformada por la TSP-1 y TSP-2 distinguidas por tener una estructura trimérica y subgrupo B, constituida por TSP-3, TSP-4 y TSP-5, las cuales presentan una estructura pentamérica (Adams, 2001; Adams y Lawler, 2004; Bornstein, 2009; Adams y Lawler, 2011).

La TSP-1 es una glicoproteína de unión a calcio que es liberada por los gránulos  $\alpha$ -plaquetarios (Blair y Flaumenhaft, 2009) en respuesta a una activación por trombina. En el cerebro la TSP-1 es sintetizada y liberada principalmente por los astrocitos, durante las primeras etapas del desarrollo posnatal (Asch, Lawrence, Shapiro y Nachman, 1986), estimulando el crecimiento de neuritas, migración neuronal, diferenciación neuronal y sinaptogénesis, a partir de la interacción con el receptor  $\alpha 2\beta$ -1 gabapentina y del receptor a neuroigina-1 (Christopherson et al., 2005; Eroglu, 2009a; Risher et al., 2018; Yu et al., 2008). La presencia de TSP-1 aumenta el número de sinápsis excitatorias y modula la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas, además mejora el aprendizaje espacial y ayuda a la recuperación motora después de un evento isquémico (Cheng et al., 2016; García, Torres, Helguera, Coskun y Busciglio 2010; Kang et al., 2018). La ausencia de TSP-1 provoca la disminución en el número de sinápsis excitatorias, favorece a la hiperexcitabilidad y al desarrollo de epilepsia generalizada (Christopherson et al., 2005; Mendus, Rankin-Gee, Mustapha y Porter, 2015; Santolini et al., 2017), sugiriendo su participación en procesos de desarrollo y plasticidad sináptica.

La separación materna (SM) es un modelo que permite estudiar el papel de experiencias adversas en la fisiología y comportamiento de los organismos en etapas tempranas del desarrollo. La SM consisten en aislar a las crías del cuidado de la madre y del contacto con resto de la camada. Existen diferentes modelos de SM, pero de manera general se clasifican en dos tipos: manipulación temprana (MT), que consiste en aislar a las crías por un periodo de 5-15 minutos y la propia SM, que implica el aislamiento de las crías por un periodo de

aproximadamente 60-180 minutos (Franklin et al., 2012). La SM produce cambios en la morfología neuronal, particularmente se ha observado que la densidad de las espinas dendríticas se ve afectada. Las espinas dendríticas son las principales terminales postsinápticas excitatorias del SNC (Blanchoin, Boujemaa-Paterski y Plastino, 2014) y son el mayor sitio de plasticidad cerebral, la importancia de su estudio reside en que un desarrollo estructural anormal afectará diversas funciones cognitivas y conductuales. Las espinas están constituidas en su mayoría por filamentos de actina que permite a la espina dendrítica adaptar diferentes formas, así como la maduración y mantenimiento de los circuitos neuronales (Blanchoin, Boujemaa-Paterski y Plastino, 2014).

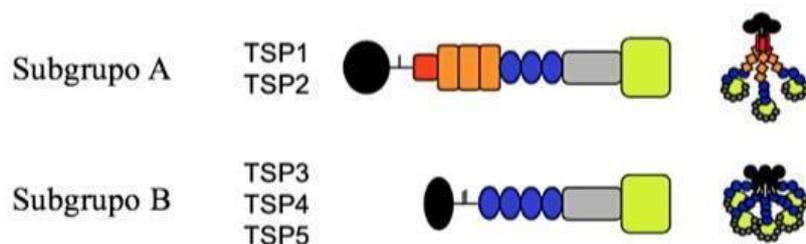
El hipocampo es una estructura ubicada en el lóbulo temporal medial. Se ha relacionado con procesos cognoscitivos como: adquisición y consolidación de la memoria, aprendizaje, así como modulación de interacciones sociales y emocionales (Kolb y Whishaw, 2003). Diversos trabajos han demostrado que los cuidados maternos deficientes durante los primeros días postnatales influyen en el desarrollo y maduración del hipocampo y perturban el estado fisiológico y anatómico de ésta estructura (Keresztes, Ngo, Lindenberger, Bergner y Newcombe, 2018; Kim et al., 2015; McEwen, 2016). Particularmente, se ha observado que altera la arborización dendrítica y disminuye la densidad de espinas dendríticas (Melo, Antoniazzi, Hossain y Kolb, 2018; Monroy et al., 2010). Sin embargo, se desconoce los mecanismos celulares que podría estar involucrados en este proceso, por lo que el objetivo de la presente tesis fue conocer si la TSP-1 podría estar implicada en las alteraciones neuronales inducidas por la SM.

## 1. Las Trombospondinas (TSPs)

Las Trombospondinas (TSPs) son glicoproteínas oligoméricas, pertenecientes a un grupo de proteínas de membrana extracelular. Las TSPs pueden interactuar con un gran número de receptores de membrana celular y con una variedad de proteínas de matriz extracelular, lo que le permite tener interacciones célula-célula y célula-matriz (Adams y Lawler, 2011; Wu et al., 2017).

Las TSPs han sido involucradas en proceso de migración celular, cicatrización, inflamación, respuesta inmune, angiogénesis, homeostasis tisular, apoptóticos, lesiones ateroscleróticas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, así como mantenimiento, integridad y función del miocardio, entre otras, lo que sugiere un papel importante de las TSPs como activadores y/o moduladores de procesos patológicos y fisiológicos (Adams, 2001; Adams y Lawler, 2011; Bornstein et al., 2009; Bujak et al., 2014; Chistiakov, Melnichenko, Myasoedova, Grechko y Orekhov, 2017; Liu et al., 2015; Zhang y Lawler, 2007).

Las TSPs comparten cierta homología estructural que incluye: una región carboxílica terminal, 2-3 dominios de unión al Factor de Crecimiento Epidermal (EFG, por sus siglas en inglés), un dominio de unión a calcio y en su porción amino terminal dominio de tipo C que se une al factor de Von Willebrand (Adams y Lawler, 2004; Chen, Herndon y Lawyer, 2000). De acuerdo con su estado de multimerización y dominio estructural, las TSPs se dividen en dos grupos: el subgrupo A, que incluye la TSP-1 y TSP-2, caracterizado por tener una estructura trimérica y el subgrupo B, conformada por la TSP-3, TSP-4 y TSP-5, las cuales presentan una estructura pentamérica (Figura 1) (Adams, 2001; Adams y Lawler, 2004; Bornstein, 2009; Adams y Lawler, 2011).



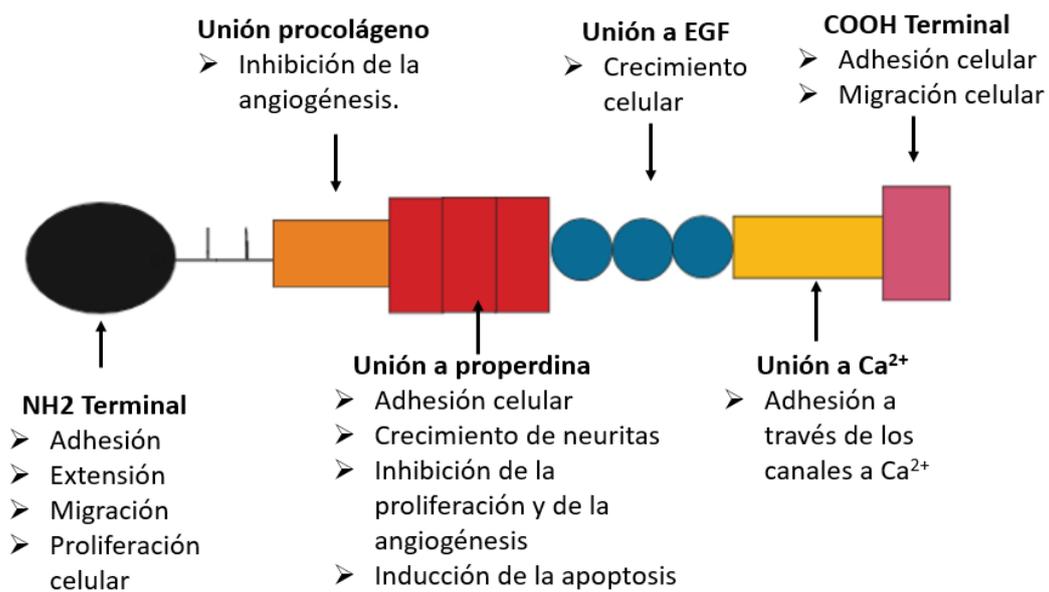
**Figura 1. Representación esquemática de las Trombospondinas (TSPs).** Las TSPs están divididas en dos subgrupos. El subgrupo “A” agrupa a las TSPs con estructura trimérica y el subgrupo B a las TSPs con estructura pentamérica. La TSPs están constituida por un dominio N-terminal (negro), repeticiones procolágeno (roja), repeticiones de properdina (naranja), repeticiones EGF (azul), repeticiones de unión a calcio (Gris) y su porción amino terminal el dominio de tipo C que se une al factor de Von Willebrand (verde) (modificado de Eroglu et al., 2009b).

### 1.1 Trombospondina-1 (TSP-1)

La trombospondina-1 (TSP-1), es una glicoproteína de unión a calcio que es liberada por los gránulos  $\alpha$ -plaquetarios (Blair y Flaumenhaft, 2009) en respuesta a una activación por trombina. La TSP-1 fue el primer miembro de la familia de TSPs en ser identificado como un factor clave en el microambiente tumoral. La TSP-1 es una proteína homotrimérica de aproximadamente 450kDa constituida por tres cadenas peptídicas idénticas unidas a través de puentes disulfuro (Chen et al., 2000). Estructuralmente la TSP-1 está constituida por : 1) un dominio N-terminal, que participa en procesos de adhesión, proliferación, migración celular, endocitosis, hemostasis y angiogénesis; 2) un sitio de unión homólogo al procolágeno, que funciona como unidad de ensamblaje de inhibición de la angiogénesis; 3) tres regiones con secuencias repetidas, conocidas como secuencias tipo I (TSRs) o de unión a properdina, que facilita la adhesión celular, crecimiento de neuritas, apoptosis e inhibe la proliferación y angiogénesis; 4) secuencias tipo II que contiene un sitio de unión al (EGF), conformado por los sitios de unión a la heparina, seguido por regiones que contienen secuencias de aminoácidos con homología al procolágeno, properdina, EFG, que favorece al crecimiento celular; y secuencias tipo III (TSR3s) o sitio de unión a calcio, involucrado en la adhesión celular por medio de canales de calcio (Huang, Sun, Yuan y Qiu, 2017); y 5) un dominio carboxilo terminal, implicada en la agregación plaquetaria, en la adhesión y migración celular (Carlson, Lawyer y Mosher, 2008; Chen et al., 2000) (Figura 2). Debido a esta estructura molecular, la TSP-1 interactúa con diferentes ligandos, incluyendo componentes estructurales de la matriz extracelular y receptores como:  $\alpha 2\beta - 1$  gabapentina CD36, CD47, TNF-R1, TGF-B y MMP-9, factores de crecimiento, citoquinas y proteasas (Resovi, Pinessi, Chiorino y Taraboletti, 2014), la interacción con cada uno de estos receptores permite su participación en procesos como: la angiogénesis, coagulación, respuesta inflamatoria, crecimiento celular, vías de proliferación de células de la musculatura lisa, apoptosis y estimulación de la

actividad de macrófagos (Adams y Lawyer, 2004; Chen et al., 2000; Huang et al., 2017; López-Dee, Pidcock y Gutiérrez, 2011; Maier et al., 2016; Stenina-Adognravi, 2014; Urao et al., 2017).

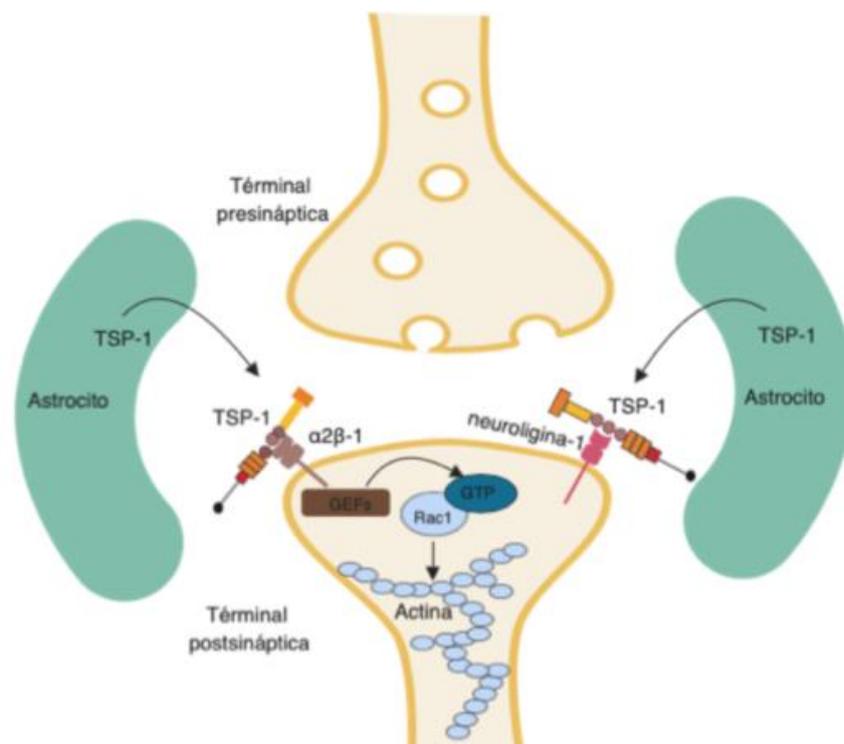
**Figura 2. Estructura y dominios de la trombospondina-1 (TSP-1).** La representación gráfica muestra los dominios de la TSP-1, cada dominio señalada por flechas tiene una función celular



particular que depende del receptor al que se una (Modificado de Lawler, 2000).

## 1.2 Trombospondina-1 (TSP-1) y sus funciones cerebrales

En el Sistema Nervioso Central (SNC), la TSP-1 es sintetizada y secretada por los astrocitos (Asch, Lawrence, Shapiro y Nachman, 1986), principalmente durante las primeras etapas del desarrollo posnatal (Adams y Tucker, 2000). Su expresión durante este periodo hace que interactue con receptores  $\alpha 2\beta - 1$  gabapentina y receptores a neuroligina-1, estimulando el crecimiento de neuritas, migración neuronal, diferenciación neuronal, sinaptogénesis y formación de espinas maduras a través de vías de señalización que incluyen la vía del Factor de Intercambio de Nucleótido de Guanina (GEFs, por sus siglas en inglés) y la vía de RAS. (Figura 3) (Christopherson et al., 2005; Eroglu, 2009a; Risher et al., 2018; Yu et al., 2008).



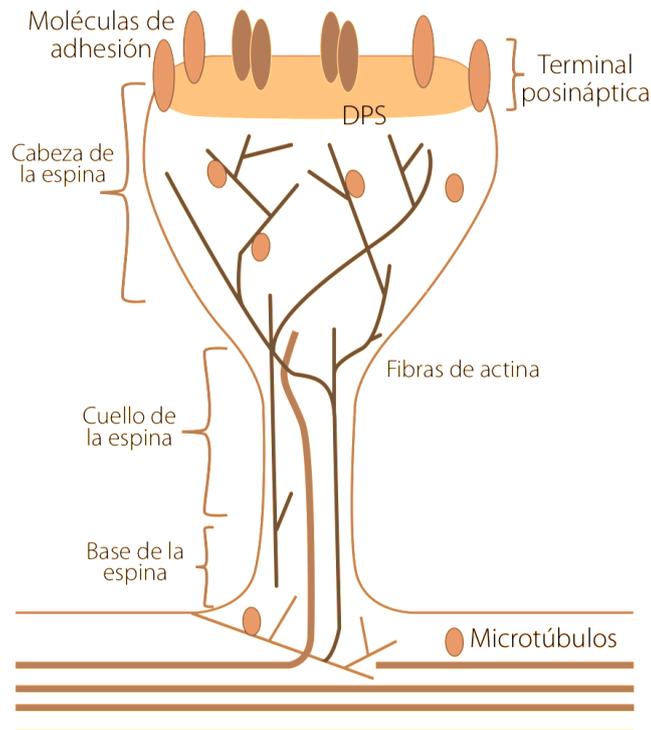
**Figura 3. Representación esquemática de la participación de la TSP-1 en la morfología de la espinas dendrítica.** La TSP-1 puede unirse a receptores neuronales  $\alpha 2\beta - 1$  gabapentina y neuroligina-1. La TSP-1 se acopla al receptor  $\alpha 2\beta - 1$  gabapentina y mantiene la unión de la terminal presináptica con la terminal postsináptica. Posteriormente el receptor  $\alpha 2\beta - 1$  gabapentina activa la vía del Factor de Intercambio de nucleótidos de Guanina (por sus siglas en inglés, GEFs), estimulando la unión de GTP a Ras relacionado al sustrato de toxina botulínica 1 (por sus siglas en inglés, Rac1) que genera la reorganización de actina y modifica la morfología de la espinas dendrítica (Modificado de Risher et al., 2018).

En modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y síndrome de X frágil se ha observado que la presencia de TSP-1 revierte la pérdida de espinas dendríticas e incrementa el número de sinapsis (Cheng et al., 2016; García, Torres, Helguera, Coskun y Busciglio 2010; Kang et al., 2018; Min-Son et al., 2015). La TSP-1 también está involucrada en las alteraciones sinápticas provocadas por la estimulación tetánica en modelos de epilepsia (Okada-Tsuchioka et al., 2014) y se ha reportado que la TPS-1 mejora el aprendizaje espacial y la recuperación motora después de un evento isquémico (Cheng et al., 2016; Chu et al., 2015; Liauw et al., 2008). Niveles bajos de TSP-1 se asocian a un decremento del número de sinapsis excitadoras y favorecen la hiperexcitabilidad así como el desarrollo de epilepsia generalizada (Christopherson et al., 2005; Mendus, Rankin-Gee, Mustapha y Porter, 2015; Santolini et al., 2017), sugiriendo un papel importante de la TSP-1 en la formación, mantenimiento de sinapsis y en la plasticidad neuronal.

## **2. Espinas dendríticas**

Las espinas dendríticas son estructuras bulbosas y minúsculas que sobresalen de la dendrita y son consideradas las principales terminales postsinápticas excitatorias del SNC. Fueron descritas por primera vez por Santiago Ramón y Cajal durante sus estudios de células de Purkinje en el cerebelo de palomas, empleado la tinción de Golgi (Colgan y Yasuda, 2014; García-López, García Marín y Freire, 2007).

Estructuralmente, las espinas dendríticas están constituidas por filamentos de actina, ensambladas con la membrana plasmática en redes ramificadas con microtúbulos que se encuentran a lo largo del eje dendrítico (Colgan y Yasuda, 2014). Son capaces de adaptar una alta diversidad de formas, esencial para la maduración neuronal y el mantenimiento de los circuitos neuronales (Blanchoin, Boujemaa-Paterski y Plastino, 2014). De manera general, las espinas dendríticas se caracterizan por desarrollar un cuello delgado, que comunica y une físicamente a la dendrita con la cabeza de la espina (Figura 4). En la superficie de la espina se encuentran proteínas de andamiaje que contienen múltiples dominios de interacción con proteínas que de manera directa o indirectamente se unen a receptores sinápticos, desencadenando la activación o el silenciamiento de vías de señalización intracelular (Fortin, Srivastava y Soderling, 2012).



**Figura 4. Representación esquemática de la espina dendrítica.** Las espinas dendríticas están constituidas por tres estructuras: 1) la base de la espina, que une físicamente la rama dendrítica con la espina y es el punto en donde inicia el cuello; 2) el cuello es una estructura que comunica y une la dendrita con la cabeza y 3) cabeza sitio donde se encuentra la terminal postsináptica, moléculas de adhesión celular, receptores y canales iónicos. A lo largo de toda la espina desde la base hasta la cabeza se desarrollan filamentos de actina que son proteínas que le permite a la espina cambiar su forma (Obtenido de Valencia, Colín y Van der Goes, 2017).

Las espinas dendríticas son un componente clave en la modificación de la función de redes neurales, por lo que se consideran los principales sitios de plasticidad sináptica en el SNC (Minerbi et al., 2009). Los cambios en el volumen de la espina pueden mostrar fluctuaciones espontáneas (crecen y se acortan), pero sólo aquellas que son capaces de generar un contacto sináptico pueden mantenerse a lo largo del tiempo, vinculándose con diversos procesos como la potenciación y la depresión sináptica (González-Burgos, 2012). En este sentido Tonegawa, Liu, Ramirez y Redondo (2015), plantean que procesos cognoscitivos, como el aprendizaje y la memoria, producen cambios en la eficiencia sináptica a partir de la persistencia y debilitamiento de la potenciación y depresión sináptica, provocando el remodelamiento local dentro de redes neuronales relevantes (Bertling y Hotulainen, 2017).

En otros trabajos se ha observado que la inducción de la Potenciación a Largo Plazo (LTP, por sus siglas en inglés) por medio de estimulación tetánica o por experiencias de aprendizaje modifica el volumen de la cabeza de la espina así como la densidad postsináptica, aumenta el número de vesículas y la translocación de receptores AMPA y NMDA en la membrana plasmática, fortaleciendo la comunicación sináptica, a través de la maduración y el establecimiento de contactos sinápticos maduros y estables (Asrican, Lisman y Otmakhov, 2007; Hill y Zito, 2013; Matsuzaki, Honkura, Ellis-Davies y Kassai, 2004). La ausencia de LTP y la inducción de la depresión a Largo Plazo (LTD, por sus siglas en inglés), conducen a la expansión inestable que desencadena el colapso de la espina, además de reducir su volumen (Elias, Yang, Wang y Tian, 2018; Kasai et al., 2010; Nargerl, Eberhorn, Cambridge y Bonhoeffer, 2004; Redondo y Morris, 2011; Yang et al., 2008; Zhou, Homma y Poo, 2004; Zito, Scheuss, Knott, Hill y Svoboda, 2009 ). Sin embargo, los mecanismos celulares involucrados en estos procesos no se conocen totalmente

### **3. Separación materna**

En mamíferos, el cuidado parental es fundamental para el desarrollo y supervivencia de la especie. Desde las etapas de gestación, se despliegan conductas que han sido seleccionadas a través de la historia evolutiva necesarias para la supervivencia de las especies. En el caso de los humanos, las experiencias sociales forman parte indispensable del desarrollo de su SNC. El contexto social en los primeros días de vida se reduce exclusivamente al cuidador primario, que generalmente es la madre, estableciendo una relación crítica con los hijos, que influye en el desarrollo afectivo, social y cognitivo del niño (Escolano-Pérez, 2013).

Desde la gestación y aún más después del nacimiento se despliegan un repertorio de conductas maternas que procuran el mantenimiento y cuidado de los hijos, estas conductas consisten en lactancia, aproximación, contacto físico, estimulación auditiva y olfativa, que regulan diversos sistemas fisiológicos en la madre y en los hijos como el reloj biológico, ritmo cardiaco, termoregulación, atención y exploración de objetos (Fledman, 2011). El cuidado parental bajo condiciones de estrés crónico se asocia principalmente a dificultades económicas, falta de compromiso social, apoyo emocional y depresión postparto, que llevan a desencadenar cuidados negligentes e incrementar el riesgo en los hijos de desarrollar

desórdenes del estado de ánimo, cognitivos y conductuales (Bovette-Turcot et al., 2017). Por lo tanto, los padres juegan un papel fundamental en el desarrollo posterior de los hijos.

En roedores, las hembras expresan una serie de conductas estereotipadas, indicadores de un buen cuidado materno, como son: la construcción del nido antes del parto, mantenimiento de las pupas dentro del nido, acicalamiento, transportación por medio de la boca y lactancia (Kuhn y Schanberg, 1998). En contraste, en el cuidado deficiente disminuye la frecuencia de conductas de aseo, alimentación y mantenimiento de la temperatura (Franklin, Saab y Mansuy, 2012), estas conductas son la principal fuente de estimulación sensorial para las crías, la combinación de estas señales ayuda al desarrollo del SNC, mientras que la ausencia de esta estimulación genera respuestas de estrés (Chen y Hong, 2018).

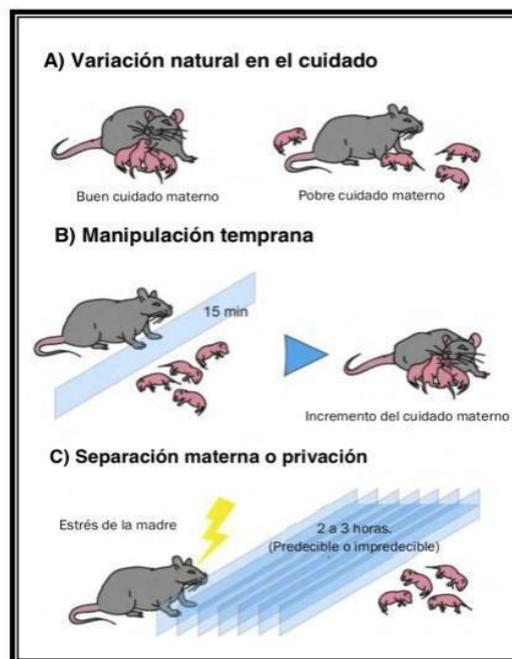
### **3.1 Modelos de separación materna**

Los modelos de Separación Materna (SM) permiten conocer el papel de experiencias adversas en la fisiología y en el comportamiento de los organismos en etapas tempranas del desarrollo y a lo largo de su vida. Los modelos consisten en aislar a las crías del cuidado de la madre y del contacto del resto de las crías de la camada. Si el periodo de aislamiento es de 5-15 minutos, los modelos son conocidos como Manipulación Temprana (MT) y si el periodo de aislamiento es de 60-180 minutos, los modelos son llamados privación o SM (Figura 5). En la MT se ha observado que al momento de reunir a la madre con las crías incrementa el cuidado materno, la resiliencia de eventos traumáticos en la edad adulta, disminuye la capacidad de generar respuestas de estrés y favorecer el rápido retorno a la línea base de glucocorticoides, minimizando el riesgo de daño cerebral (Cirulli et al., 2003), mientras que en la SM, se irrumpen con los cuidados maternos, lo que genera estrés tanto en la madre como en las crías. En el caso de las crías, desarrollan hiperactividad del Eje Hipotalámico Hipofisario Adrenal (HPA-axis, por sus siglas en inglés), que lleva a una mayor exposición de glucocorticoides en el SNC, interfiere con el desarrollo de neurotransmisores, mecanismos de transcripción genética y diferenciación neuronal (Franklin et al., 2012; Meaney, 2001; Tata, 2012; Van Bodegom, Homberg & Hencken, 2017; Weinberg et al., 1978).

Los modelos de SM incluyen diversas variantes como: 1) tiempo de privación, que puede variar desde 1 hora hasta varias horas, observado que a mayor tiempo de privación son mayores los efectos adversos a corto y a largo plazo (Boccia y Pedersen, 2001); 2) contacto con la camada, que depende del diseño de la incubadora y el lugar donde se coloquen durante

la privación, si la incubadora se encuentra en otra habitación se puede producir aislamiento olfativo, táctil, visual y auditivo; mientras que si se encuentra en la misma habitación, se genera un aislamiento visual y táctil (Arborelius y Eklund, 2007) y 3) también se puede variar la estancia de la madre, por ejemplo, se puede dejar en la jaula de alojamiento con los roedores que no se van a utilizar en el procedimiento experimental o aislar a la madre completamente (Boccia y Pedersen, 2001).

El modelo SM descrito por Bock et al. (2005), consiste en separar las crías de la madre y de sus hermanos por 2 horas diarias, durante los primeros 14 días postnatales. Se ha observado empujando este modelo en la cepa C57BL/J puede generar alteraciones en la arborización y densidad dendrítica en las neuronas hipocámpales, lo que podrían estar relacionado con los problemas que se han observado de aprendizaje y memoria en la edad adulta. **Figura 5. Paradigmas experimentales basado en el cuidado materno.** A) Un buen cuidado materno se presenta cuando expresan conductas como: acicalamiento, lactancia, mantenimiento de la temperatura y construcción del nido



(izquierda), mientras que un pobre cuidado materno se presenta cuando se ausenta o se despliegan en menor nivel estas conductas (derecha). **B)** En la Manipulación Temprana (MT) se separan las pupas de su madre por un periodo no mayor a 15 minutos (izquierda). Cuando retornan con su madre se observa mayores conductas maternas que favorecen a la resiliencia de las pupas cuando son adultas (derecha). **C)** En la Separación Materna (SM) el periodo de privación es más largo, puede ser de 2 a 24 horas. La separación puede ser siempre a la misma hora (predictible) o en diferentes momentos del día (impredicible). La SM interfiere con el cuidado materno causando la incapacidad de las pupas para regular el estrés (Modificado de Franklin et al., 2012).

### 3.2 Cambios neuroanatómicos relacionados con la SM

Durante el periodo postnatal, en el SNC se presenta diversos periodos críticos que son necesarios para su maduración, la exposición a eventos adversos durante los primeros días posnatales puede interferir con el desarrollo del cerebro, alterar la maduración neuronal y aumentar el riesgo de padecer desórdenes psiquiátricos (McEwen et al., 2015; Meyer y Feldon, 2010).

Durante los primeros 14 días (DPN) en la corteza del ratón se desarrollan las neuronas, crecen axones y dendritas, acompañados de la sinaptogénesis y poda neuronal, crecimiento de la materia gris y a partir del 22 DPN ocurre una rápida mielinización (Farhy-Tselnicker y Allen, 2018).

Entre los cambios observados en Corteza Frontal (CF) de roedores expuestos a SM se encuentran: aumento de los receptores GluR1 y GluR2, incremento de la fosforilación de  $\alpha$ CAMKII y de la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD 95), un marcador de maduración sináptica, mientras que decrecienta la densidad de neuronas inhibitorias y de espinas dendríticas de la capa II/III de neuronas piramidales, asociados a un bajo desempeño en tareas de interacción social y memoria de trabajo en comparación con los ratones control (Chocyk et al., 2013; Holland, Granguly, Potter, Chartoff y Brenhouse, 2014; Rincel et al., 2018).

También se ha reportado una disminución en el área del soma de células neuronales ubicadas en la CF, Corteza Retrosplenial (CR) y en la Corteza Motora (CM) (Aksic et al., 2014), alteraciones en la mielinización, así como en la maduración de neuronas glutamatérgicas de la amígdala y modificaciones en los mecanismos reguladores de la plasticidad sináptica (Danielewicz, Trenk y Hess, 2017; de Campo et al., 2017; Sarabdjitsingh, Loi, Joels, Dijkhuizen y Van de Toorn, 2017); sobreexpresión de receptores glutamatérgicos y marcadores sinápticos en corteza prefrontal (CPF, por sus siglas en inglés) (Chocyk et al., 2013; Wieck, Andersen y Brenhouse, 2013), así como alteraciones en la expresión de marcadores gliales (Marco et al., 2013; Récamier-Carballo, Estrada-Camarena y López-Rubalcava, 2017) y factores neurotróficos (Dandi et al., 2018; Seo, Lee, Hien, Park y Kim, 2017).

### 3.3 Hipocampo y SM

El hipocampo es una estructura ubicada en el lóbulo temporal medial, está constituida por el cuerno de Ammon cual se divide en cuatro grupos: CA1, CA2, CA3 y CA4 y giro dentado. Cada región tiene distintos tipos de neuronas: células piramidales (en la región CA1, CA2 y CA3), células granulares (giro dentado), células intrínsecas (células polimorfas), interneuronas GABAérgicas y células musgosas. El hipocampo principalmente se ha relacionado con procesos cognitivos como: adquisición y consolidación de la memoria, aprendizaje, modulación de interacciones sociales y emocionales (Kolb y Whishaw, 2003).

Los cuidados maternos deficientes durante los primeros días postnatales influyen en el desarrollo y maduración del hipocampo, alterando el estado fisiológico y anatómico de esta estructura, cuyos efectos pueden desencadenar desde la pubertad temprana, desórdenes cognitivos, emocionales y conductuales. Algunos trabajos han reportado que la SM tiene un efecto diferencial dependiendo del sexo de los animales, siendo menos vulnerables las hembras que los machos (Keresztes, Ngo, Lindenberger, Bergner y Newcombe, 2018; Kim et al., 2015; Liu et al., 2000; Loi, Mossink, Meerhoff, Den Blaauwen, Lucassen y Joëls, 2015; McEwen et al., 2015a; McEwen, 2016; Ortiz y Tye, 2014; Van Hasselt et al., 2012). Estudios realizados en roedores machos demuestran que la SM o la limitación del material de anidación acelera la maduración neuronal del hipocampo, incrementando la expresión de receptores tipo NMDA y de células positivas a parvalbúmina, pero disminuye la proliferación y diferenciación neuronal, la proliferación de células granulares del giro dentado y la expresión de receptores a glucocorticoides, posiblemente como un mecanismo de regulación negativa que reduce la respuesta de estrés (Bath, Manzano-Nieves y Goodwill, 2016; Orelan, Nylander y Pickering, 2010 ). Otros estudios demuestran que roedores machos expuestos por 24 horas a SM, presentan cambios en la estructura hipocampal, reducción en la neurogénesis y cambios en la maduración neuronal, además de alteraciones en algunos procesos cognitivos y desarrollo de conductas tipo ansiosas e impedimentos en la memoria espacial, (Bian et al., 2015; Masrour, Peeri, Azarbayjani y Hosseini, 2017; Shin, Han, Woo, Jang y Min, 2016; Sousa et al., 2014).

Por otro lado, la SM puede genera cambios estructurales, particularmente tiende a disminuir la longitud dendrítica apical en CA3 y alterar la densidad y la morfología de espinas dendríticas (Eiland y McEwen, 2010; Melo, Antoniazzi, Hossain y Kolb, 2018; Monroy et al., 2010; Orelan, Nylander y Pickering, 2010; Poeggel et al., 2003).

### 3.4 Espinas dendríticas y SM

La SM produce cambios diferenciales en la arborización y longitud dendrítica en las áreas cerebrales, por ejemplo: en la CPF la SM produce atrofia de la arborización dendrítica basal, contracción de las ramas apicales, aumento de la longitud y número de ramificaciones dendríticas, sin embargo en el núcleo *accumbens* (NAc) la SM genera una disminución en la longitud dendrítica (Cirulli et al., 2003; Conrad et al., 2017; Monroy, Hernández-Torres y Flores, 2010; Muhammad y Kolb, 2011; Koe, Ashokan y Mitra, 2016; Vyas, Bernal y Chattarji, 2002; Yang et al., 2014). Los cambios en las dendritas no son sólo diferentes dependiendo de la estructura cerebral, también del tiempo de exposición a una SM, por ejemplo, ante un sólo evento de SM no se observaron cambios en la longitud ni en el número de ramificaciones dendríticas y por lo tanto en la complejidad del árbol dendrítico (Krugers et al., 2012), mientras que una SM durante los primeros 14 días postnatales conduce a un aumento en la longitud dendríticas y en el número de ramificaciones (Koe, Ashokan y Mitra, 2016).

Por otro, lado se han encontrado cambios en la densidad de espinas dendríticas de diversas áreas cerebrales, estos cambios también son diferenciales dependiendo del periodo de privación así como de la cepa empleada, por ejemplo, en la Corteza prefrontal medial (por sus siglas en inglés, CPFm), que es una estructura clave para la regulación de la respuesta de estrés, ocurre una disminución en la densidad de espinas basales de neuronas piramidales de la capa II y III, disminución de espinas delgadas en el DNP 21 y DPN 40, así como en la densidad de espinas en subregiones de la CF como la Corteza insular agranular dorsal (Farrel, Holland y Brenhouse, 2016; Rincel et al., 2018), sin embargo en la Corteza Cingulada ocurre un aumento en la densidad de espinas (Melo, Antoniazzi, Hossain y Kolb, 2018). También se ha encontrado que aumenta la densidad de espinas primarias y secundarias en la amígdala basolateral, (Koe, Ashokan y Mitra, 2016). Con respecto al hipocampo, los

cambios que se observan en la densidad de espinas varían en función de la subregión estudiada, así como del DPN en que se analiza la morfología neuronal, por ejemplo, se ha encontrado una disminución en la densidad de CA1 al 21 PDN, mientras que en el 95 PDN se observa un aumento y ocurre una disminución en la densidad de espinas en el giro dentado en la edad adulta (He et al., 2018). Un resumen de estos cambios se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1. Estudios sobre la SM y espinas dendríticas.**

Área cerebral	Modelo de SM	DPN/ tiempo de separación	Edad DPN	Cambios en espinas dendríticas	Referencias
Corteza Prefrontal (área infralímbica)	ratas Sprague-Dawley (♀)	2-20/ 4 hrs.	Adolescencia 40 DPN.	 Ramificación dendrítica  espinas delgadas  Diámetro de la cabeza de espinas	Farrel, Holland, Shansky y Brenhouse, 2016.
Corteza insular agranular dorsal	Ratas Long-Evans (♂)	3-14/3 hrs.	Adolescencia temprana 95 DPN	 densidad de espinas capa III	Melo, Antoniazzi, Hossain y Kolb, 2018
CA1	Ratas Long-Evans (♂)	3-14/ 3 hrs.	Adolescencia temprana 95 DPN	 densidad de espinas	Melo, Antoniazzi, Hossain y Kolb, 2018
Corteza cingulada	Ratas Long-Evans (♀)	3-14/ 3 hrs.	Adolescencia temprana 95 DPN	 densidad de espinas capa III.	Melo, Antoniazzi, Hossain y Kolb, 2018
Amígdala basolateral	ratas wistar (♂)	2-14/ 2 hrs-	Adolescencia 84 DPN	 densidad de espinas	Koe, Ashokan y Mitra, 2016
Giro dentado	Microtus mandarinus (♀-♂)	14-21	Adolescencia 83 DPN	 densidad de espinas  # ramificación	He, Guo, Yang, Wang, Zhang, Yuan, li, Zhang, Hou, Yang, Jia y Tai, 2018.
Corteza prefrontal ventromedial y orbitofrontal	ratas wistar (♂)	3/ 24 hrs.	3 PDN	 reducción volumétrica	Sarabdjitsingh, Loi, Joels, Dijkhuizen y van der Toorn, 2017.

Cerebelo	ratas wistar (♂)	3/ 24 hrs.	3 PDN	↓	reducción volumétrica de materia blanca	Sarabdjitsingh, Loi, Joels, Dijkhuizen y van der Toorn, 2017.
Cuerpo estriado dorsomedial	ratas wistar (♂)	3/ 24 hrs.	3 PDN	↓	materia blanca	Sarabdjitsingh, Loi, Joels, Dijkhuizen y van der Toorn, 2017.
Corteza Prefrontal (PCF)	Ratas Long-Evans (♂)	3-21/3 hrs.	21 DPN	↑	densidad de espinas y crecimiento dendrítico.	Muhammad y Kolb, 2011.
NAc	Ratas Long-Evans (♂)	3-21/3 hrs.	21 DPN	↑	longitud dendrítica	Muhammad y Kolb, 2011.
NAc	Ratas Long-Evans (♀)	3-21/3 hrs.	21 DPN	↑↓	longitud dendrítica	Muhammad y Kolb, 2011.
CA1	ratas Sprague-Dawley (♂)	2-20/6 hrs.	21 PDN	↓	dendritas apicales proximales de neuronas piramidales	Ohta, Suzuki, Warita, Kaji, Kusaka y Miki, 2017
Corteza somatosensorial (SSC, por sus siglas en inglés)				↓ ↑	espinas tipo hongo tasa de pérdida de espinas tipo hongo	Takatsuru, Yoshitomo, Nemoto, Eto y Nabekura, 2009.
Corteza Prefrontal (mPFC, por sus siglas en inglés)	ratas wistar (♂)	1-14/3 hrs.	Adolescentes 35 DPN	↓ ↑	espinas apicales y basales de la capa II/III piramidales proteína de densidad postsináptica 95	Chocyk, Bobula, Dudys, Przyborowska, Majcher-Maslanka, Mes y Wedzony, 2013.

#### **4. Justificación**

Los modelos de SM son herramientas que permiten estudiar experiencias adversas en estados tempranos del desarrollo y la influencia de estos en la etapa adulta (Bock et al., 2005). Diversos trabajos han demostrado que la SM induce cambios en la anatomía y fisiología del SNC, estos cambios dependen del tiempo de SM, de la cepa estudiada y del área analizada. Por lo tanto, es necesario empezar a caracterizar de manera sistemática los efectos de la SM. En particular, en la cepa C57BL/6J se han observado cambios específicos en el hipocampo, como por ejemplo: alteraciones en la morfología neuronal, en la densidad de espinas dendríticas, así como cambios cognocitivas y conductuales asociadas a la SM (Monroy et al., 2010; Ovtcharoff, Helmeke y Braun, 2006). No obstante, los mecanismos celulares asociados a estas alteraciones no se conocen completamente. La TPS-1 es una proteína que es sintetizada y liberada por los astrocitos durante el desarrollo del SNC y que está implicada en los procesos de sinaptogénesis, espinogénesis y diferenciación neuronal. La disminución de TSP-1 afecta la morfología neuronal (Allen et al., 2009; Cheng et al., 2016; Christopherson et al., 2005; Villegas, Piña 2016), sin embargo, se desconoce si los cambios en la morfología neuronal inducidas por la SM son dependientes de TSP-1.

## **5. Objetivos**

### **Objetivo general:**

Analizar los posibles mecanismos celulares implicados en las modificaciones estructurales de las espinas dendríticas del hipocampo en un modelo de SM en ratones C57BL/6L.

### **Objetivos específicos:**

- 1) Describir los cambios en los niveles de TSP-1 en el hipocampo de ratones C57BL/6L relacionados con la SM.
- 2) Establecer si cambios en los niveles de TSP-1 debidos a la SM se asocian con cambios en la morfología de las espinas dendríticas durante la SM.

## **6. Hipótesis**

H1) La SM disminuirá los niveles de TSP-1 en el hipocampo de los roedores.

H2) La SM generará cambios en la estructura de las espinas dendríticas del hipocampo.

H3) Los cambios en los niveles de TSP-1 producidos por la SM correlacionarán con las modificaciones en la anatomía de las espinas dendríticas.

H4) La SM no modificará los niveles de TSP-1 en hipocampo de ratones, pero afectará la morfología de la espina dendrítica.

H5) La SM modificará los niveles de TSP-1 en el hipocampo de roedores, sin afectar la morfología neuronal.

H6) La SM no modificará los niveles de TSP-1 en el hipocampo de roedores ni la morfología neuronal.

## **7. Materiales y Método**

### **7.1 Animales**

Se utilizaron crías de ratones macho de la cepa C57BL/6L. La fecha de nacimiento se designó como día postnatal cero (DPN0), después del nacimiento, 24 ratones (12 control y 12 experimental asignados de manera aleatoria) fueron separados y usados para el protocolo de SM. Todos los ratones se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad (12:12h) con las luces encendidas de 8:00 am a 8:00 pm, con una temperatura y humedad constante. Tuvieron acceso *ad libitum* de agua y alimento durante toda la fase experimental. Todo el protocolo se realizó durante la fase de luz. El mantenimiento, manipulación y cuidado de los ratones siguió las reglas establecidas en la norma Oficial Mexicana (NOM-062-200-1999). El uso de los animales y el desarrollo experimental fueron previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Psicología de la UNAM (FPSI/DIP/CE/07/2015).

## 7.2 Procedimiento

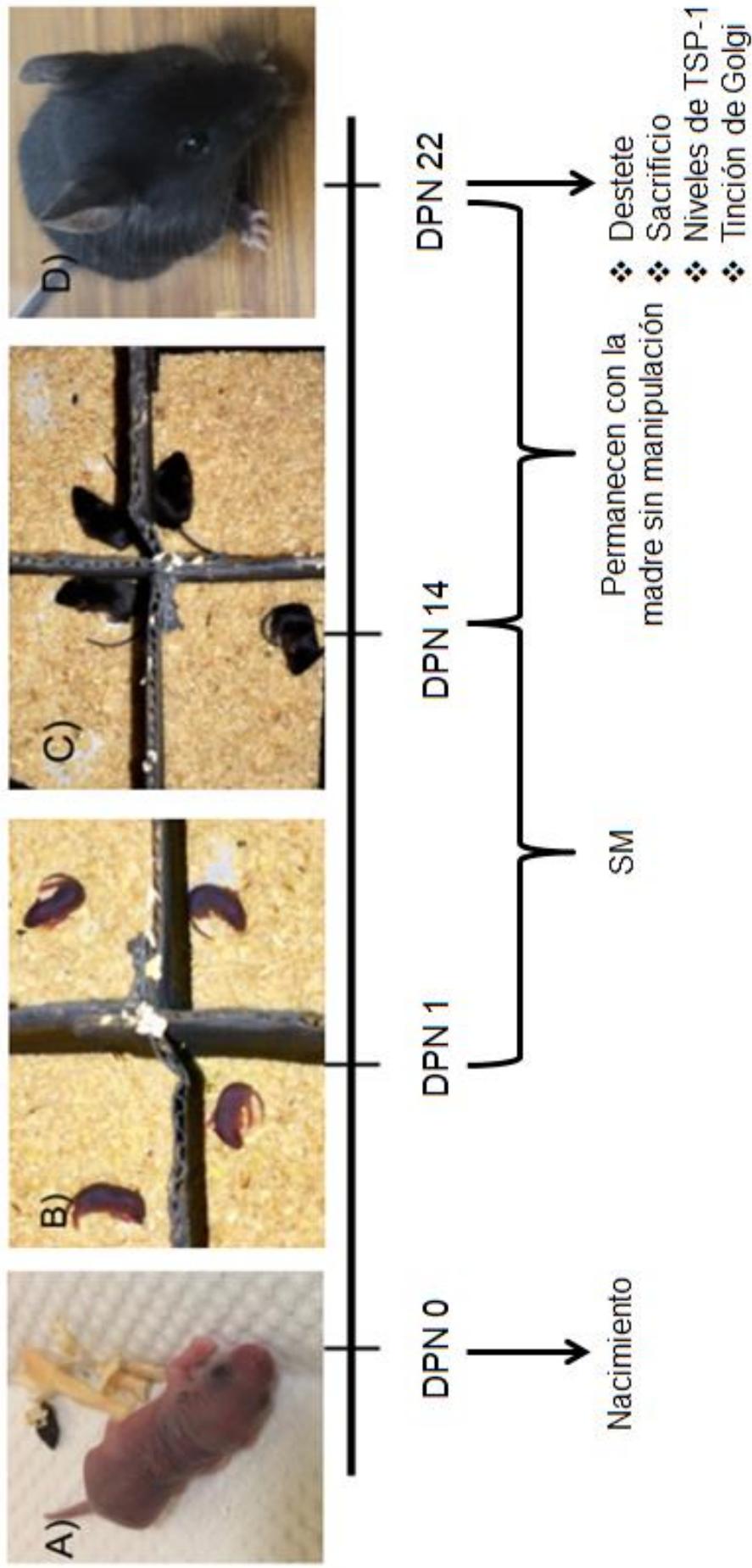
### Grupo de SM

La SM siguió el protocolo descrito en Bock et al. (2005), con algunas modificaciones. Se utilizó una incubadora de 39 cm de largo por 31 cm de ancho con una altura de 21 cm, dividida en compartimentos individuales de 10 cm (ancho) X 13 cm (largo) X 21 cm (altura), para inducir un aislamiento táctil y visual (**figura 6**). Un cojín térmico fue utilizado para mantener la temperatura aproximadamente a 32 °C durante toda la fase experimental.



**Figura 6. Incubadora utilizada para la SM.** La incubadora presenta 9 compartimentos de 10x13x21 cm, en cada compartimiento se pusieron individualmente crías de ratones C57BL/6J desde del DPN1 hasta el DPN 14.

A partir del DPN1 y hasta el el DPN14 se llevó a cabo la SM, la cual consistió en separar a las crías de la madre y del contacto de las demás crías durante dos horas diarias (6-8 pm), las crías se colocaron individualmente en cada uno de los compartimientos de la incubadora por el mismo experimentador. La incubadora y la caja de la madre se mantuvieron en la misma habitación para generar en las mismas crías una privación táctil y visual de la madre. Después del periodo de privación las crías regresaron a su jaula de alojamiento y se cubrieron con una delgada capa de aserrín para disminuir el rechazo por parte de la madre. Una vez que las crías regresaron con la madre no se realizó ninguna manipulación adicional. En el DPN15 se limpió por única ocasión la jaula de alojamiento y permanecieron sin ninguna manipulación hasta el DPN22 (**Figura 7**).



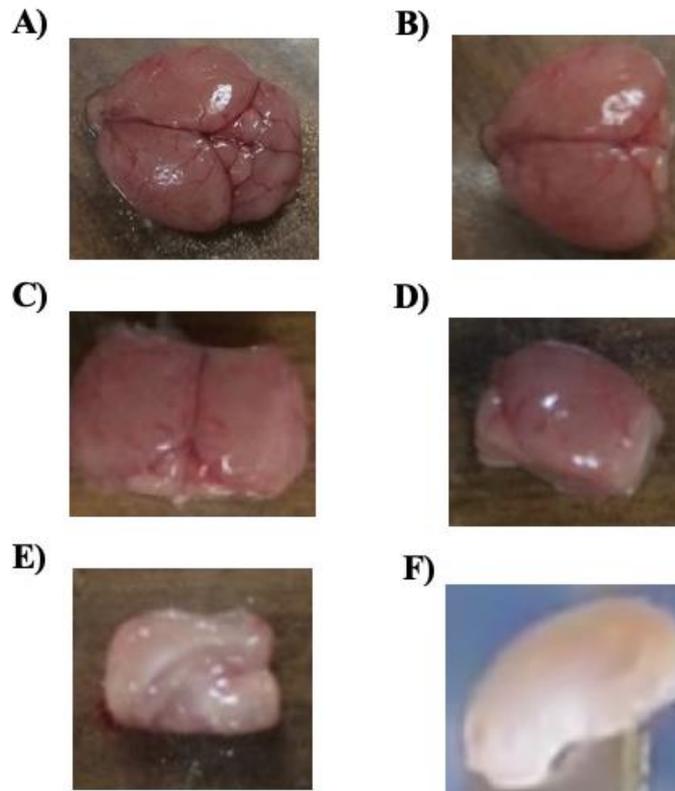
**Figura 7. Línea del tiempo de SM a partir del DPN 0 al DPN 22.** A) Día de nacimiento (DPN 0), las crías permanecieron con su madre; B) grupo de SM, primer día de separación (DPN 1), las crías fueron colocadas individualmente en una incubadora dividida en compartimentos separados para generar una privación táctil y visual del resto de la camada y de la madre; C) último día de separación (DPN 14); D) día de destete, sacrificio y medición de niveles de TSP-1 y tinción rápida de Golgi (DPN 22).

### **Grupo control.**

Para el grupo control, se mantuvieron las crías con su madre en la jaula de alojamiento sin ninguna manipulación desde el DPN1 hasta el día DPN22. Para minimizar los posibles efectos de manipulación por parte del experimentador se limpió una vez la caja comunal en el DPN 15.

### **7.3 Disección hipocampal.**

La disección del hipocampo se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Mathus et al. (2011). Los animales fueron sacrificados por decapitación rostral en la primera vértebra cervical, posteriormente se realizó una incisión en la parte media del cuero cabelludo, empezando desde la parte occipital, hacia el hueso nasal caudalmente. Se realizó un corte en el cráneo siguiendo la línea media, para desplegar las capas del cráneo. El cerebro fue expuesto y se retiró de la base del cráneo. Una vez que se obtuvo el cerebro completo, se retiró el cerebelo y la parte más anterior de la corteza frontal. El cerebro se cortó por la línea media separando ambos hemisferios, a cada uno de los hemisferios se retiró la capa de la corteza parietal, para dejar expuesto la corteza temporal, esta última fue retirada para dejar expuestos el hipocampo junto con núcleos subcorticales (**Figura 8**). El hipocampo fue extraído y procesado para determinar los niveles de TSP-1.



**Figura 8. Procedimiento para obtener el hipocampo.** Después del periodo de experimentación el cerebro fue extraído (A) se eliminó el cerebelo (B) y la parte anterior de la corteza Frontal (C). Los hemisferios fueron separados (D) para eliminar la corteza parietal y temporal (E) y exponer el hipocampo (F).

#### 7.4 Cuantificación de TSP-1.

Los niveles de TSP-1 fueron determinados a partir de la región completa del hipocampo en tejido fresco y siguiendo el lineamiento de los cortes sugerido por Mathus et al. (2011), para el grupo de SM y control. El hipocampo fue homogeneizado por separado en un buffer RIPA por medio de un homogeneizador ultra-Turrax (Ika Works) y centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C para separar la fracción soluble. Los niveles de TSP-1 fueron determinados inmediatamente con el inmunoensayo ELISA (R&D Systems), siguiendo las instrucciones del proveedor. El inmunoensayo ELISA es una técnica que comúnmente se emplea para cuantificar proteínas, consiste en un primer anticuerpo que detectará la proteína y segundo

anticuerpo, el cual está enlazado a una enzima capaz de generar un cambio de color al reconocer el primer anticuerpo. Los niveles de TSP-1 fueron obtenidos a partir de la curva estándar de concentraciones conocidas de TSP-1 (7.81 ng/ml, 15.6 ng/ml, 31.3 ng/ml, 62.5 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml y 500 ng/ml). Para obtener la densidad óptica de las muestras se utilizó un lector óptico a una longitud de 450-530 nm y los resultados fueron expresados como ng/ml (García et al., 200).

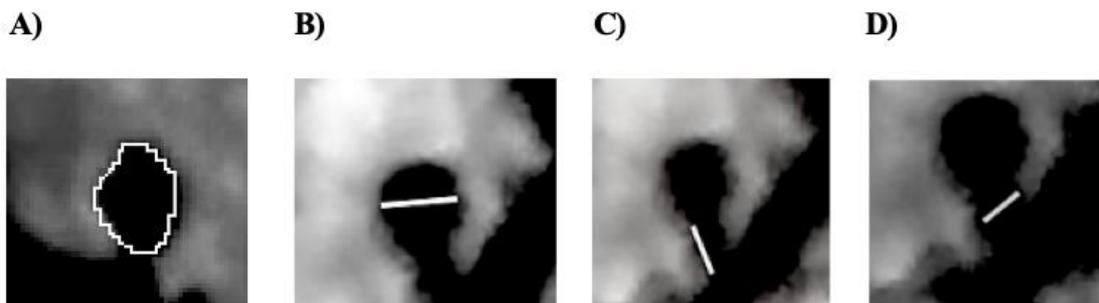
### **7.5 Impregnación de Golgi**

La Tinción de Golgi es una técnica histológica que permite observar la morfología neuronal, la arborización y las espinas dendríticas en dos dimensiones. Esta técnica se basa en la acumulación de depósito de cromato de argéntico, producida por la reacción de bicromato de potasio y nitrato de plata. Después de la SM los ratones fueron decapitados y los cerebros extraídos y procesados para realizar una impregnación Golgi-Cox usando el Kit FD Rapid GolgiStain (FD NeuroTechnologies, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente los cerebros fueron inmersos en solución A+B (nitrato de plata) y guardados en la oscuridad a temperatura ambiente por 3 semanas, posteriormente fueron transferidos a una solución C (bicromato de potasio) por 72 horas en la oscuridad. Después de este periodo, los cerebros fueron incluidos en parafina y rebanados en secciones coronales de 100  $\mu\text{m}$  (medida estandarizada) de grosor por medio de un microtomo (Ecoshel/335). Los tejidos fueron dehidratados con Xilol y montados en portaobjetos para su análisis (Melendez-Ferro, Perez-Costas y Roberts, 2009; Zaqout y Kaindl, 2016).

### **7.6 Análisis de la morfología neuronal**

Para analizar la morfología de las espinas dendríticas se utilizó un método semi automatizado desarrollado por Orłowski y Bjarkam (2012), tomando en cuenta los siguientes criterios: 1)

selección de una dendrita lo más recta posible; 2) se consideró espina a cualquier protuberancia que emergiera de esa dendrita; 3) se seleccionó a la dendrita que presentó espinas con mayor nitidez, 4) la cuantificación de las espinas se normalizó en fragmentos de  $50 \mu m$  a partir del soma. Se capturaron imágenes de cada grupo con un microscopio óptico con el objetivo 100X y se procesaron con el programa *ImageFocus v3.0*. para calibrar las imágenes y pudieran corresponder al objetivo utilizando. El análisis de la morfología de las espinas se realizó de acuerdo a Be Bartolo et al (2014). Brevemente, el área y el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas se cuantificó por medio de las herramientas de medición del programa ImageJ. El área de la cabeza de la espina se marcó trazando una línea por todo el contorno de la cabeza (**Figura 5A**). Para obtener el diámetro de la cabeza de la espina se trazó con una línea horizontal pasando por su centro (**Figura 5B**). La longitud del cuello de la espina se obtuvo trazando una línea vertical desde la base de la espina hasta el inicio de la cabeza (**Figura 5C**). Para obtener el ancho del cuello, se trazó una línea horizontal pasando por su centro (**Figura 5D**).



**Figura 9. Análisis de la morfología de las espinas dendríticas.** El procedimiento se realizó de acuerdo a Be Bartolo et al (2014). Se presenta ejemplos del procedimiento que se siguió para medir la morfología de la espina dendrítica utilizando la herramienta de medición del programa ImageJ. **A)** El área se obtuvo trazando una línea sobre el contorno de la cabeza de la espina. **B)** El diámetro se obtuvo a partir de trazar una línea horizontal que pasó por el centro de la cabeza. **C)** La longitud del cuello a partir de trazar una línea partiendo de la base de la dendrita hasta inicia la cabeza. **D)** El ancho del cuello de la espina se obtuvo por una línea horizontal que pasó por el centro del cuello.

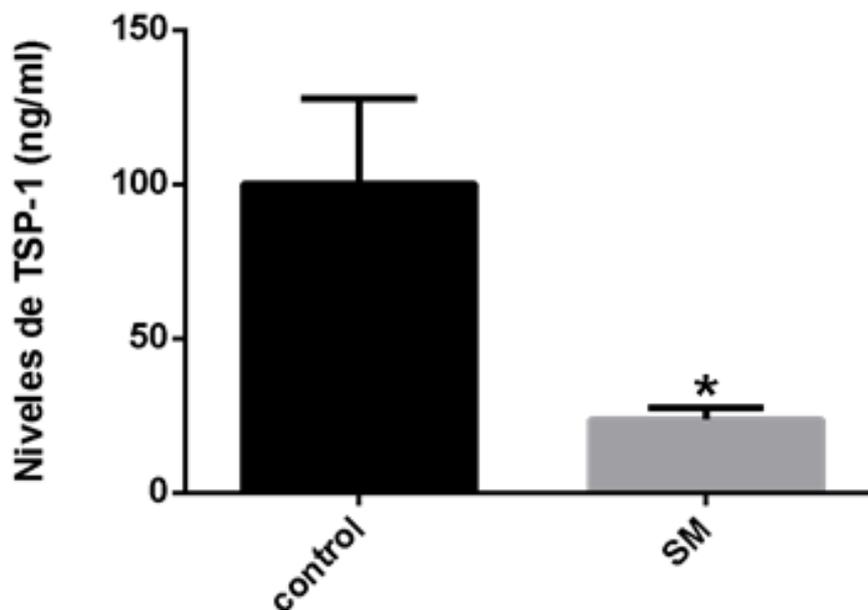
## 7.7 Análisis estadístico

Una prueba “*t*” de student para muestras independientes fue utilizada para comparar los niveles de TSP-1 entre grupos. La normalización de los datos fue realizada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Una U de Mann-Witney para muestras independientes fue utilizada para las comparaciones del tamaño de las espinas dendríticas entre grupos. El grado de asociación de los niveles TSP-1 y tamaño de las espinas se realizó mediante análisis de correlación de Pearson. Los resultados de los niveles de TSP-1 fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar. Mientras que para los resultados de las comparaciones del tamaño de las espinas dendríticas se reportaron como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Una  $p < 0.05$  fue considerada para indicar la significancia estadística.

## 8. Resultados

### La SM produjo un decremento en los niveles de TSP-1 en el hipocampo.

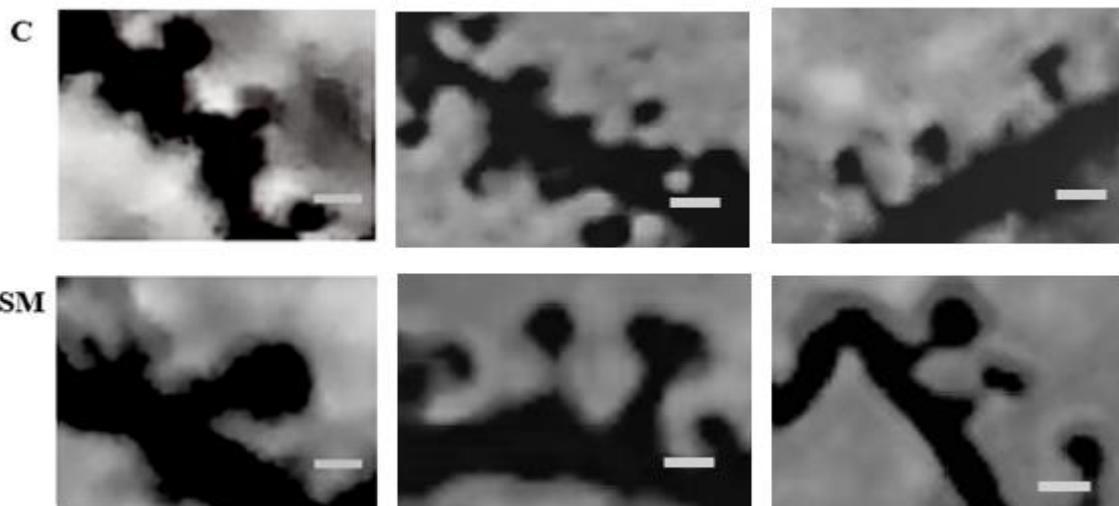
Con el objetivo de establecer si eventos adversos en etapas tempranas del desarrollo altera los niveles de TSP-1 en hipocampo, se cuantificó la concentración de TSP-1 en cerebros de ratones del DPN 22, expuestos a SM (n= 7) y control (n= 8). Los resultados mostraron que cuando los ratones son sometidos a condiciones de SM, ocurre una disminución de aproximadamente del 70% en los niveles de TSP-1 en el hipocampo comparado con el grupo control (Control =  $100.2 \pm 9.27$  ng/ml; SM =  $30.7 \pm 3.62$  ng/ml;  $t(16) = 5.532$ ,  $*p < 0.05$ ) (Figura 10).



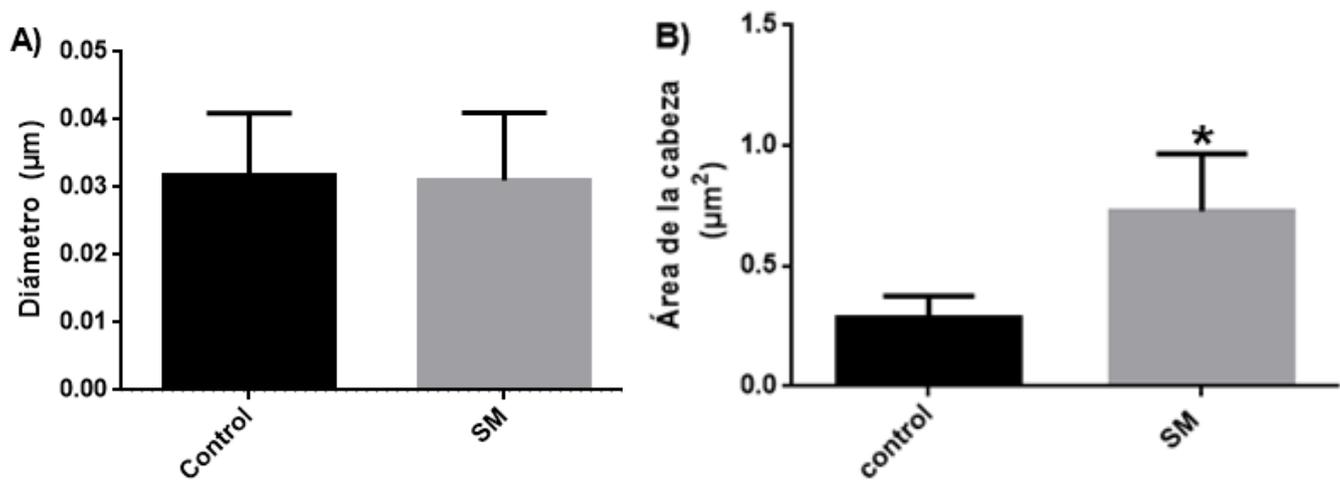
**Figura 10. Niveles de TSP-1 en hipocampo de ratones expuesto a SM.** Los ratones expuestos a separación materna (SM) presentaron una disminución significativa en los niveles de TSP-1 en comparación con el grupo control. Los datos fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar.  $*p < 0.05$ .

### La SM indujo alteraciones en el área de la cabeza de las espinas dendríticas en hipocampo.

Con el fin de conocer si la SM generaba cambios en el tamaño de la cabeza de la espina dendrítica en neuronas hipocampales se midió el diámetro y el área de la cabeza de la espina. Para este estudio después del DPN 22 los cerebros de los grupos control y SM fueron procesados por medio de una tinción rápida de Golgi. Un total de 380 espinas de 150 neuronas fueron analizadas. Bajo estas condiciones se observó que las cabezas de las espinas dendríticas del grupo de SM mostraron un mayor tamaño en comparación con el grupo control (**Figura 11**). Un análisis cuantitativo demostró que el grupo de SM no presentó un cambio significativo en el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas con respecto al grupo control (Control =  $0.284 \pm 0.17875 \mu\text{m}$ , SM =  $0.031 \pm 0.317 \mu\text{m}$ ;  $z = -.726$   $p > 0.05$ ) (**Figura 12 A**). Sin embargo, sí presentó un aumento significativo en el área de la cabeza (Control =  $0.285 \pm 0.191 \mu\text{m}$ , SM =  $0.719 \pm 0.395 \mu\text{m}$ ;  $z = -11.657$ ,  $*p < 0.05$ ) (**Figura 12 B**).



**Figura 11.** La SM produjo un aumento en el tamaño de la cabeza de las espinas dendríticas en hipocampo. Se presentan ejemplos representativos de espinas dendríticas de ratones control (C) y sometidos a separación materna (SM). Escala de la barra:  $1 \mu\text{m}$ .

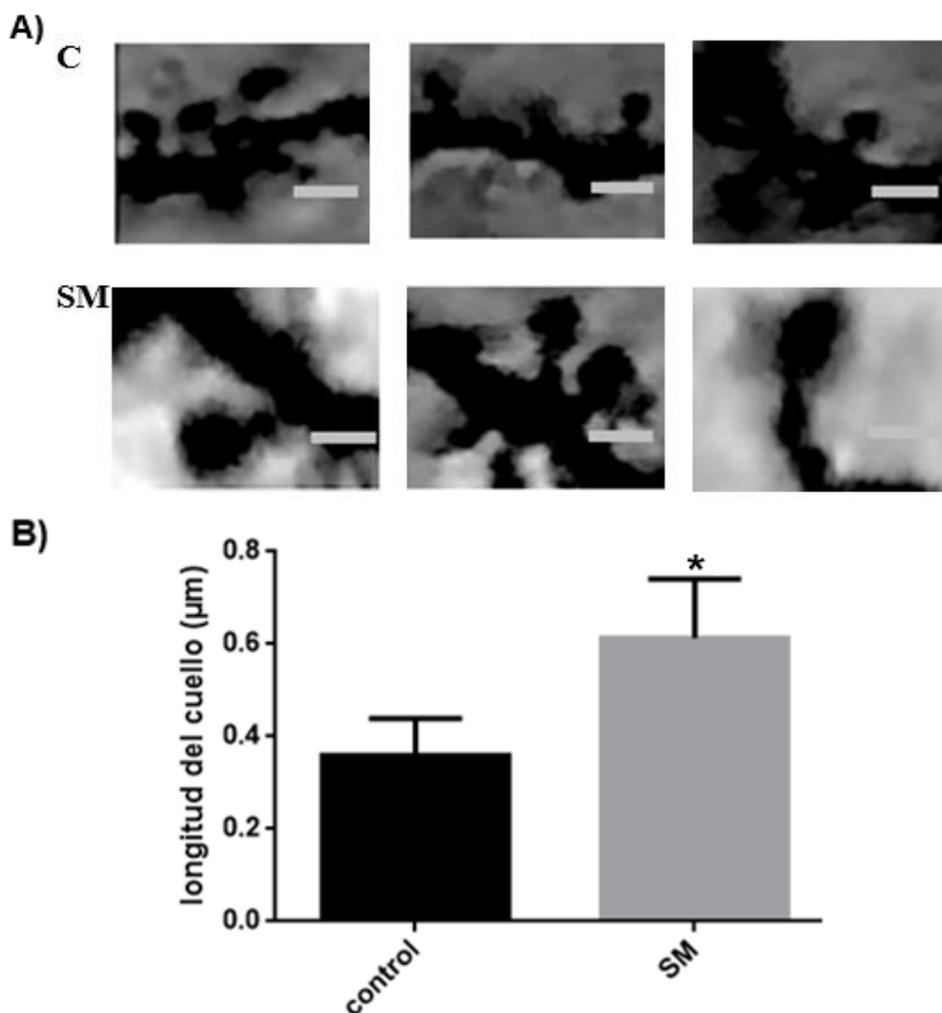


**Figura 12. La SM aumentó el área de la cabeza de las espinas dendríticas en hipocampo**

A) Los ratones que fueron expuestos a SM no mostraron un cambio significativo en el diámetro de la cabeza de las espinas dendríticas en comparación con el grupo control. B) La SM generó un aumento significativo del área de la cabeza de las espinas en comparación con el grupo control. Los datos fueron expresados como la mediana  $\pm$  rango intercuartílico \*  $p < 0.05$ .

### La SM incrementó la longitud del cuello de las espinas dendríticas en hipocampo.

Con el fin de determinar si, además de los cambios observados en la cabeza de la espina producidos por la SM también se afectaron otras estructuras de la espina, se analizó la longitud del cuello de un total de 358 espinas. Se observó que el cuello de las espinas del grupo de SM fue más largo en comparación con el grupo control (**Figura 13A**). Para un análisis cuantitativo se realizó una prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes. Se encontró que ratones expuestos a SM mostraron un aumento significativo en la longitud del cuello de las espinas dendríticas en comparación con el grupo control (Contro =  $0.512 \pm 0.248$ , SM =  $0.6325 \pm 0.26175$ ;  $z = -2.719$ ,  $*p < 0.05$ ) (**Figura 13 B**).

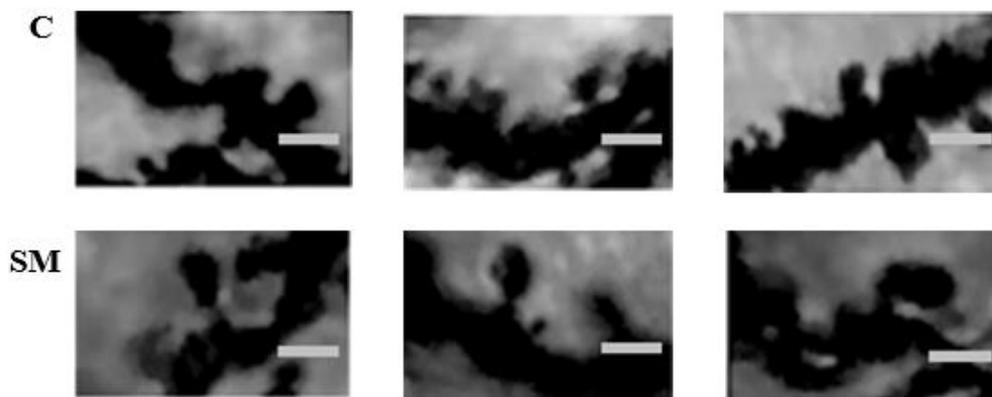


**Figura 13. La SM aumentó el largo del cuello de las espinas dendríticas de hipocampo.** A) Ejemplos representativos de cuellos de espinas de ratones control (C) y sometidos a separación materna (SM) B) La SM produjo un aumento significativo en la longitud del cuello de las espinas dendríticas en comparación con el grupo. Escala de la barra:  $1\mu\text{m}$ . Los datos fueron expresados como la mediana  $\pm$  rango intercuartílico \*  $p < 0.05$ .

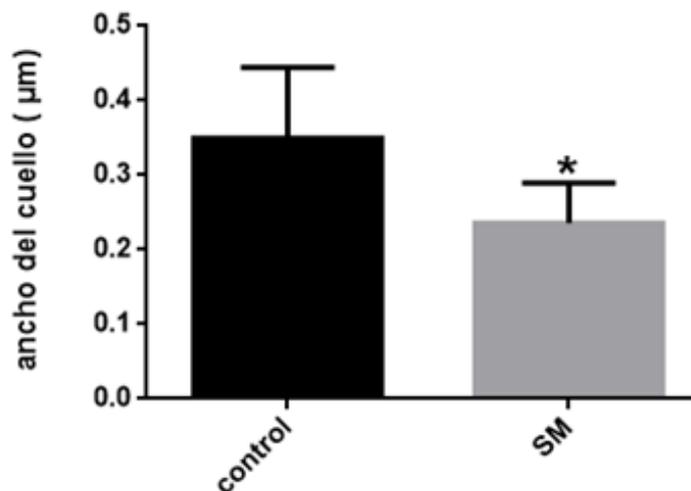
**La SM promovió el aumento en el ancho del cuello de las espinas dendríticas en hipocampo.**

Para el análisis del ancho del cuello de la espina se procedió a medir 340 espinas dendríticas de hipocampo. En el grupo de SM se observaron cuellos más delgados en comparación con el grupo control (**Figura 14 A**). Un análisis cuantitativo encontró que ratones expuestos a SM mostraron una disminución en el ancho del cuello de las espinas dendríticas en comparación con el grupo control (Control =  $0.325 \pm 0.1305 \mu\text{m}$ , SM =  $0.236 \pm 0.10275 \mu\text{m}$ ;  $z = -5.381$ ,  $*p < 0.05$ ) (**Figura 14 B**).

**A)**



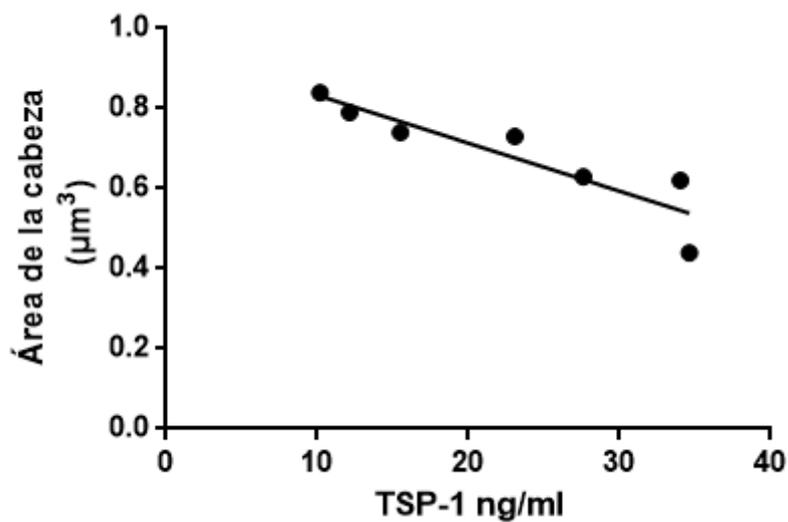
**B)**



**Figura 14. La SM disminuyó el ancho del cuello de las espinas dendríticas de hipocampo.** A) Ejemplos representativos del ancho del cuello de espinas de ratones control (C) y sometidos a separation materna (SM). B) Los ratones que fueron expuestos a SM mostraron un decremento significativo en el ancho del cuello de espinas dendríticas en comparación con el grupo control. Escala de la barra:  $1\mu\text{m}$ . Los datos fueron expresados como la mediana  $\pm$  rango intercuartilico  $* p < 0.05$ .

**Los niveles de TSP-1 correlacionaron con los cambios en el área de la cabeza de la espina dendrítica durante la SM.**

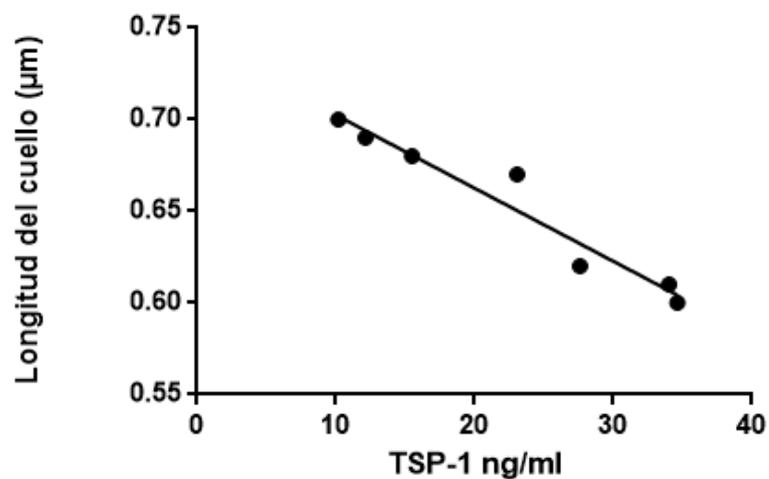
Para determinar si, los cambios en los niveles de TSP-1 estaban asociados con cambios en la morfología neuronal, se realizó una correlación de Pearson para comparar los niveles de TSP-1 con el área de la cabeza de la espina dendrítica. Se encontró una correlación negativa significativa ( $r = - 0.90$ ,  $*p < 0.05$ ), es decir, niveles bajos de TSP-1 correspondieron a tamaños de cabezas más grandes de la espina durante la SM (**Figura 15**).



**Figura 15.** Bajos niveles de TSP-1 se relacionaron con el aumento en el tamaño de la cabeza de la espina dendrítica durante la SM. La gráfica muestra la correlación de la comparación de los niveles de TSP-1 y el área de la cabeza de la espina dendrítica durante la SM.

**Los niveles de TSP-1 correlacionaron con cambios en la longitud del cuello de la espina dendrítica durante la SM.**

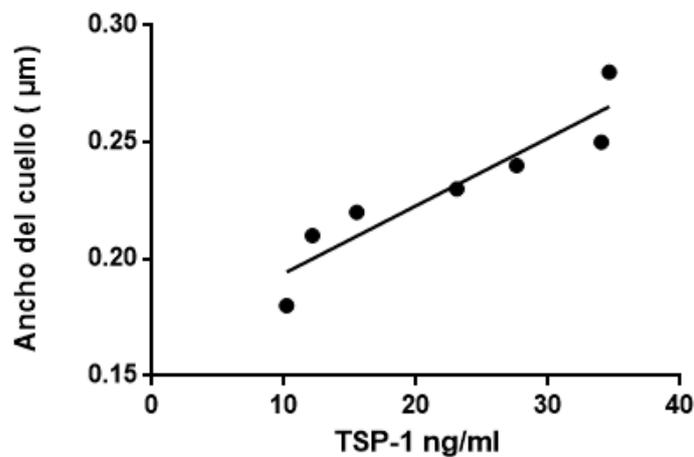
Para determinar si, además de la relación observada de los niveles de TSP-1 y el área de la cabeza de la espina dendrítica producidos por la SM también se encontraron involucrados cambios en el tamaño del cuello, se decidió utilizar una correlación de Pearson para obtener el grado de relación de los niveles de TSP-1 y los cambios en el largo del cuello de la espina. Se encontró una correlación negativa significativa ( $r = - 0.97$ ,  $*p < 0.05$ ), es decir, niveles bajos de TSP-1 se relacionaron con una mayor longitud del cuello de la espina dendrítica durante la SM (Figura 16).



**Figura 16. Bajos niveles de TSP-1 correlacionó con una mayor longitud del cuello de la espina dendrítica durante la SM.** La gráfica muestra la correlación de la comparación de los niveles de TSP-1 y la longitud del cuello de la espina dendrítica durante la SM.

**Los niveles de TSP-1 correlacionaron con cambios en el ancho del cuello de la espina dendrítica durante la SM.**

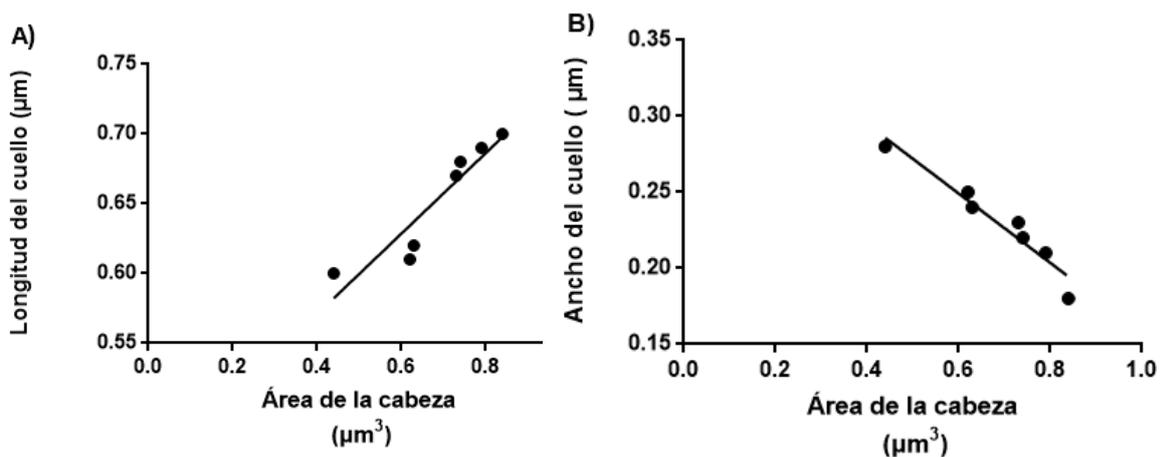
Para averiguar si, además de la relación que se observó en los niveles de TSP-1 con la longitud del cuello de las espinas dendríticas producidos por la SM también se encontraron involucrados cambios en el ancho del cuello, se realizó una correlación de Pearson para obtener el grado de relación de los niveles de TSP-1 con los cambios en el ancho del cuello. Se obtuvo una correlación positiva significativa ( $r= 0.92$   $*p < 0.05$ ), es decir, niveles bajos de TSP-1 corresponden a cuellos más delgados durante la SM, a medida que aumentan los niveles de TSP-1, también aumenta el ancho del cuello (**Figura 17**).



**Figura 17. Bajos niveles de TSP-1 correlacionaron con un incremento del ancho del cuello de la espina dendrítica durante la SM.** Se observa la correlación de la comparación de los niveles de TSP-1 y el ancho del cuello de la espina dendrítica durante la SM.

**El área de la cabeza de la espina dendrítica correlacionó con cambios en el largo y ancho del cuello de la espina dendrítica en hipocampo durante la SM.**

Con el propósito de determinar si hay una relación entre los cambios en la morfología neuronal, después de que los animales fueron sometidos a una SM se realizó una correlación de Pearson para calcular el grado de relación entre el área de la cabeza de la espina dendrítica con el largo y el ancho del cuello de la espina. Se obtuvo una correlación positiva significativa ( $r= 0.93$ ,  $*p< 0.05$ ), esto quiere decir que existe una relación en el tamaño de la cabeza y en el largo del cuello de la espina dendrítica en la SM, cabezas con menor área correspondieron a cuellos más cortos, mientras que cabezas con mayor área se relacionó con cuellos más largos (**Figura 18A**). Se calculó el grado de relación del área de la cabeza con el ancho del cuello, se obtuvo una correlación negativa significativa ( $r= -0.93$ ,  $*p< 0.05$ ), es decir, que existe una relación en el tamaño de la cabeza y el ancho del cuello de la espina dendrítica en la SM, cabezas más grandes correspondieron con cuellos más delgados (**Figura 18 B**).



**Figura 18. Correlación entre los cambios en la morfología de la espina dendrítica en hipocampo durante la SM. A)** Se observa la correlación del tamaño de la cabeza con la longitud del cuello. **B)** Correlación del tamaño de la cabeza con el ancho del cuello de la espina dendrítica.

## 9. Discusión

El desarrollo postnatal temprano representa un periodo en el que las experiencias de los individuos y la interacción con su madre se asocian con el desarrollo emocional y cognitivo. Este periodo involucra múltiples procesos fisiológicos dinámicos que permiten la maduración SNC (Molet, Maras, Avishai-Eliner y Baram, 2014). Cada región madura a diferente velocidad y trayectoria (Avishai-Eliner, Brunson, Sandman y Baram, 2002). Experiencias tempranas adversas, en el caso de los humanos, por ejemplo: negligencia materna, abandono, pobreza o violencia, puede irrumpir la relación madre-infante y conducir a perturbaciones en el neurodesarrollo, generando alteraciones conductuales y cognitivas en los infantes, con una mayor probabilidad de padecer en la edad adulta enfermedades del estado de ánimo, como depresión, ansiedad y estrés (Escolan-Pérez, 2013; Fledman, 2011; Tractenberg et al., 2016). La mayoría de los trabajos de investigación encuentran alteraciones en la funcionalidad del eje hipotalámico hipofisario adrenal, acompañado de la liberación de varios péptidos como por ejemplo: hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés), vasopresina arginina (AVP, por sus siglas en inglés) y hormona adrenocorticotrofina (ACTH, por sus siglas en inglés), que estimula la corteza adrenal para generar la liberación de cortisol (en primates) y corticosterona (en roedores) (Murgatroyd y Spengler, 2011).

En el caso de los roedores, la presencia de conductas maternas, como construcción del nido, asear, lamer y mantener la temperatura de las crías trae consigo efectos benéficos en el desarrollo, por el contrario la disminución o la ausencia de estas conductas desencadena en una mayor vulnerabilidad a futuros eventos adversos y el desarrollo de trastornos de ansiedad, depresión, impedimentos en la formación de la memoria, así como comportamientos sociales y cognitivos alterados (Tractenberg et al., 2016).

La SM es un modelo empleado para generar experiencias adversas en etapas tempranas del desarrollo. Diversos estudios han demostrado que el hipocampo es una estructura altamente susceptible a la SM, desafortunadamente no existe un modelo unificado, lo que conlleva a encontrar discrepancias en los resultados, como por ejemplo: en la generación de neuronas, en la densidad sináptica y en el número de espinas dendríticas, pero por primera ocasión este trabajo de tesis permitió caracterizar de manera sistemática los efectos de la SM en el hipocampo de ratones C57BL/6J, particularmente los mecanismos celulares asociados a la estructura final de la espina dendrítica como es la cabeza y el cuello (McEwen, Nasca & Gray, 2015b), que podrían estar relacionados con los cambios en la concentración de proteínas sinápticas y marcadores de astrocitos y microglia (Marco et al., 2013; Récamier-

Carballo, Estrada-Camarena y López-Rubalcava, 2017; Réus et al., 2018) y afectar diversos procesos cognitivos como memoria, aprendizaje, interacciones sociales y emocionales (Keresztes, Ngo, Lindenberger, Bergner & Newcombe, 2018; Ortiz & Tye, 2014).

En esta tesis se utilizó la SM en ratón como analogía de un cuidado materno deficiente. Nuestros resultados muestran que la SM disminuye los niveles de TSP-1 en hipocampo. Diversos estudios han reportado que niveles bajos de TSP-1 se asocia con la disminución de sinapsis excitatorias y con el decremento de la densidad de espinas dendríticas, cuyas alteraciones se encuentran presentes en diferentes patologías del neurodesarrollo (He et al., 2018; García, Torres, Helguera, Coskun y Busciglio 2010). Además, se ha demostrado que la ausencia de TSP-1 afecta la proliferación y diferenciación de neuronas (Christopherson et al., 2005; Eroglu, 2009). Además de las alteraciones en los niveles de TSP-1 durante la SM, también en otros trabajos se han observado cambios en células gliales, particularmente en la astrogliá (Marco et al., 2013), lo que podría afectar la secreción de TSP-1 produciendo una disminución en su concentración extracelular y afectar el desarrollo y mantenimiento de la espina, pudiendo afectar con ello la modulación de la transmisión sináptica, la liberación de neurotransmisores y la función y maduración de los circuitos neuronales (Gavrilov et al., 2018; Réus et al., 2018).

Las espinas dendríticas son consideradas las principales terminales postsinápticas excitatorias del SNC (Blanchoin, Boujemaa-Paterski y Plastino, 2014) y son el mayor sitio de plasticidad cerebral, la importancia de su estudio reside en que un desarrollo estructural anormal de la espina afectará diversas funciones cognitivas y conductuales. La mayoría de los estudios sobre SM se han enfocado a estudiar las perturbaciones macronatómicas pero han recibido poca atención los cambios que podrían ocurrir en la morfología de las espinas dendríticas. Estudios previos han demostrado que la SM afecta la arborización dendrítica y produce una disminución en la densidad de espinas en neuronas hipocámpales (Gordillo-Hifareda, 2014). Este estudio reportó por primera vez que los ratones sometidos a la SM producen modificaciones en el tamaño de la cabeza y en el cuello de la espina dendrítica del hipocampo, estos cambios podrían ser producidos por los bajos niveles de TSP-1, afectando las vías de señalización involucradas en la modulación y mantenimiento del citoesqueleto de las espinas (Barón-Mendoza et al., 2018). El citoesqueleto de la espina dendrítica está compuesto principalmente de filamentos de actina y permiten modular la estructura de la espina a partir de la activación de receptores AMPA y NMDA que promueven el flujo intracelular de calcio, generando el alargamiento de la espina mediante la polimerización de actina (Fortin et al 2012; Johnson y Ouimet, 2006).

Por otro lado, se ha encontrado que la TSP-1 al unirse al receptor  $\alpha 2\beta - 1$  de gabapentina induce sinaptogénesis y la maduración de la espina dendrítica durante los primeros 10 días postnatales en roedores (Risher et al., 2018) siendo precisamente el periodo en que ocurre la SM. La TSP-1 al unirse al receptor  $\alpha 2\beta - 1$  gabapentina genera la unión de la presinapsis con la postsinapsis y activa la vía de señalización de Ras relacionada con el sustrato de toxina botulínica 1 (Rac1, por sus siglas en inglés) miembro de las proteínas Rho GTPasas, importante para el desarrollo y mantenimiento de la espina dendrítica, activando la reorganización del citoesqueleto. La reducción en los niveles de TPS-1 afectaría la activación de estas vías de señalización, produciendo alteraciones en el crecimiento y maduración de las espinas dendríticas (Adams y Schwartz, 2000; Risher et al., 2018), sugiriendo que la TSP-1 puede ser un modulador importante para el mantenimiento de la espina bajo condiciones de estrés como podría ser la SM.

En otros trabajos se ha encontrado que a mayor tamaño de la cabeza de la espina, mayor será la cantidad de vesículas en las terminales presinápticas, el cual estará acompañado de una mayor densidad postsináptica (PSD, por sus siglas en inglés) (Berry y Nedivi, 2017) y translocación de receptores AMPA y NMDA, afectando procesos plásticos a largo plazo (Noguchi et al., 2005), por ejemplo, se ha encontrado que la estimulación tetánica en neuronas piramidales de CA1 induce la expansión de la cabeza de la espina dendrítica, con un incremento de receptores NMDA y AMPA, así como también un incremento en el ancho del cuello y una disminución en su longitud debido a la modulación de los filamentos de actina, por el contrario, cuando se impide la inducción de LTP no logra producir un alargamiento de la espina dendrítica a pesar de la estimulación tetánica (Yamagata et al., 2009). En otros estudios han demostrado que se puede generar la expansión de la espina dendrítica en ausencia de LTP, aunque esta expansión es inestable y colapsa al poco tiempo (Park et al., 2006; Yang, Wang, Frerking y Zhou, 2008). En un estudio *in vivo* donde se dió seguimiento a espinas individuales durante varias semanas encontró que espinas con cabezas más chicas tiende a ser más endebles, mientras que espinas con cabezas más grandes son funcionalmente más activas, pero con menos plasticidad y en algunas ocasiones permanecen morfológicamente estables durante la vida adulta del animal (Grutzendler et al., 2002). Así mismo, el enzanchamiento de la cabeza inducida por LTP, va acompañada de una disminución en el ancho del cuello, sugiriendo que probablemente compartan los mismos mecanismos celulares para mantener el tamaño de la cabeza y la forma del cuello bajo esta condición experimental, este mismo patrón se observó en las espinas de ratones expuestos a la SM, lo que podría decir que las espinas que sobrevivieron podrían ser funcionales y por lo

tanto, servir como un mecanismo de compensación ante la disminución de la densidad de espinas que se ha reportado en la SM (Sarmiere y Bamburg, 2002). Se ha encontrado que la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios de neuronas piramidales de la corteza correlaciona inversamente con la longitud del cuello de la espina, es decir, a medida que el cuello es más grande menor será el grado de despolarización neuronal, por el contrario, cuando se aplica un protocolo de plasticidad se genera un acortamiento del cuello de la espina y un aumento de los potenciales evocados en las espinas (Araya, Vogels y Yuste, 2014).

Los cambios en la morfología de la espina dendrítica producidas por la SM podría alterar las propiedades eléctricas de la espina, afectando la integridad de las entradas (*inputs*) eléctricos en la dendrita y repercutiendo en la formación, mantenimiento y estabilidad de los circuitos neuronales (Radley et al., 2008; Kwon Sakamoto Peterka y Yuste, 2017; Simon et al., 2014; Yuste, 2013), que son fundamentales para la generación de diversos procesos cognoscitivos.

Algunos trabajos han encontrado en neuronas piramidales de la capa III del área 7a de macacos *rhesus* viejos, cabezas de espinas dendríticas con mayor tamaño, específicamente en espinas delgadas y de tipo hongo en comparación con espinas de macacos jóvenes, además encontraron que estos cambios están asociados con un mejor desempeño de la memoria de trabajo (Motley, Grossman, Janssen, Baxter, Rapp, Dumitriu y Morrison, 2018). En un estudio con cerebros humanos postmortem, encontraron que un mayor tamaño de la cabeza de la espina dendrítica podría disminuir el riesgo de desarrollar demencia (Boros, Greathouse, Curtis, Birchall, Gearing y Herskowitz, 2017), sugiriendo que las alteraciones conductuales producidas por la SM en etapa adulta podrían estar relacionadas a cambios en la cabeza y el cuello de la espina dendrítica.

Este trabajo permitió entender algunos mecanismos celulares implicados en las alteraciones neuronales producidas por la SM. Se encontró por primera ocasión en ratones C57BL/6J que la SM disminuye los niveles de TSP-1 en el hipocampo. Esto afecta la estructura fina de la espina dendrítica, probablemente porque afecta las vías de señalización involucradas en el desarrollo, mantenimiento y dinámica de la espina dendrítica, estudios futuros deberán realizarse para comprobar cómo la disminución de TSP-1 afecta las vías de señalización asociadas a la polimerización de actina. Será fundamental establecer si los cambios observados en las espinas producidas por nuestro modelo de SM perduran hasta la edad adulta. Así mismo, se necesitará investigar si los cambios en los niveles de TSP-1 y en la morfología de las espinas dendríticas están relacionadas con las alteraciones conductuales y cognoscitivas producidas por la SM. Los resultados encontrados en esta tesis reflejan el esfuerzo por comenzar a sistematizar las alteraciones celulares, morfológicas, cognitivas y

conductuales producidas por la SM y que podrían probablemente encontrarse en mayor o menor grado en los cerebros de los infantes que sufrieron negligencia materna. Para ello será indispensable a largo plazo investigar si en los seres humanos se podrían extrapolar los resultados obtenidos en esta tesis.

## **10. Conclusiones**

- La SM produce una disminución de los niveles de TSP-1 en el hipocampo de ratón
- La SM produce un incremento en el área de la cabeza de la espina dendrítica, pero no en el diámetro de la cabeza.
- La SM incrementa la longitud del cuello de la espina dendrítica y disminuye el ancho del cuello de la espina.
- Los niveles de TSP-1 se relacionan con cambios en la morfología de la espina dendrítica durante la SM.
- Los resultados en su conjunto sugieren que la SM produce cambios en los niveles de TSP-1 que afecta la morfología de la espina dendrítica y abre la posibilidad de estudiar el papel de la TSP-1 en condiciones de estrés

## 11. Referencias

- Adams, J. C. (2001). Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 25-51.
- Adams, J. C., & Lawler, J. (2004). The thrombospondins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), 961-968.
- Adams, J. C., & Lawyer, J. (2011). The thrombospondins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), a009712.
- Adams, J. C., & Schwartz, M. A. (2000). Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *The Journal of Cell Biology*, 150(4), 807-22.
- Adams, J. C., & Tucker, R. P. (2000). The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Developmental Dynamics*, 218(2), 280-299.
- Aksic, M., Radonjic, N., Aleksic, D., Jevtic, G., Markovic, B., Petronijevic, N.,... Filipovic, B. (2014). Long term effects of maternal deprivation on the neuronal soma area in the rat neocortex. *BioMed Research International*, 2014, 235238.
- Allen, N. J., Suman, M. W., Rourke, N. A., Park, C. Y., Engin, O., Chakraborty, C., & Barres, B. (2009). Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell*, 139(2), 380-92.
- Araya, R., Vogels, T., & Yuste, R. (2014). Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength. *Proceedings of National Academic of science*, 111(28), E2895-904.
- Arborelius, L., & Eklund, M. B. (2007). Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neuroscience*, 145(2), 738-50.
- Asch, A. S., Leung, L. L., Shapiro, J., & Nachman, R. L. (1986). Human brain glial cells synthesize thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2904-8.
- Asrican, B., Lisman, J., & Otmakhov, N. (2007). Synaptic strength of individual spines correlates with bound Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent kinase II. *Journal of Neuroscience*, 27, 14007-011.
- Avishai-Eliner, S., Brunson, K.L., Sandman, C.A., & Baram, T. Z. (2002). Stressed-out, or in (utero)?. *Trends in neuroscience*, 25(10), 518-24.
- Barón-Mendoza, I., García, O., Calvo-Ochoa, E., Rebollar-García, J. O., Garzón-Cortés, D., Haro, R., & González-Arenas, A. (2018). Alterations in neuronal cytoskeletal and astrocytic proteins content in the brain of the autistic-like mouse strain C58/J. *Neurosciences Letters*, 682, 32-38.

- Bath, K., Manzano-Nieves, G., & Goodwill, H. (2016). Early life stress accelerates behavioral and neural maturation of the hippocampus in male mice. *Hormones and Behavior*, 82, 64-71.
- Be Bartolo, P., Florenzano, F., Burello, L., Gelfo, F., Petrosini, L. (2014). Activity-dependent structural plasticity of Purkinje cell spines in cerebellar vermis and hemisphere. *Brain structure and function*, 220(5), 2895-904.
- Berry, K. P., & Nedivi, E. (2017). Spine Dynamics: Are They All the Same?. *Neuron*, 96(1), 43-55.
- Bertling, E., & Hotulainen, P. (2017). New waves in dendritic spine actin cytoskeleton: From branches and bundles to rings, from actin binding proteins to post-translational modifications. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 84,77-84.
- Bian, Y., Yang, L., Wang, Z., Wang, Q., Zeng, L., & Xu, G. (2015). Repeated Three hour maternal separation induces depression like behavior and affects the expression of hippocampal plasticity related proteins in C57BL/6N mice. *Neuronal Plasticity*, 2015, 627837.
- Blair, P., & Flaumenhalf, R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Review*, 23(4), 177-89.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics architecture and mechanics in cell motility. *Physiological Review*, 94(1), 235-63.
- Boccia, M., & Pedersen, C. (2001). Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology*, 26(7), 657-72.
- Bock, J., Gruss, M., Becker, S., & Braun, K. (2005). Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: Correlation with developmental time windows. *Cerebral Cortex*, 15(6), 802–808.
- Bornstein, P. (2009). Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3-4), 163-165.
- Boros, B. D., Greathouse, K. M., Gentry, E. G., Curtis, K. A., Birchall, E. L., Gearing, M., & Herskowitz, J. H. (2017). Dendritic spines provide cognitive resilience against Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 82(4),602-614.
- Bouvette-Turcot, A., Unternaehrer, E., Gaudreau, H., Lydon, J., Steiner, M., & Meaney, M. (2017). The joint contribution of maternal history of early adversity and adulthood depression to socioeconomic status and potential relevance for offspring development. *Journal of Affective Disorders*, 207, 26-31.
- Bujak, E., Pretto, F., Ritz, D., Gualandi, L., Wulhfard, S., & Neri, D. (2014). Monoclonal antibodies to murine trombospondin-1 and trombospondin-2 reveal differential expression patterns in Cancer and low antigen expression in normal tissues. *Experimental Cell Research*, 327(1), 135-45.
- Carlson, C., Lawyer, J., & Mosher, D. (2008). Structures thrombospondins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(5), 672-686.

- Chen, H., Herndon, M. E., & Lawyer, J. (2000). The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology: Journal of International Society of Matrix Biology*, 19(7), 597-614.
- Chen, P., & Hong, W. (2018). Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron*, 98(1), 16-30.
- Cheng, C., Lau, M., & Doering, L. (2016). Astrocyte-secreted thrombospondin-1 modulates synapse and spine defects in the fragile X mouse model. *Molecular Brain*, 9(1), 74.
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., & Orekhov, A. N. (2017). Thrombospondins: A Role in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Science*, 18(7), 1540.
- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Maślanka, I., Hess, G., & Wędzony, K. (2013). Early life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *The European Journal of Neuroscience*, 38(1), 2089-107.
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. A., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., & Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120(3), 421–33.
- Chu, Y., Ko, C., Wang, J., Wang, M., Gean, W., Kuo, M., & Wang, M. (2015). Astrocyte CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\delta$  Regulates Neuronal Viability and Spatial Learning Ability via miR-135a. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 4173-4188.
- Cirulli, F., Berry, A., & Alleva, E. (2003). Early disruption of the mother-infant relationship: Effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 73–82.
- Cline, H. (2001). Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(1), 118-26.
- Colga, LA., & Yasuda, R. (2014). Plasticity of dendritic spines: subcompartmentalization of signaling. *Annual Review of Physiology*, 76,365-85.
- Conrad, C., Ortiz, J., & Judd, J. (2017). Chronic stress and hippocampal dendritic complexity: Methodological and functional considerations. *Physiology Behavior* 1(178), 66-81.
- Dandi, N., Kalamari, A., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Nousiopoulou, E., Simeonidou, C.,...Tata, D. (2018). Beneficial effects of environmental enrichment on behaviour, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 67,19-32.
- Danielewicz, J., Trenk, A., & Hess, G. (2017). Imipramine ameliorates early life stress-induced alterations in synaptic plasticity in the rat lateral amygdala. *Behavioral Brain Research*, 317,319-26.
- De Campo, D. M., Cameron, J. L., Miano, J.M., Lewis, D. A., Mirnics, K., & Fudge, J. L. (2017). Maternal deprivation alters expression of neural maturation gene *tbr1* in the amygdala paralamina nucleus in infant female macaques. *Developmental Psychobiology*, 59(2), 235-49.

- Eiland, L., & McEwen, B. (2010). Early Life Stress Followed by Subsequent Adult Chronic Stress Potentiates Anxiety and Blunts Hippocampal Structural Remodeling. *Hippocampus*, 22(2012), 82-91.
- Elias, E., Yang, N., Wang, P., & Tian, N. (2018). Glutamate activity regulates and dendritic development of J-RGCs. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 12-249.
- Eroglu, C. (2009b). The role of astrocyte-secreted extracellular matrix proteins in central nervous system development and function. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 3(3-4), 167-76.
- Eroglu, C., Allen, N. J., Susman, M. W., O'Rourke, N. A., Park, C. Y., Ozkan, E.,... Barres, B. A. (2009a). Gabapentin Receptor  $\alpha 2\beta$ -1 Is a Neuronal Thrombospondin Receptor Responsible for Excitatory CNS Synaptogenesis. *Cell*, 139(2), 380-92.
- Escolan-Pérez, E. (2013). El cerebro materno y sus implicaciones en el desarrollo humano. *Revista de Neurología*, 56(2), 101-08.
- Farhy-Tselnicker, I., & Allen, J. N. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Development*, 13, 7.
- Farrell, M. R., Holland, F. H., Shansky, R. M., & Brenhouse, H. C. (2016). Sex-specific effects of early life stress on social interaction and prefrontal cortex dendritic morphology in young rats. *Behavioral Brain Research*, 10, 119-25.
- Feldman R. (2011). *Maternal touch and the developing infant*. New York: Springer.
- Fortin, D., Srivastava, T., & Soderling, T. (2012). Structural Modulation of dendritic spines during synaptic plasticity. *The Neuroscientist*, 18(4), 326-41.
- Fox, W. (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Animal Behaviour*, 13(2), 243-IN5.
- Franklin, T., Saab, B., & Mansuy, I. (2012). Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. *Neuron*, 75(5), 747-61.
- García, O., Torres, M., Helguera, P., Coskun, P., & Busciglio, J. (2010). A role for thrombospondin-1 deficits in astrocyte-mediated spine and synaptic pathology in Down's syndrome. *Plos one*, 5(12), e14200.
- García-López, P., García-Marín, V., & Freire, M. (2007). The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience, *Progress in Neurobiology*, 83(2), 110-30.
- Gavrilov, N., Golyagina, I., Brazhe, A., Scimemi, A., Turlapov, V., & Semyanov, A. (2018). Astrocytic Coverage of Dendritic Spines, Dendritic Shafts, and Axonal Boutons in Hippocampal Neuropil. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 248.
- González-Burgos, I. (2012). From synaptic transmission to cognition: an intermediary role for dendritic spines. *Brain and Cognition*, 80(1), 177-83.
- Gordillo-Higareda, S. (2014). *La separación maternal temprana y la formación de las espinas dendríticas en ratones*. (Tesis de Licenciatura publicada). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de:

[http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/K5B8Y2U1L66VIPU7D5GTHJGFPEV2TQL9AA3XUKLCG1LURUF8QU-23490?func=full-set-set&set\\_number=041652&set\\_entry=000016&format=999](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/K5B8Y2U1L66VIPU7D5GTHJGFPEV2TQL9AA3XUKLCG1LURUF8QU-23490?func=full-set-set&set_number=041652&set_entry=000016&format=999).

- Grutzendler, J., Kasthuri, N., & Gan, W. B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420, 812–816.
- He, Z., Guo, Q., Yang, Y., Wang, L., Zhang, S., Yuan, W., Li, L., Zhang, J., Hou, W., Yang, J., Jia, R., & Tai, F. (2018). Pre-weaning paternal deprivation impairs social recognition and alters hippo-campal neurogenesis and spine density in adult mandarin voles. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155, 452-462.
- Hill, T. C., & Zito, K. (2013). LTP-induced long-term stabilization of individual nascent dendritic spines. *Journal of Neuroscience*, 33, 678-86.
- Holland, F., Ganguly, P., Potter, D., Chartoff, E., & Brenhouse, H. (2014). Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. *Neuroscience Letters*, 30(566), 131-6.
- Huang, T., Sun, L., Yuan, X., & Qiu, H. (2017). Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget*, 8(48), 84546-58.
- Johnson, O. L., & Ouimet, C. C. (2006). A regulatory role for actin in dendritic spine proliferation. *Brain Research*, 1113(1), 1-9.
- Kang, S., Byun, J., Min-Son, S., & Mook-Jung, I. (2018). Thrombospondin-1 protects against A $\beta$  induces mitochondrial fragmentation and dysfunction in hippocampal cells. *Cell Death Discovery*, 4,31.
- Kasai, H., Hayama, T., Ishikawa, M., Watabe, S., Yagishita, S., & Noguchi, J. (2010). Learning rules and persistence of dendritic spines. *European Journal of Neuroscience*, 32, 241-249.
- Keresztes, A., Ngo, C., Lindenberger, U., Werkle-Bergner, M., & Newcombe, N. (2018) Hippocampal maturation drives memory from generalization to specificity. *Trends in Cognitive Sciences*, 22(8), 676-86.
- Kim, E., Pellman, B., & Kim, J. (2015). Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learning and Memory*, 22(9), 411-6.
- Koe, A., Ashokan, A., & Mitra, R. (2016). Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. *Translational psychiatry*, 6, e729.
- Kolb, B., & Wishaw, Q. (2003). *Human Neuropsychology*, New York, EE.UU: W. H. FREEMAN.
- Krugers, H. J., Oomen, C. A., Gumbs, M., Li, M., Velzing, E. H., Joels, M., & Lucassen, P. J. (2012). Maternal deprivation and dendritic complexity in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, 62(1), 534-7.
- Kuhn, C. M., & Schanberg, S. M. (1998). Response to Maternal Separation Mechanisms and Mediators. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3-4), 261-70.

- Kwon, T., Sakamoto, M., Peterka, D. S., & Yuste, R. (2017). Attenuation of Synaptic Potentials in Dendritic Spines. *Cell*, 20(5), 1100-1110.
- Lawler, J. (2000). The functions of thrombospondin-1 and-2. *Current opinion in cell biology*, 12(5), 634-40.
- Liau, J., Hoang, S., Choi, M., Eroglu, C., Cho, M., Sun, G.,... Steinberg, G. (2008). Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 28(10), 1722-32.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., & Meaney, M. (2000). Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience*, 3, 799-806.
- Liu, Z., Morgan, S., Ren, J., Wang, Q., Annis, S., Mosher, D.,... Liu, B. (2015). Thrombospondin-1 (TSP1) Contributes to the Development of Vascular Inflammation by Regulating Monocytic in Mouse of Abdominal Aortic Aneurysm. *Circulation Research*, 117(2), 129-41.
- Loi, M., Mossink, J. C. L., Meerhoff, G. F., Den Blaauwen, J. L., Lucassen, P. L. & Joëls, M. (2015). Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. *Neuroscience*, 7(342), 101-119.
- Lopez-Dee, Z., Pidcock, K., & Gutiérrez, L. (2011). Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2011, 296069.
- Maier, G., Ruhle, B., Stein, J., Gentile, L., Middleton, A., & Gahtan, V. (2016). Thrombospondin-1 differentially regulates microRNAs in vascular smooth cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 412(1-2), 111-7.
- Marco, E. M., Valero, M., de la Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramirez, M. J., & Viveros, M. P. (2013). Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology*, 68, 223-31.
- Masrour, F., Peeri, M., Azarbayjani, M., & Hosseini, M. (2017). Voluntary exercise during adolescence mitigated negative the effects of maternal separation stress on the depressive like behaviours of adult male rats: role of NDMA receptors. *Neurochemical Research*, 43(5), 1067-74.
- Mathus, D., Furman, J., & Norris, C. (2011). Preparation of acute hippocampal slices from rats and transgenic mice for the study of synaptic alterations during aging and amyloid pathology. *Journal of Visualized Experiments*, 23(49), pii: 2330.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davis, C., & Kassai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429, 761-6.
- McEwen, B. (2016). Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*, 1645, 50-4.
- McEwen, B., Nasca, C., & Gray, J. (2015a). Stress effects on Neuronal Structure: hippocampus, amygdala and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*. 41(1), 3-23.
- McEwen, B., Nicole, B., Gray, J., Hill, M., Hunter, R., Karatsoreos, I.,... Nasca, C. (2015b). Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1353-63.

- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, *24*, 1161-92.
- Melendez-Ferro, M., Perez-Costas, E., & Roberts, R. C. (2009). A new use for long-term frozen brain tissue: golgi impregnation. *Journal of neuroscience methods*, *176*(2), 72-7.
- Melo, S., Antoniazzi, C., Hossain, S., & Kolb, B. (2018). Neonatal stress has a long lasting sex dependent effect on anxiety like behavior and neuronal morphology in the prefrontal cortex and hippocampus. *Developmental Neuroscience*, *40*(2), 93-103.
- Mendus, D., Rankin-Gee, E. K., Mustapha, M., & Porter, B. E. (2015). Increased sensitivity to kindling in mice lacking TSP1. *Neuroscience*, *305*, 302-08.
- Meyer, U., & Feldon, J. (2010). Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, *90*, 285-326.
- Minerbi, A., Kahana, R., Goldfeld, L., Kaufman, M., Marom, S., & Ziv, NE. (2009). Long-term relationships between synaptic tenacity, synaptic remodeling, and network activity. *Plos Biology*, *7*(6), e1000136.
- Min-Son, S., Nam, D., Cha, M., Kim, K., Byun, J., Ryu, H., & Mook-Jung, I. (2015). Thrombospondin-1 prevents amyloid beta- mediated synaptic pathology in Alzheimer's diseases. *Neurobiology of Aging*, *36*(12), 3214-27.
- Molet, J., Maras, P., Avishai-Eliner, S., & Baram, T. (2014). Naturalistic Rodent Models of Chronic Early- life Stress. *Developmental psychobiology*, *56*(8), 1675-88.
- Monroy, E., Hernández, E., & Flores, G. (2010). Maternal Separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens in male rat offspring. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. *40*(2010), 93-101.
- Motley, S. E., Grossman, Y. S., Janssen, W. G. M., Baxter, M. G., Rapp, P. R., Dumitriu, D., & Morrison, J. H. (2018). Selective Loss of Thin Spines in Area 7a of the Primate Intraparietal Sulcus Predicts Age-Related Working Memory Impairment. *The Journal of Neuroscience*, *38*(49), 10467-10478.
- Muhammand, A., & Kolb, B. (2011). Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. *Behavioural Brain Research*, *223*(1), 7-16.
- Murgatroyd, C., & Spengler, D. (2011). Epigenetics of early child development. *Frontiers in psychiatry*, *2*, 16.
- Nargel, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., & Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, *44*(5), 759-67.
- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C. & Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron*, *46*, 609-62.
- Ohta, K., Suzuki, S., Warita, K., Kaji, T., Kusaka, T., & Miki, T. (2017). Prolonged maternal separation attenuates BDNF-ERK signaling correlated with spine formation in the

- hippocampus during early brain development. *Journal of Neurochemistry*, 141(2), 179-194.
- Okada-Tsuchioka, M., Segawa, M., Kajitani, N., Hisaoka-Nakashima, K., Shibasaki, C., Morinobu, S., & Takebayashi, M. (2014). Electroconvulsive seizure induces thrombospondin-1 in the adult rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 3(482), 36-44.
- Oreland, S., Nylander, I., & Pickering, C. (2010). Prolonged maternal separation decreases granule cell number in the dentate gyrus of 3 week old male rats. *International Journal Developmental Neuroscience*, 28(2), 139-44.
- Orlowski, D., & Bjarkam, C. (2012). A simple reproducible and time saving method of semi-automatic dendrite spine density estimation compared to manual spine counting. *Journal of Neuroscience Methods*, 208(2), 128-33.
- Ortiz, A., & Tye, K. (2014). Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. *Journal Neuroscience*, 34(2), 586-95.
- Ovtscharoff, W., Helmeke, C., & Braun, K. (2006). Lack of parental care affects synaptic development in the anterior cingulate cortex. *Brain Research*, 1116(1), 58-63.
- Park, M., Salgado, J. M., Ostroff, L., Helton, T. D., Robinson, C. G., Harris, K.M., & Ehlers, M. D. (2006). Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52, 817–830.
- Poeggel, G., Helmeke, C., Abraham, A., Schwabe, T., Friedrich, P., & Braun, K. (2003). Juvenile emotional experience alters synaptic composition in the rodent cortex, hippocampus, and lateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 16137-42.
- Radley, J. J., Rocher, A. B., Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dammann, M., McEwen, B.,... Hof, P. R.(2008). Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *The Journal of comparative neurology*, 507(1),1141-50.
- Récamier-Carballo, S., Estrada-Camerene, E., & López-Rubalcava, C. (2017). Maternal separation induces long-term effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor levels on the frontal cortex, amygdala, and hippocampus: differential effects after a stress challenge. *Behavioral Pharmacology*, 28(7), 545-557.
- Redondo, R., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Neuroscience*, 12(1), 17-30.
- Resovi, A., Pinessi, D., Chiorino, G., & Taraboletti, G. (2014). Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 37, 83-91.
- Réus, G.Z., Silva, R.H., de Moura, A.B., Presa, J.F., Abelaira, H.M., Abatti, M.,...Quevedo, J. (2018). Early Maternal Deprivation Induces Microglial Activation, Alters Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity and Indoleamine 2,3-Dioxygenase during the Development of Offspring Rats. *Molecular Neurobiology*, doi: 10.1007/s12035-018-1161-2.

- Rincel, M., Lépinay, A., Janthakhin, Y., Soudain, G., Yvon, S., Da Silva, S.,... Darnaudey, M. (2018). Maternal high-fat diet and early stress differentially modulate spine density and dendritic morphology in the medial prefrontal cortex of juvenile and adult rats. *Brain Structure and Function*, 223(2), 883-95.
- Risher, C., Kim, N., Koh, S., Choi, J., Mitev, P., Spence, E.,... Eroglu, C. (2018). Thrombospondin receptor 2-1 promotes synaptogenesis and spinogenesis via postsynaptic Rac1. *Journal of Cell Biology*, pii: jcb.201802057.
- Santolini, I., Celli, R., Cannella, M., Imbriglio, T., Guiducci, M., Parisi, P.,... Nicoletti, F. (2017). Alterations in the a2d ligand, thrombospondin-1, in a rat model of spontaneous absence epilepsy and in patients with idiopathic/genetic generalized epilepsies. *Epilepsia*, 58(11), 1993-2001.
- Sarabdjitsingh, R., Loi, M., Joels, M., Dijkhuizen, R., & Van der Toorn, A. (2017). Early life stress-induced alterations in rat brain structures measured high resolution MRI. *Plos One*, 12(9), e0185061.
- Sarmiere, P. D., & Bamberg, J. R. (2002). Head, neck, and spines: a role for LIMK-1 in the hippocampus. *Neuron*, 35(1), 3-5.
- Seo, K., Jung, Lee, J. G., Hien, L. T., Park, S. W., & Kim, Y.H. (2017). Effects of maternal separation and antidepressant drug on epigenetic regulation of the BDNF exon I promoter in the adult rat hippocampus. *Psychiatry and clinical neurosciences*, 72(4), 255-265.
- Shin, S., Han, S., Woo, R., Jang, S., & Min, S. (2016). Adolescent mice show anxiety and aggressive like behavior and the reduction of long term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation. *Neuroscience*, 1(316), 221-31.
- Simon, C.M., Hepburn, I., Chen, W., & De Schutter, E. (2014). The role of dendritic spine morphology in the compartmentalization and delivery of surface receptors. *Journal of computational Neuroscience*, 36(3), 483-97.
- Sousa, V., Vital, J., Costenla, A., Batalha, V., Sebastiao, A., Ribeiro, J., & Lopes, L. (2014). Maternal separation impairs long term potentiation in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiology Aging*, 35(7), 1680-5.
- Stenina-Adognravi, O. (2014). Invoking the power of thrombospondins: Regulation of thrombospondins expression. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 37, 69-82.
- Takatsuru, Y., Yoshitomo, M., Nemoto, K., & Nabekura, J. (2009). Maternal separation decrease the stability of mushroom spines in adult mice somatosensory cortex. *Brain Research*, 1294, 45-51.
- Tata, A. (2012). Maternal Separation as a Model of Early Stress: Effects on Aspects of Emotional Behaviour and Neuroendocrine Function. *Behavioral Brain Research*, 9, 84-101.
- Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., & Redondo, R. (2015). Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, 87(5), 918-31.

- Tractenberg, S.G., Levandowski, M.L., de Azeredo, L.A., Orso, R., Roithmann, L.G., Hoffmann, E.S. (2016). An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neuroscience and Biobehavioral*, 68, 489-503.
- Urao, N., Mirza, E., Corbiere, T., Hollander, Z., Borchers, C., & Koh, T. (2017). Thrombospondin-1 and disease progression in dysferlinopathy. *Human Molecular Genetics*, 26(24), 4951-60.
- Valencia, R., Colín, L., & Van der Goes. (2017). Las espinas dendríticas, su función y algunas alteraciones. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 16(1), 46-55.
- Van Bodegom, M., Homberg, J., & Henckens, J. (2017). Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 87.
- Van Hasselt, N., De Visser, L., Tieskens, M., Cornelise, S., Baars, M., Lavrijsen, M.,... Joe ls, M. (2012). Individual Variations in Maternal Care Early in Life Correlate with Later Life Decision-Making and c-Fos Expression in Prefrontal Subregions of Rats. *Plos One*, 7(5), e37820.
- Villejas, J. (2016). *La Función de la Trombospondina-1 (TSP-1) en la Plasticidad Neuronal.* (Tesis de Maestría no publicada). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de:  
[http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/K5B8Y2U1L66VIPU7D5GTHJGFPEV2TQL9AA3XUKL CG1LURUF8QU-47365?func=full-set-set&set\\_number=041652&set\\_entry=000011&format=999](http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/K5B8Y2U1L66VIPU7D5GTHJGFPEV2TQL9AA3XUKL CG1LURUF8QU-47365?func=full-set-set&set_number=041652&set_entry=000011&format=999).
- Vyas, A., Bernal, S., & Chatterji, S. (2002). Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Research*, 965(1-2), 290-4.
- Weinberg, J., Smotherman, P., & Levine, S. (1978). Early handling effects on neophobia and conditioned taste aversion. *Physiology and Behavior*, 20(5), 589-96.
- Wieck, A., Andersen, S., & Brenhuse, H. (2013). Evidence for a neuroinflammatory mechanism in delayed effects of early life adversity in rats: Relationship to critical NMDA receptor expression. *Brain Behaviour and Immunity*, 28, 218-26.
- Wu, X., Luo, X., Zhu, Q., Zhang, J., Liu, Y., Luo, H.,... Xie, Z. (2017). The Roles of Thrombospondins in Hemorrhagic Stroke. *BioMed Research International*. 2017, 8403184.
- Xue, X., Shao, S., Wang, W., & Shao, F. (2013). Maternal separation induces alterations in reversal learning and Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in Adult Rats. *Neuropsychobiology*, 68(4), 243-9.
- Yamagata, Y., Kobayashi, S., Umeda, T., Inoue, A., Sakagami, H., Fukaya, M.,... Okabe, S. (2009). Kinase-Dead Knock-In Mouse Reveals an Essential Role of Kinase Activity of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II $\alpha$  in Dendritic Spine Enlargement, Long-Term Potentiation, and Learning. *The Journal of Neuroscience*, 29(23), 7607-18.
- Yang, X. D., Liao, XM., Uribe-Mariño, A., Liu, R., Xie, XM., Jia, J.,... Si, TM. (2014). Stress during a Critical Postnatal Period Induces Region-Specific Structural Abnormalities and

- Dysfunction of the Prefrontal Cortex via CRF. *Neuropsychopharmacology*, 40(5),1203-15.
- Yang, Y., Wang, X., Frerking, M & Zhou, Q. (2008). Spines expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 28, 5740-51.
- Yu, K., Summers, J., Li, F., Liu, X., Ma, P., Kaminski, J., & Zhuang, J. (2008). TSP-1 secreted by bone marrow stromal cells contributes to retinal ganglion cell neurite outgrowth and survival. *Plos One*, 3(6), e2470.
- Yuste, R. (2013). Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*, 36, 429-49.
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1071-89.
- Zaqout, S., Kaind, A. M. (2006). Golgi-Cox Staining Step by Step. *Frontiers in neuroanatomy*, 10, 38.
- Zhang, X., & Lawyer, J. (2007). Thrombospondin-based Antiangiogenic therapy. *Microvascular Research*, 74(2-3), 90-9.
- Zhou, Q., Homman, K.J., & Poo, M.M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44(5), 749-57.
- Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., & Svoboda, K. (2009). Rapid Functional Maturation of Nascent Dendritic Spines. *Cell*, 61(2), 247-58.