



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

“EXPRESIÓN DE TROMBOSPONDINA-1 (TSP-1) EN RATONES
C57BL/6J EXPUESTOS A AMBIENTES ENRIQUECIDOS”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:
JANINTZITZIC LÓPEZ NIÑO

DIRECTOR DE TESIS
DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

REVISORA
DRA. BEATRIZ GÓMEZ GONZÁLEZ



® Facultad
de Psicología

MÉXICO, D. F.

ABRIL, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Neurobiología del síndrome de Down de la Facultad de Psicología de la UNAM.

Durante el desarrollo de este trabajo, se contó con el apoyo y una beca del proyecto PAPIIT IN217211-3 *“Patología y plasticidad de las espinas dendríticas en el síndrome de Down. Contribución de la Trombospondina-1 (TSP-1)”*.

Se hace un agradecimiento especial a la Dra. Laura Colín Barenque de la FES-Iztacala, UNAM, Biol. Ivonne Sánchez Cervantes, y Biol. Irma López Martínez de la Facultad de Medicina, UNAM, por su orientación y sugerencias en la técnica de Golgi y de inmunohistofluorescencia.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios y mi segundo hogar, por acogerme desde niña en su mundo de ciencia y cultura.

A mi director de tesis, el Dr. Octavio García, por permitirme participar en el establecimiento del laboratorio “Neurobiología del síndrome de Down” en la Facultad de Psicología, por todas sus enseñanzas y por el apoyo para la realización de esta tesis.

A mi revisora de tesis, la Dra. Beatriz Gómez, por las observaciones y aportaciones hechas tanto a mi anteproyecto, como a la tesis.

A mis compañeros de laboratorio, David y Jessica Nayeli, por todas las experiencias compartidas, por todo el trabajo en equipo, las dificultades experimentadas y los ánimos mutuos para continuar con nuestros respectivos proyectos. Hacer investigación a su lado fue un placer.

Agradezco especialmente a mis papás por todo el apoyo que me han brindado. Sin ustedes mucho de este trabajo no habría sido posible.

Dedicatorias.

Con amor a Erendirita y Paco, mis papás, por acompañarme en cada proyecto que emprendo, por impulsarme siempre a ser mejor y a esmerarme por alcanzar mis metas. Sus enseñanzas, amor y confianza han sido la base para mi desarrollo personal y académico. Por todo, gracias.

A mis hermanos, Iyarí e Itzcoatl, porque saben perfecto cómo hacerme reír y enojar en los momentos más inesperados, por sus abrazos colectivos y su presencia siempre alegre. A los dos, los quiero.

Con todo el cariño que mi corazón de roca puede albergar, con admiración y respeto a José Luis Baroja. En realidad, no tengo palabras para expresar lo afortunada que he sido al poder conocerte, al poder contar contigo

A mis amigos de la Facultad de Psicología, en especial a Cecilia, Eduardo, Rocío y Ángel. Porque de entre todos los entes vivientes que me rodearon durante la carrera, no pude haber encontrado a personas que me hicieran más sentido que ustedes, por su dedicación a lo que les apasiona, y sobre todo, por aceptarme con toda mi hostilidad.

A quien me acompañara en parte importante de este camino e hiciera de él un torbellino de emociones y hermosos descubrimientos. Agradezco y celebro el habernos encontrado, conocido y disfrutado. Desde este lado del río, te quiero.

Contenido

Resumen.....	1
Abreviaturas.....	2
Introducción.....	3
1. Espinas dendríticas.....	6
1.1 Generalidades de las espinas dendríticas.....	6
1.2 Función y ultraestructura de las espinas dendríticas.....	10
1.3 Espinogénesis.....	12
1.4 Espinas dendríticas, estructuras plásticas.....	14
2. Trombospondina-1.....	16
2.1 Generalidades de la Trombospondina-1.....	16
2.2 Función espinogénica y sinaptogénica de la Trombospondina-1.....	18
3. Ambientes enriquecidos.....	21
3.1 Generalidades de los ambientes enriquecidos.....	21
3.2 Efectos de los ambientes enriquecidos en el cerebro.....	23
4. Objetivos.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. Hipótesis.....	26
6. Métodos y materiales.....	26
6.1 Sujetos.....	26
6.2 Procedimiento general.....	27
6.2.1 Ambientes enriquecidos.....	27
6.2.2 Tinción de Golgi.....	28
6.2.3 Análisis de espinas dendríticas.....	29
6.2.4 Inmunohistofluorescencia.....	30
6.2.5 Determinación de Trombospondina-1. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA).....	31
6.2.6 Análisis Estadístico.....	33
7. Resultados.....	34
7.1 Ambientes enriquecidos.....	34

7.2 Los ambientes enriquecidos favorecen la formación de espinas dendríticas en ratones C57BL/6J.....	35
7.3 Los ratones C57BL/6J expresan Trombospondina-1 en el cerebro.....	38
7.3.1 Los ambientes enriquecidos incrementan los niveles de Trombospondina-1 en la corteza de ratones C57BL/6J.....	41
7.3.2 Los ambientes enriquecidos no producen cambios significativos en los niveles de Trombospondina-1 en hipocampo.....	42
8. Discusión	44
9. Conclusiones.....	50
10. Referencias.....	52

Resumen

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias membranosas que emergen de las dendritas de la neurona y constituyen el principal sitio de contacto sináptico excitatorio en el cerebro. Las espinas son estructuras móviles y heterogéneas cuya morfología y desarrollo es influida por la propia actividad cerebral y la estimulación ambiental, lo que las hace estructuras importantes en la plasticidad sináptica. La trombospondina-1 (TSP-1), es una glicoproteína de matriz extracelular secretada por los astrocitos con actividad espinogénica y sinaptogénica, lo que sugiere su participación en procesos de plasticidad sináptica. Uno de los modelos más utilizados para estudiar la plasticidad dependiente de experiencia son los ambientes enriquecidos (AE). Los AE favorecen la formación de espinas dendríticas y sinapsis, mediante la estimulación sensorial, cognoscitiva y motora dependiente de experiencia. Sin embargo, los mecanismos celulares involucrados en este proceso aún se desconocen. Este trabajo tuvo como objetivo conocer si la expresión de TSP-1 cambia en ratones expuestos a AE y si ésta podría estar relacionada con la formación de espinas dendríticas. Los resultados muestran que en la corteza cerebral los niveles de TSP-1 incrementan después de que los ratones se expusieron a los AE, y que esto correlaciona con la formación de espinas dendríticas. Sin embargo, en el hipocampo los niveles de TSP-1 no muestran un incremento significativo en los ratones criados en AE, a pesar de que el número de espinas dendríticas sí aumenta. Estos resultados sugieren que la TSP-1 podría estar involucrada en la formación de espinas dendríticas y sinapsis relacionada con la plasticidad dependiente de experiencia en la corteza cerebral, pero no en el hipocampo.

Abreviaturas

AE	Ambientes Enriquecidos
ANE-	Ambiente No Enriquecido
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
LTD	Depresión a Largo Plazo
LTP	Potenciación a Largo Plazo
µm	Micrómetro
NT	Neurotrofina
PFA	Paraformaldehído
SEM	Error Estándar de la Media
SNC	Sistema Nervioso Central
TGF-β1	Factor de Crecimiento Transformante-β1
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral-α
TSP-1	Trombospondina-1

Introducción

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias que emergen de las dendritas de la neurona. Estas estructuras representan el principal sitio de contacto sináptico excitatorio (componente postsináptico) en el cerebro (Korobova y Svitkina, 2010). Las espinas muestran una morfología bien definida (cabeza, cuello y base unida a la dendrita) (Hotulainen y Hoogenraad, 2010) y se pueden distinguir tres formas principales: hongo, regordetas y delgadas (Harris y Kater, 1994). En su interior, las espinas dendríticas cuentan con organelos que ayudan a su funcionamiento autónomo como: citoesqueleto rico en actina, mitocondrias, ribosomas y aparato espinoso. Gracias a su morfología característica y maquinaria especializada, se considera a las espinas dendríticas como microambientes bioquímicos capaces de compartimentalizar la respuesta postsináptica y de incrementar la conectividad de los circuitos nerviosos (Yuste et al., 2000). La formación de espinas dendríticas es mayor durante el desarrollo postnatal temprano (Fischer et al., 1998); sin embargo, su aparición y cambios morfológicos y/o fisiológicos se conservan a lo largo de la vida (Hering y Sheng, 2001).

La trombospondina-1 (TSP-1), es una glicoproteína de matriz extracelular que se expresa en diversos tejidos (por ejemplo: cardíaco, endotelial y cartilaginosa) y que cuenta con diferentes dominios, lo que le da la posibilidad de participar en procesos celulares como la agregación plaquetaria, la migración y la apoptosis celular, entre otros (Chen et al., 2000). En los últimos años, se demostró que la TSP-1 es secretada por los astrocitos en el sistema nervioso central (SNC) y tiene

una fuerte actividad espinogénica y sinaptogénica (Christopherson et al., 2005; Risher y Eroglu, 2012).

La expresión de TSP-1 en etapas tempranas del desarrollo coincide con la formación de espinas dendríticas y sinapsis en el SNC (Christopherson et al., 2005). En tejido adulto se detecta en estructuras que pueden regenerarse, por ejemplo en el nervio óptico del tritón y del pez dorado (Hoffman et al., 1994); en ratones adultos se detecta en la formación hipocampal (Hoffman et al., 1994) y en la recuperación funcional después de un evento isquémico (Liauw et al., 2008). En este sentido, la actividad espinogénica y sinaptogénica de la TSP-1 sugiere su participación en procesos de plasticidad sináptica.

Los ambientes enriquecidos (AE), son una de las herramientas más utilizadas para estudiar procesos de plasticidad dependiente de experiencia. Los AE consisten en la transformación de las jaulas habitación de los roedores con el fin de facilitar y reforzar la estimulación motora, cognoscitiva y sensorial (Nithianantharajah y Hannan, 2006). La adaptación de las jaulas se realiza con la inclusión y cambio constante de objetos que varían en forma, color, textura y tamaño; además, se incluyen ruedas para correr. El cambio constante de los objetos, tanto de lugar como de textura, y la presencia de ruedas para correr, incrementa las posibilidades de estimular la formación de mapas espaciales, la actividad física y las interacciones sociales (Petrosini et al, 2009).

Estudios en roedores expuestos a AE encontraron que esta estimulación promueve cambios anatómicos y neurofisiológicos, principalmente la activación de factores de transcripción, el aumento en la complejidad de los árboles dendríticos y la formación de nuevas espinas dendríticas y sinapsis (Rosenzweig y Bennett,

1996; Rampon et al., 2000), sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a este proceso han recibido poca atención, por lo que este trabajo tuvo como objetivo establecer si la TSP-1 podría participar en la formación de espinas dendríticas que se observa en los ratones criados en AE. Además, un mejor entendimiento del funcionamiento de la TSP-1 en procesos de plasticidad ayudaría también a entender los mecanismos celulares implicados en la dinámica de las espinas dendríticas en condiciones fisiológicas normales o en patologías donde se observan alteraciones de las espinas dendríticas.

1. Espinas dendríticas

A finales del siglo XIX, en 1888, Santiago Ramón y Cajal descubrió a las espinas dendríticas utilizando la técnica de tinción de Golgi. Estas estructuras fueron ignoradas durante mucho tiempo por sus colegas contemporáneos, entre ellos el propio Golgi, ya que las consideraban precipitados de plata propios de la tinción (revisado en Yuste, 2002). No fue sino hasta 1896 que Santiago Ramón y Cajal demostró definitivamente la existencia de las espinas dendríticas gracias al azul de metileno (revisado en García-López et al., 2007), sentando las bases de numerosas investigaciones de la neurociencia moderna. Actualmente, las espinas dendríticas se definen como pequeñas protuberancias membranosas que emergen de las dendritas en las neuronas y se consideran el principal sitio de contacto sináptico excitatorio (componente postsináptico) en el cerebro (Korobova y Svitkina, 2010; Yuste, 2010).

1.1 Generalidades de las espinas dendríticas

Las espinas dendríticas cuentan con una morfología bien definida que está conformada por tres estructuras principales: base (unida a la dendrita), cuello (diámetro $<1 \mu\text{m}$) y cabeza (volumen aprox. $0.001- 1 \mu\text{m}^3$) (Nimchinsky et al., 2002; Hotulainen y Hoogenraad, 2010), en donde generalmente se forma el contacto con la presinapsis (Hering y Sheng, 2001) (**Figura 1**). Tomando en cuenta sus tres componentes principales, las espinas pueden llegar a medir hasta $3 \mu\text{m}$ de largo y su densidad varía de acuerdo al tipo celular, por ejemplo, en neuronas hipocampales se observan de 2- 4 espinas por micrómetro de longitud

dendrítica, mientras que en las células de Purkinje hay de 1-10 espinas por micrómetro (Sorra y Harris, 2000; Hering y Sheng, 2001). Además, en las células de Purkinje, el acomodo de las espinas alrededor de la dendrita no es lineal sino helicoidal (O'Brien y Unwin, 2006), lo que al parecer maximiza el espacio que ocupan las espinas y garantiza la formación de un gran número de sinapsis (García- López et al., 2010; Yuste, 2011).

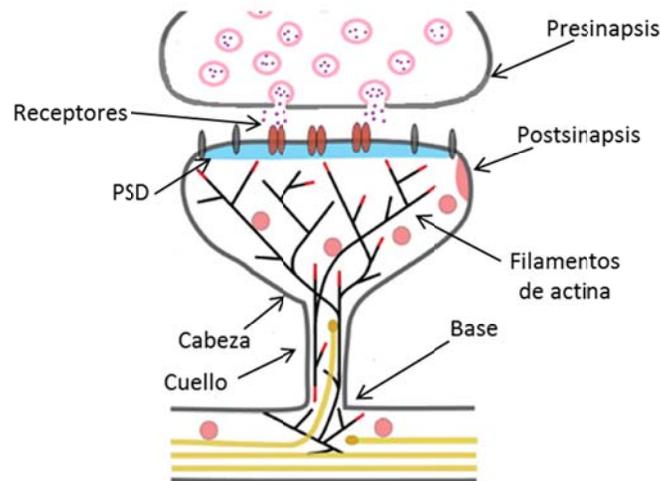


Figura 1. Morfología de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas están conformadas por tres estructuras principales: base (unida a la dendrita), cuello y cabeza. En la cabeza, generalmente, se forma el contacto sináptico. La imagen muestra algunos de los componentes celulares de la espina (Modificado de; Hotulainen y Hoogenraad, 2010).

De las dendritas de las neuronas emergen infinidad de espinas, cada una con una morfología diferente (**Figura 2**) (Harris y Kater, 1994). Sin embargo, se considera que las formas más comunes de estas estructuras son: forma de hongo, regordeta y delgada (**Figura 2**). Las espinas con forma de hongo tienen una cabeza bien definida, cuello y base con forma delta que las une a las dendritas (Korobova y

Svitkina, 2010); el tamaño de la cabeza se correlaciona con la actividad sináptica, por lo que ésta es considerada una morfología madura (Yuste, 2010). Las espinas regordetas tienen el mismo diámetro en toda su longitud por lo que parecen carecer de cuello, son abundantes en el desarrollo postnatal, aunque también pueden ser encontradas en etapas posteriores del desarrollo (Fiala et al., 2002). Las espinas delgadas tienen un cuello largo y delgado con una cabeza pequeña; este tipo de espinas cambian su morfología durante el desarrollo (Fiala et al., 2002) y son las que sufren un mayor decremento durante la vejez (Luebke et al., 2010). Espinas dendríticas con morfología diferente a las ya mencionadas también se han descrito, por ejemplo: espinas ramificadas, que cuentan con varias cabezas que emergen de un punto en común (Sorra y Harris, 2000), y filopodios, estructuras que también emergen de las dendritas y son considerados los precursores de las espinas dendríticas maduras (Yoshihara et al., 2009) (**Figura 2**).

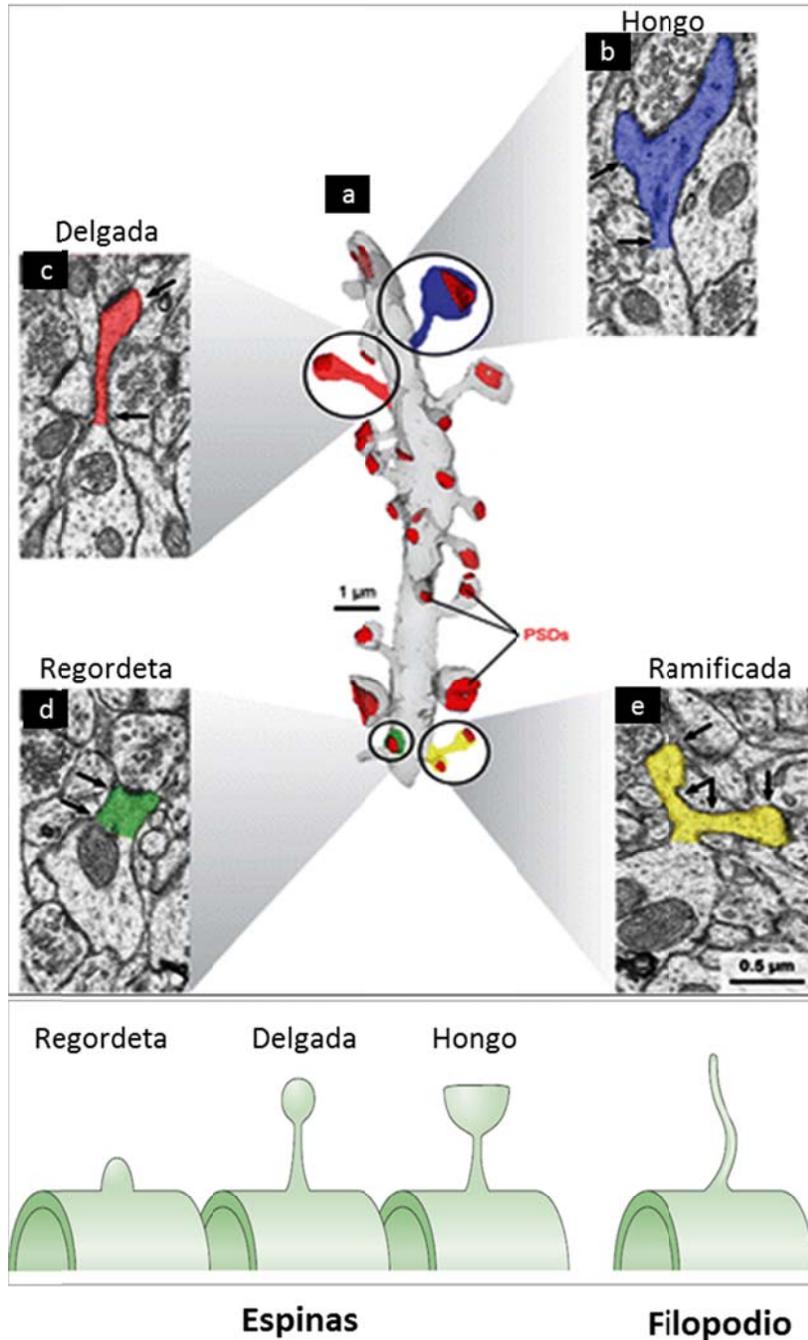


Figura 2. Distribución de las espinas en la dendrita. Panel superior. La imagen muestra la distribución variada de las espinas en la dendrita, así como su morfología y su ultraestructura. (PSD y mitocondrias). a) Segmento de dendrita con diferentes tipos de espina (flechas): hongo (b), delgada (c), regordeta (d) y ramificada (e). **Tipos de espinas dendríticas. Panel inferior.** Representación gráfica de los diferentes tipos de espinas y los filopodios (Modificado de Yuste y Bonhoeffer, 2004; Bourne y Harris, 2008).

1.2 Función y ultraestructura de las espinas dendríticas

Las espinas dendríticas cuentan con organelos que las convierten en estructuras altamente especializadas. Se considera que pueden formar microambientes bioquímicos capaces de recibir información de otras neuronas y compartimentalizar la respuesta postsináptica (Yuste et al., 2000; O'Brien y Unwin, 2006). Además, se les atribuyen otras funciones como la generación de potenciales postsinápticos excitatorios locales rápidos, plasticidad sináptica (Lamprecht y LeDoux, 2004), incremento de la conectividad de un circuito bien distribuido (Yuste, 2011) y compartimentalización de calcio (Yuste et al., 2000).

Entre los organelos que conforman a las espinas dendríticas, se encuentra su citoesqueleto rico en filamentos de actina (Korobova y Svitkina, 2010). Los filamentos de actina son capaces de elongarse, ramificarse o acortarse según la actividad sináptica de las espinas (**Figura 1**).

Justo por debajo de la membrana postsináptica y en oposición a la presinapsis, se localiza un área electrodensa llamada densidad postsináptica (PSD, por sus siglas en inglés) (**Figura 1**) (Bourne y Harris, 2008). La densidad postsináptica es un componente estructural donde se concentran receptores glutamatérgicos (AMPA, kainato, NMDA y metabotrópicos), moléculas de adhesión celular, canales, proteínas de andamiaje (principalmente la PSD-95) (Kim y Sheng, 2004) e infinidad de proteínas involucradas en sistemas de señalización que ligan la actividad sináptica con la actividad bioquímica en la postsinapsis (Nimchinsky et al., 2002; Kim y Sheng, 2004) y que podrían estar involucrados en la plasticidad sináptica.

Además de la densidad postsináptica y los filamentos de actina en las espinas dendríticas, existen otros organelos asociados que hacen posible la actividad bioquímica dentro de estas pequeñas estructuras. Por ejemplo: mitocondrias, polirribosomas y el aparato espinoso (**Figura 2**). En general, las mitocondrias se localizan en los árboles dendríticos cerca de las espinas (Nimchinsky et al., 2002), el ATP que se produce por estos organelos difunde hacia la espina y se utiliza para la actividad sináptica. En neuronas hipocampales las mitocondrias son capaces de emigrar hacia la espina dendrítica cuando la actividad sináptica así lo demanda (Sorra y Harris, 2000; Bourne y Harris, 2008). Por otra parte, al igual que las mitocondrias, los polirribosomas se encuentran cercanos a las espinas en la dendrita, sin embargo, es más común encontrarlos dentro de éstas. La presencia de polirribosomas es indicador de la síntesis local de proteínas, lo que refuerza la concepción de las espinas como componentes autónomos (Harris y Kater, 1994). Otro organelo que se relaciona con la actividad sináptica de las espinas es el llamado aparato espinoso. El aparato espinoso es una continuación del retículo endoplásmico liso que invade a la espina dendrítica (principalmente espinas maduras con forma de hongo) y que llega a alcanzar la densidad postsináptica (Segal et al., 2010). Este organelo actúa como un reservorio de calcio, capaz de captarlo o liberarlo mediante la estimulación de segundos mensajeros o del propio calcio, aumentando así la fuerza sináptica (Yuste et al., 2000; Tashiro y Yuste, 2003).

1.3 Espinogénesis

La generación y estabilización de espinas dendríticas y sinapsis son procesos que están íntimamente relacionados. Al parecer los mecanismos de la espinogénesis cambian dependiendo de la estructura cerebral (Yuste y Bonhoeffer, 2004), por ejemplo: en la neocorteza, durante el desarrollo postnatal temprano, aparecen en abundancia a lo largo de las dendritas estructuras extremadamente móviles, largas y delgadas carentes de cabeza llamadas: filopodios (Portera-Cailliau et al., 2003; Zuo et al., 2005; Yoshihara et al, 2009) (**Figura 2**). Los filopodios se identifican como los precursores de las espinas dendríticas maduras, se elongan desde la dendrita explorando el espacio que los rodea y buscan con quién establecer un contacto funcional (Yoshihara et al, 2009). Una vez que se establece el contacto con algún axón, el filopodio se transforma para dar lugar a una espina dendrítica funcional (Fiala et al., 1998). Sin embargo, no todas las espinas se estabilizan, lo que al parecer es un proceso dependiente de la actividad sináptica (Okamoto et al., 2004; Ehrlich et al., 2007). Las espinas dendríticas recién formadas generalmente son delgadas, largas y con cabezas pequeñas, lo que más tarde cambia para dar paso a morfologías maduras, por ejemplo: las espinas con forma de hongo (Fiala et al., 2002).

En neuronas piramidales de la neocorteza y el hipocampo se observa que la espinogénesis y la sinaptogénesis también están mediadas por la participación activa de los botones presinápticos. Al principio del desarrollo postnatal predominan las sinapsis sobre las ramificaciones dendríticas (Yuste y Bonhoeffer, 2004), por lo que se propone que a partir del contacto sináptico con la membrana

dendrítica se induce la emersión de las espinas dendríticas (Miller y Peters, 1981; Ziv y Smith, 1996).

Por otra parte, las espinas dendríticas que se generan en las células de Purkinje del cerebelo, no necesitan ser contactadas previamente por la presinapsis (Sotelo, 1990), pero su formación y densidad en las dendritas proximales sí depende de la actividad neuronal (García- López et al., 2010).

Existen algunas moléculas que también participan en la espinogénesis y la sinaptogénesis, por ejemplo: neuroesteroides, sintetizados de novo a partir del colesterol, como el estradiol y la progesterona (Sasahara et al., 2007), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Sakamoto et al., 2003; Sasahara et al., 2007; Tyler y Pozzo-Miller, 2003), y óxido nítrico (Nikonenko et al., 2008, 2013). Adicionalmente, la formación de espinas dendríticas podría estar asociada con la interacción de células astrogliales a través del contacto físico entre la neurona y el astrocito (Haber et al., 2006; Nishida y Okabe, 2007). Recientemente, se demostró que moléculas secretadas por los astrocitos como las trombospondinas (TSPs) (Christopherson et al., 2005; García et al., 2010), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , por sus siglas en inglés) (Stellwagen y Malenka, 2006) y el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1, por sus siglas en inglés) (Clarke y Barres, 2013), pueden tener actividad espinogénica y sinaptogénica. En conjunto, estos datos sugieren que tanto el contacto físico entre células nerviosas como la presencia de moléculas solubles son importantes para la generación de espinas dendríticas y sinapsis.

1.4 Espinas dendríticas, estructuras plásticas

A lo largo de la vida las espinas dendríticas sufren cambios en su morfología y número. En el desarrollo postnatal temprano el número de espinas dendríticas y sinapsis es abundante; sin embargo, conforme el desarrollo avanza, desaparecen aquellas sinapsis que no se fortalecen mediante su actividad, influida por la estimulación ambiental y la experiencia (Fischer et al., 1998; Brünig et al., 2004; Levenga y Willemsen, 2012). En la edad adulta, las espinas dendríticas son capaces de responder con cambios morfológicos y/o fisiológicos a la estimulación eléctrica, la experiencia, el aprendizaje y la actividad conductual (Hering y Sheng, 2001; Lamprecht y LeDoux, 2004; von Bohlen und Halbach, 2009).

Fenómenos como la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés), que se refiere al incremento en la amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos inducidos por la estimulación eléctrica de alta frecuencia (Lamprecht y LeDoux, 2004), producen aumento en la densidad de espinas dendríticas, así como el ensanchamiento de la cabeza y acortamiento de cuello de las espinas, y la inclusión de receptores glutamatérgicos (Matsuzaki et al., 2001; Yuste y Bonhoeffer, 2001; Park et al., 2006; Wosiski-Khun y Stranahan, 2012). Cambios duraderos en las espinas correlacionan con fenómenos como la memoria a largo plazo (Lamprecht y LeDoux, 2004); particularmente, se considera a las espinas con forma de hongo, como espinas asociadas a procesos de memoria, mientras que a las espinas delgadas se les considera espinas de aprendizaje (Kasai et al., 2003; Yang et al., 2009). Por el contrario, fenómenos como la depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés), dan como resultado

endocitosis de receptores glutamatérgicos, el adelgazamiento de las espinas dendríticas, e incluso su desaparición (Beattie et al., 2000; Bastrikova et al., 2008). Además, existen cambios en la morfología y densidad de las espinas provocados por la actividad conductual. Por ejemplo, el entrenamiento de ratas en laberinto de Morris provoca un aumento en la densidad de espinas dendríticas en las dendritas basales del área CA1 del hipocampo (Moser et al., 1994). La estimulación cognoscitiva y sensorial, mediante ambientes enriquecidos, también incrementa el número de espinas y sinapsis en la corteza (Jones et al., 1997; Holtmaat et al., 2008; Landers et al., 2011); además, estudios *in vivo*, realizados en roedores, demostraron la formación y eliminación de espinas aún en etapas adultas, gracias a la actividad conductual (Trachtenberg et al., 2002; Yang et al., 2009). Estos datos en su conjunto demuestran un papel fundamental de las espinas dendríticas en procesos de plasticidad cerebral.

2. Trombospondina-1

2.1 Generalidades de la Trombospondina-1

La Trombospondina-1 (TSP-1), es una glicoproteína de unión a calcio, secretada por los gránulos alfa de las plaquetas y que ayuda a la agregación de éstas (Adams y Lawler, 2004). Se expresa en tejido cardíaco (Corless et al., 1992), cartilaginoso (Lawler, 2000), endotelial (Iruela-Arispe et al., 1993) y nervioso (Asch et al., 1986). La TSP-1, forma parte de la matriz extracelular y participa en procesos celulares como migración, apoptosis, inflamación, cicatrización y angiogénesis (Chen et al., 2000).

En el SNC, durante el desarrollo embrionario, la TSP-1 se detecta a partir de la semana 14 de gestación (Anlar et al., 2002), lo que promueve el crecimiento de neuritas y tractos neuronales en el cuerpo calloso (Chamak et al., 1995). En el desarrollo postnatal temprano (primeras tres semanas), la TSP-1 es sintetizada y secretada por los astrocitos (Asch et al., 1986; Christopherson et al., 2005; Risher y Eroglu, 2012), lo que coincide con el periodo de formación de espinas dendríticas y sinapsis. En etapas adultas, en organismos como el pez dorado, rana y tritón, la TSP-1 se expresa en tractos nerviosos que se pueden regenerar, como el nervio óptico (Hoffman et al., 1994; Hoffman y O'Shea, 1999), mientras que en ratones adultos la TSP-1 se puede detectar en zonas como el hipocampo, bulbos olfatorios y cerebelo (Hoffman et al., 1994) (**Figura 3**).

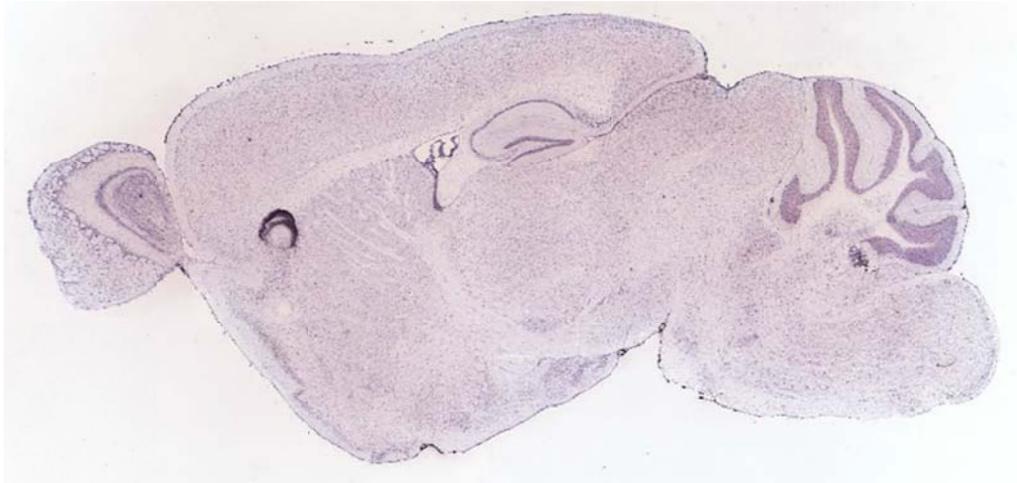


Figura 3. Expresión de TSP-1 en el cerebro de ratón adulto. Las zonas con mayor expresión de TSP-1 en el cerebro de ratón adulto son: bulbo olfatorio, hipocampo y cerebelo (Imagen tomada de: Allen Brain Atlas, 2013).

La TSP-1 pertenece a la familia de las trombospondinas (TSPs) que está conformada por 5 clases, cada una de ellas expresadas por diferentes genes (Lawler, 2000). De acuerdo a su estado de oligomerización y la estructura de sus dominios, las TSPs se dividen en: subgrupo A y subgrupo B (Lawler, 2000). La TSP-1, pertenece al subgrupo A por ser homotrimérica, al igual que la TSP-2; las TSP-3, TSP-4 y TSP-5 pertenecen al subgrupo B por ser homopentaméricas (Adams y Lawler, 2004).

Cada subunidad que conforma al trímero de la TSP-1, está compuesta por diferentes dominios (Iruela- Arispe et al., 1993; Adams, 1997) (**Figura 4**):

1. Dominios globulares: amino y carboxilo terminales.
2. Tres tipos de secuencias motivo repetidas:
 - a) Repeticiones Tipo I o dominios properdina.
 - b) Repeticiones Tipo II o tipo factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés)
 - c) Repeticiones Tipo III o repeticiones de unión a calcio.

3. Dominio procolágeno

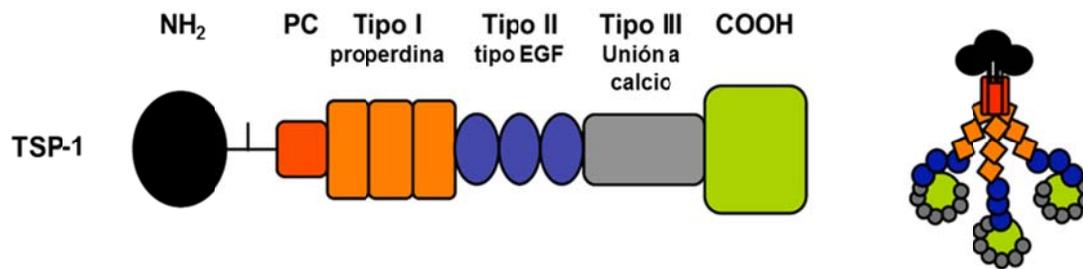


Figura 4. Trombospondina-1. Representación gráfica de los dominios funcionales de la TSP-1 y su forma trimérica (Modificado de Eroglu et al., 2009).

La diversidad de dominios en las subunidades de la TSP-1, le permite interactuar con gran variedad de receptores (Risher y Eroglu, 2012) y participar en procesos biológicos diversos. Por ejemplo, el dominio carboxilo terminal interactúa con el receptor CD47, que se involucra con el desarrollo de neuritas (Miyashita et al., 2004), el dominio tipo I (properdina) interactúa con el receptor CD36, que participa en la activación microglial (Asch et al., 1992), y el dominio tipo II (tipo EGF) interactúa con el receptor alfa-2-delta-1 (receptor a gabapentina), que se involucra con la formación de sinapsis (Eroglu et al., 2009).

2.2 Función espinogénica y sinaptogénica de la Trombospondina-1

Diversos estudios demuestran que la TSP-1 estimula el crecimiento de neuritas (Osterhout et al., 1992) y la formación de espinas dendríticas y sinapsis (Christopherson et al., 2005; García et al., 2010; Xu et al., 2010).

La actividad sinaptogénica y espinogénica de la TSP-1 se identificó mediante cultivos celulares en los que la adición de medio condicionado de astrocitos

incrementaba considerablemente el número de sinapsis (Christopherson et al., 2005). Posteriormente se observó que este efecto era dependiente de TSPs (Christopherson et al., 2005; Eroglu et al., 2009; Xu et al., 2010) e influía en la densidad y morfología de las espinas dendríticas (García et al., 2010). Además, en tejido nervioso perteneciente a ratones knock out en TSP-1/TSP-2, el número de sinapsis es menor comparado con las encontradas en tejido normal (Christopherson et al., 2005; Eroglu et al., 2009).

Las sinapsis que se forman gracias a la TSP-1 tienen ultraestructura normal en la pre y postsinapsis (Barres, 2008), sin embargo, son postsinápticamente silentes (Stevens, 2008). Al parecer, la TSP-1 induce la reorganización del citoesqueleto provocando cambios en la morfología de las espinas y mantiene alineadas a la pre y postsinápsis durante la sinaptogénesis (Liauw et al., 2008), mientras que otros factores son los que inducen la actividad funcional de la sinapsis. En el hipocampo, la TSP-1 acelera la formación de sinapsis, aunque no influye en la densidad final de éstas (Xu et al., 2010). Se identificó al dominio tipo EGF (repetición Tipo II) de la TSP-1 como el responsable de inducir la actividad sinaptogénica mediante la activación del receptor a gabapentina alfa-2-delta-1 (Eroglu et al., 2009). Esta activación provoca señalización inter e intra celular y el reclutamiento de proteínas sinápticas (Ehlers, 2005; Eroglu et al., 2009).

Por otra parte, la TSP-1 también participa en procesos plásticos adaptativos en la presinapsis, por ejemplo: el silenciamiento (Crawford et al., 2012). El silenciamiento de las presinapsis excitatorias, consiste en el decremento de las terminales presinápticas que secretan neurotransmisor y previene la excitotoxicidad en el hipocampo (Crawford et al., 2012). El fármaco gabapentina,

previene la interacción de la TSP-1 con el receptor alfa-2-delta-1, inhibiendo el desarrollo del silenciamiento (Crawford et al., 2012).

A pesar de que el pico de expresión más alto de la TSP-1 es en los primeros estadios del desarrollo, existen evidencias de que ésta podría participar en eventos que ocurren en etapas del desarrollo posteriores (Cáceres et al., 2007).

En ratones adultos sometidos a un evento isquémico se observa un incremento en la expresión de TSP-1 que correlaciona con la formación de sinapsis en la zona afectada y la recuperación funcional (Liauw et al., 2008). El efecto espinogénico y sinaptogénico de la TSP-1 en etapas tempranas y el aumento de su expresión por el requerimiento de formación de nuevas sinapsis aún en etapas posteriores, hace posible la participación de la TSP-1 en la reorganización de los circuitos neuronales debida a la plasticidad sináptica dependiente de experiencia.

3. Ambientes enriquecidos

3.1 Generalidades de los ambientes enriquecidos

A mediados siglo pasado, Donald O. Hebb reportó que ratas criadas como mascotas en casa, tenían un mejor desempeño conductual que ratas criadas en condiciones estándar de laboratorio (revisado en van Praag et al., 2000). Posteriormente, en los años sesenta, Rosenzweig et al. (1962), fueron los primeros en demostrar experimentalmente que cambios en las jaulas de las ratas (con juguetes de madera y laberintos), resultaban en cambios neuroquímicos y anatómicos en el cerebro. Hoy en día la importancia de la influencia de la experiencia y la estimulación ambiental sobre la estructura cerebral se sigue estudiando mediante el uso de ambientes enriquecidos (AE).

Los AE consisten en exponer a los animales de laboratorio a condiciones que faciliten y refuercen la estimulación motora, cognoscitiva y sensorial (Nithianantharajah y Hannan, 2006). Un AE incluye objetos que varían en su composición, forma, tamaño, textura y color, y que se sustituyen en repetidas ocasiones, lo que permite que haya un rango amplio de posibilidades para incrementar la estimulación cognoscitiva, la formación de mapas espaciales y la habilidad para detectar novedades; entrenamiento físico, representado por movimientos exploratorios y actividad motora general con el uso de las ruedas para correr; interacciones sociales, una buena alimentación y cuidados para la salud (Olsson y Dahlborn, 2002; Petrosini et al, 2009) **(Figura 5)**.



Figura 5. Ambientes Enriquecidos (AE). Los AE facilitan la estimulación somatosensorial, motora y cognoscitiva mediante objetos novedosos y la complejidad del espacio.

El modelo de AE muestra la existencia de la plasticidad cerebral dependiente de experiencia, por lo que es sustento científico y experimental de programas de estimulación o intervención temprana (Bryck y Fisher, 2012), gimnasia cerebral (DeFelipe, 2006) e integración sensorial (Reynolds et al., 2010). En humanos, los programas de intervención temprana y enriquecimiento ambiental (que incluyen servicios de salud, nutrición, educación, ejercicio físico y tutorías familiares) muestran efectos positivos sobre las habilidades visuales, verbales lógicas y motoras de los infantes (Ramey y Ramey, 1998; Raine et al., 2001). Además, los programas de intervención temprana, previenen o mejoran las deficiencias

motoras y cognitivas en niños prematuros o de bajo peso al nacer (Blauw-Hospers et al., 2007), con síndrome de Down (Irwin, 1989) o con parálisis cerebral (Palmer et al., 1990).

3.2 Efectos de los ambientes enriquecidos en el cerebro

Los primeros reportes sobre los efectos de los AE en el cerebro hicieron hincapié en el aumento del peso total del cerebro y el engrosamiento de la corteza (principalmente visual y somatosensorial) y el hipocampo de los roedores (Krech et al., 1966; Walsh et al., 1969; Rosenzweig y Bennett, 1996).

Estudios más minuciosos, comprobaron que el engrosamiento de la corteza se debía al aumento de la complejidad de los árboles dendríticos de neuronas piramidales de diferentes cortezas (Greenough et al., 1973). Los AE promueven el aumento de ramas dendríticas basales, sobre todo de dendritas de orden superior (más alejadas del soma), y el aumento en el diámetro de éstas (Greenough y Volkmar, 1973; Rasin et al., 2011).

Los AE no sólo afectan a la morfología de las neuronas, sino que influyen en la formación de nuevas espinas dendríticas y sinapsis.

La formación y aumento en el número de sinapsis en organismos expuestos a AE se comprobó, por primera vez, gracias a la microscopía electrónica (Turner y Greenough, 1985). La presencia de botones multisinápticos que hacen contacto simultáneo con espinas y/o dendritas (Jones et al, 1997), sugiere un incremento tanto de sinapsis excitatorias como de sinapsis inhibitorias (Landers et al., 2011).

El incremento de sinapsis, causado por la exposición a AE, se detecta mediante la presencia de proteínas sinápticas como la sinaptofisina y la PSD-95 (ubicadas en

la pre y postsinapsis, respectivamente) en la corteza y el hipocampo, pero no en el cerebelo (Nithianantharajah et al, 2004; Kozorovitskiy et al., 2005).

Por otra parte, gracias a diferentes técnicas, entre ellas la tinción de Golgi, se sabe que después de exponer a roedores a AE, el número de espinas dendríticas y su densidad aumentan considerablemente en comparación a las espinas presentes en roedores criados en condiciones estándar de laboratorio (Kolb et al., 2003; Rasin et al., 2011). El aumento de espinas dendríticas no sólo puede ser observado en la corteza cerebral, sino en zonas importantes como el hipocampo, sobre todo en la región CA1 (Moser et al., 1994). Además, Sutherland et al. (2010), observaron que el hipocampo es importante para inducir cambios en la arborización dendrítica y el número de espinas en la corteza. En primates, también se observan cambios tanto en la arborización dendrítica como en las espinas dendríticas del hipocampo y la corteza prefrontal, por la exposición a AE (Kozorovitskiy et al., 2005).

Por otra parte, en el núcleo accumbens también aumentan las espinas dendríticas gracias a los AE (Kolb et al., 2003), mientras que en el núcleo estriado aumenta la presencia de espinas dendríticas ramificadas, lo que podría indicar el remodelamiento de las conexiones sinápticas (Comery et al., 1996).

Estudios *in vivo* demuestran que la dinámica de las espinas, es decir, su formación y eliminación, también aumenta en ratones expuestos a los AE (Trachtenberg et al., 2002; Jung y Herms, 2012). La persistencia de espinas dendríticas recién emergidas conlleva a la formación de nuevas sinapsis (Trachtenberg et al., 2002; Holmaat et al., 2008). Sin embargo, los mecanismos celulares involucrados en estos procesos no se conocen totalmente. Algunos trabajos sugieren que cambios

en la plasticidad hipocampal y el desarrollo acelerado de las neuronas en el giro dentado, debidos a los AE, se relacionan con la expresión de genes implicados en la estructura neuronal, señalización sináptica, metilación de ADN, activación de CREB (Petrosini et al, 2009; Rampon et al., 2000) y el incremento en la expresión de receptores y factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Liu et al., 2012). Además, tanto en el hipocampo como en la corteza, la expresión de neurotransmisores como la dopamina, acetilcolina, serotonina y glutamato, así como la presencia de sus receptores aumentan por los AE (Mora et al., 2007; Simpson y Kelly, 2011).

Los AE tienen efectos benéficos en modelos de enfermedades del neurodesarrollo como el autismo, síndrome de Down, síndrome del X frágil (Reynolds et al., 2010; Begenisic et al., 2011), y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la corea de Huntington y el mal de Parkinson (Laviola et al., 2008). Además, roedores expuestos previamente a los AE muestran una mejor ejecución de tareas conductuales como el laberinto de agua de Morris, campo abierto, laberinto elevado en cruz y exploración de un contexto novedoso (D'Hooge y De Deyn, 2001; Amaral et al, 2008; Ilin y Richter-Levin, 2009), sugiriendo un papel importante de los AE en la plasticidad cerebral. Sin embargo, los mecanismos implicados en la formación de espinas dendríticas y sinapsis dependientes de los AE no se conocen en su totalidad, por lo que esta tesis tuvo como objetivo estudiar si los niveles de TSP-1 cambian en ratones expuestos a AE y si éste cambio podría estar relacionado con la formación de espinas dendríticas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Conocer si la TSP-1 está implicada en la formación de espinas dendríticas en un modelo de plasticidad dependiente de experiencia.

4.2 Objetivos específicos

Determinar si existe un cambio en los niveles de TSP-1 en la corteza y el hipocampo de ratones C57BL/6J expuestos a ambientes enriquecidos.

Evaluar si niveles de TSP-1 correlacionan con un incremento en el número de espinas dendríticas después de la exposición a ambientes enriquecidos.

5. Hipótesis

El incremento en el número de espinas dendríticas que se observa en cerebros de ratones expuestos a ambientes enriquecidos está asociado a un aumento en la expresión de la TSP-1.

6. Métodos y materiales

6.1 Sujetos

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6J procedentes de la Facultad de Psicología, UNAM. Los ratones se destetaron a los 21 días de edad y se distribuyeron en dos diferentes grupos: experimental, expuestos a ambientes enriquecidos (AE); y control, mantenidos en ambientes no enriquecidos (ANE) o condiciones estándar de laboratorio. A partir del día 28 de edad los ratones se

criaron durante 5 semanas en cualquiera de las dos condiciones. Cada condición se realizó por triplicado.

Todos los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, en un ciclo luz-obscuridad 12:12 hrs y temperatura ambiental de 20 °C ± 1 °C. La manipulación y cuidado de los ratones siguieron las reglas establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-200-1999.

6.2 Procedimiento general

6.2.1 Ambientes enriquecidos

Ratones criados en ANE, se colocaron por pareja en jaulas estándar de laboratorio con las siguientes medidas: 28x16x13cm (**Figura 6A**), mientras que los ratones expuestos a AE se criaron en jaulas de acrílico con las siguientes medidas: 55x25x15cm (**Figura 6B**), en cada AE habitaban 4 ratones. Las jaulas utilizadas para los AE se equiparon con una rueda para correr, juguetes (cubos de madera, pelotas, resbaladilla, etc., de diferentes texturas y colores) y una manguera de plástico flexible que simuló un túnel. La organización espacial en el interior de la jaula se modificó tres veces por semana a través del intercambio de objetos, el cambio de posición de los túneles y la rueda para correr, y la creación de nuevas estructuras con los objetos presentes en la jaula. Con la misma frecuencia, los bebederos y la comida cambiaron de posición dentro de la jaula de AE, y se realizó la limpieza completa de la jaula, por lo que los ratones eran trasladados a una jaula de acrílico diferente en la que siempre estuvo presente la rueda para correr. Su estancia en esta jaula no fue mayor a 15 minutos en cada ocasión. Este modelo de AE se validó previamente (Sztainberg y Chen, 2010).

Una vez completadas las 5 semanas de AE todos los ratones (incluyendo a los control), se sacrificaron y sus cerebros procesados para tinción de Golgi, inmunohistofluorescencia e inmunoensayo de ELISA.



Fig. 6. Condición control y experimental. A) Jaula control (ANE) de 28x16x13 cm. **B)** Jaula experimental (AE) de 55x25x15 cm.

6.2.2 Tinción de Golgi

La tinción de Golgi es una técnica histológica, basada en la impregnación argéntica, que tiñe preferentemente y de forma aleatoria a las neuronas en el SNC. La sedimentación de las sales de plata utilizadas en esta técnica, permiten identificar la morfología de la superficie neuronal, haciendo visibles a las espinas dendríticas.

Para realizar la tinción de Golgi los cerebros de los ratones expuestos a AE (n= 4) y ANE (n= 4) se fijaron mediante una perfusión transcardial, dejando fluir libremente solución salina al 0.9% (pH= 7.4) seguida por paraformaldehído al 4% (pH= 7.4) (PFA, Sigma Aldrich, Cat. 158127). Posteriormente, los cerebros se extrajeron y se mantuvieron durante dos horas en PFA, para asegurar su fijación (Avila-Costa et al., 2006).

Pasadas las dos horas se retiraron los bulbos olfatorios y el cerebelo de cada cerebro. Bloques de 3-4 mm se fijaron en solución de Golgi conformada por: dicromato de potasio al 3% (Electron Microscopy Sciences, Cat. 20100) y tetraóxido de osmio al 0.3% (Electron Microscopy Sciences, Cat. 19100), en la que permanecieron durante 7 días a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Posteriormente, los bloques de cerebro se sumergieron en solución de nitrato de plata al 0.75% (Electron Microscopy Sciences, Cat. 21050) para su impregnación durante 24 hrs.

Por último, el tejido se cortó (90 μ m), deshidrató con alcohol absoluto (J. T. Baker, Cat. 19-900-03), aclaró con esencia de clavo y xilol (Electron Microscopy Sciences, Cat. 23400), se montó en portaobjetos y cubrió con Entellan (Merck Millipore, Cat. 1079610100). Una vez montado, el tejido se secó a temperatura ambiente durante 5 días para su análisis posterior.

6.2.3 Análisis de espinas dendríticas

El análisis cuantitativo de las espinas dendríticas se realizó mediante imágenes capturadas por una cámara digital (Euromex-Holland) y un microscopio óptico (US

MICRO IV). Las imágenes capturadas se analizaron en el programa ImageFocus v3.0 (Euromex Microscopes).

La cuantificación de espinas dendríticas se realizó en dendritas apicales secundarias de neuronas piramidales de la corteza (n= 216) y dendritas secundarias de neuronas piramidales y granulares del hipocampo (n= 60). Para el análisis, sólo se utilizaron las neuronas que mostraron impregnación completa del soma y sus dendritas, con separación suficiente de otras células teñidas y sin daños aparentes en las dendritas. El número de espinas se cuantificó en segmentos de 10 μm de longitud ubicados a 10 μm de distancia de la bifurcación de la dendrita primaria. Los resultados se expresaron como el número de espinas por 10 μm .

6.2.4 Inmunohistofluorescencia

La inmunohistofluorescencia es un procedimiento especializado que consiste en una reacción antígeno-anticuerpo hecha visible por la incorporación de un colorante fluorescente unido covalentemente al anticuerpo. Una vez hecha la reacción, se expone a la luz ultravioleta emitida por el microscopio para ser evidenciado por el fenómeno de fluorescencia.

Para realizar la inmunohistofluorescencia se realizó una perfusión con solución salina al 0.9% (pH= 7.4), y posteriormente con PFA al 4% (pH= 7.4) (Sigma Aldrich, Cat. 158127) para fijar los cerebros.

Rebanadas de 40 μm se permeabilizaron por 1 hora con PBS-tritón X-100 al 0.2% (Sigma Aldrich, Cat. X100) y bloqueados con PBS-albúmina bovina al 5% (Sigma Aldrich, Cat. A2153) por 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios

TSP-1 (1:250, Santa Cruz Biotechnology, Cat. 59887) y GFAP (1:1000, Sigma Aldrich, Cat. G4546), se incubaron por 24 horas a 4 °C, seguidos por la incubación de un anticuerpo fluorescente secundario (Alexa Fluor 488 y 594, Invitrogen, Cat. A11008 y 1005) durante 2 horas.

Se utilizó un microscopio invertido con epifluorescencia para la captura de imágenes. Las imágenes se capturaron en una cámara digital y procesadas con el programa Axio Vision (Zeiss).

La especificidad de la inmunorreacción se controló por la omisión del anticuerpo primario que resultó de la completa eliminación de las señales de fluorescencia.

6.2.5 Determinación de Trombospondina-1. Ensayo por Inmunoabsorción

Ligado a Enzima (ELISA)

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente), la reacción antígeno-anticuerpo queda inmovilizada y, por tanto, es fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

La enzima se une covalentemente a un anticuerpo específico que reconoce a un antígeno diana. Si el antígeno está presente, el complejo enzima-anticuerpo se unirá a él, y el componente enzimático del complejo enzima-anticuerpo catalizará

la reacción que generará el producto coloreado (**Figura 7**). Así, la presencia del producto coloreado indica la presencia del antígeno. La formación del producto (monitoreado como la intensidad del color) es proporcional a la concentración de la proteína de interés.

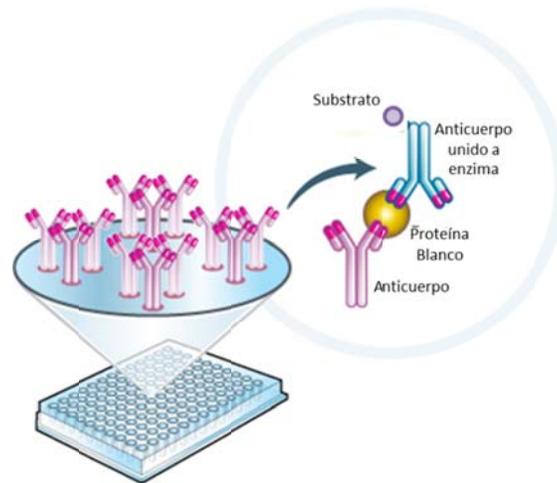


Fig. 7. Inmunoensayo de ELISA. Representación gráfica del uso de anticuerpos en el inmunoensayo de ELISA (Modificado de MitoSciences, 2014).

En este trabajo, los niveles de TSP-1 se determinaron de homogenizados de corteza e hipocampo de ratones expuestos a AE (n= 6) y ANE (n= 6). Las cortezas y los hipocampos disectados se homogenizaron en un buffer RIPA compuesto por: Tris-HCl (50mM) (J. T. Baker, Cat. 410301), NaCl (150mM) (Mallinckrodt, Cat. 7581), Tritón X-100 (1%) (Sigma Aldrich, Cat. X-100), Desoxicolato de sodio (0.5%) (Sigma Aldrich, Cat.D6750), Dodecil Sulfato de Sodio (0.1%) (J. T. Baker, Cat. L050-07) e inhibidores de proteasas (Complete Mini (Protease inhibitor cocktail) EDTA-free, Roche, Cat. 11836170001). El homogenizado se centrifugó a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C para separar la fracción soluble. Los niveles de

TSP-1 se determinaron inmediatamente por un inmunoensayo de ELISA (R&D system, Cat. DTSP10-KIT), siguiendo las instrucciones del proveedor y se midieron en un lector de microplatos iMark (BioRad).

Los niveles de TSP-1 se obtuvieron a partir de una curva estándar de concentraciones conocidas de TSP-1 y los resultados se expresaron como ng/ml (García et al., 2010).

6.2.6 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en este estudio se analizaron mediante la prueba *t* de Student para muestras independientes con una $p \leq 0.05$. Para ello, se confirmó que los datos tuvieran una distribución semejante a la normal mediante las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Los estadísticos descriptivos se muestran como la media \pm error estándar (SEM).

7. Resultados

7.1 Ambientes enriquecidos

Los AE se acondicionaron en cajas de acrílico que contenían objetos con diferentes texturas y formas, así como una rueda para correr. Diversos cambios en la conformación espacial se realizaron tres veces por semana, en el mismo horario, junto con la construcción de nuevas estructuras con los objetos. Estos cambios estimularon en los ratones la exploración espacial de sus cajas habitación y el reconocimiento de los objetos presentes.

Cada vez que se introdujeron objetos nuevos a su espacio, los ratones recorrían y exploraban toda la jaula, a diferencia de los ratones control, que siempre se mostraron más pasivos. Además, de forma interesante, se observó que cada vez que se realizaban los cambios en los AE, la actividad de los ratones en la rueda para correr también incrementaba (**Figura 8**). Por otra parte, a lo largo del día, los ratones en AE se mostraban más activos incrementando su conducta exploratoria y movimientos motores.

Adicionalmente, se realizaron cambios en la localización de alimento y agua dentro de la caja. El alimento se colocó en zonas en las que los ratones tenían acceso sólo si se manipulaban los objetos o se pasaba por los túneles (simulados con tubos de plástico flexibles). La exploración constante de los ratones provocó, por lo tanto, cambios adicionales en su entorno.

Los ratones de todos los grupos mostraron comportamiento afiliativo entre ellos. No se observó alguna evidencia de pelea entre los ratones que compartían jaula.



Fig. 8. Actividad en los ambientes enriquecidos. A) Ratones explorando el nuevo espacio conformado por cambios en los objetos. **B)** Ratones en ambientes enriquecidos antes de realizar cambios en las cajas.

7.2 Los ambientes enriquecidos favorecen la formación de espinas

dendríticas en ratones C57BL/6J

Después de que los ratones fueran expuestos a los AE, se realizó una tinción rápida de Golgi con el tejido cerebral. Bajo nuestras condiciones experimentales, se observó que las neuronas tienen una buena calidad de impregnación en los cuerpos celulares y dendritas, incluyendo a las espinas dendríticas. La **Figura 9** muestra el soma de una célula piramidal de la corteza de ratón, se pueden observar las dendritas apicales y basales cubiertas con espinas, una magnificación de la imagen se usó para demostrar las espinas dendríticas.

Se seleccionaron aleatoriamente dendritas apicales secundarias de neuronas piramidales de la corteza y dendritas secundarias de neuronas hipocampales para

realizar un análisis cuantitativo del número de espinas dendríticas. Para simplificar la representación de los resultados el término de “espinas” se usa para describir a todas las protuberancias que se extienden en 10 μm de largo, independientemente de las características morfológicas.

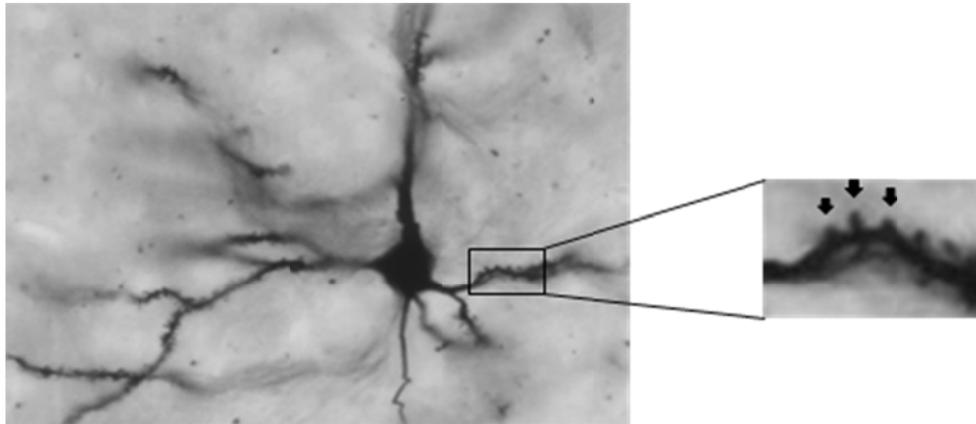


Figura 9. Tinción de Golgi. La Tinción de Golgi tiñe preferentemente a las neuronas, permitiendo visualizar a detalle su morfología. Se muestra la magnificación de una dendrita con sus espinas (flechas).

Se observaron cambios en el número de espinas dendríticas en los ratones expuestos a AE, particularmente, en la corteza cerebral (**Figura 10**) y el hipocampo (**Figura 11**).

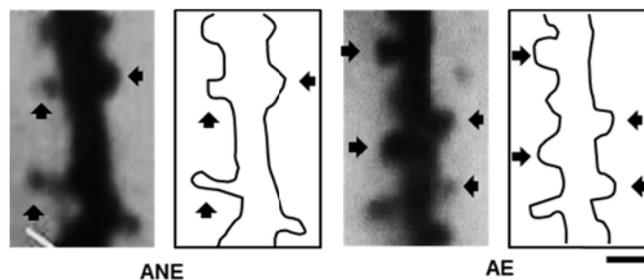


Figura 10. Los AE aumentan el número de espinas dendríticas en la corteza. Dendritas de ratones criados en AE presentan un incremento en el número de espinas comparadas con dendritas pertenecientes a ratones criados en ANE. Cada microfotografía está acompañada de su respectivo dibujo para visualizar mejor a las espinas (flechas) (Barra de escala: 2 μm).

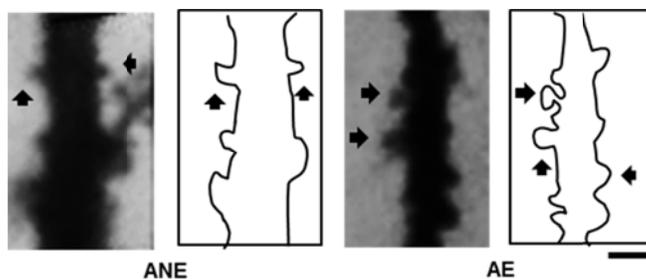


Figura 11. Los AE aumentan el número de espinas dendríticas en el hipocampo. Dendritas de ratones criados en AE muestran un mayor número de espinas que las dendritas pertenecientes a ratones criados en ANE. Cada microfotografía está acompañada de su respectivo dibujo para visualizar mejor a las espinas (flechas) (Barra de escala: 2 μ m).

La cuantificación de esta observación demuestra que los ratones hospedados en los AE tuvieron un incremento estadísticamente significativo en el número de espinas. En la corteza cerebral, se observó un incremento aproximado del 60% (**Figura 12**), mientras que en el hipocampo el incremento fue de un 55% (**Figura 13**).

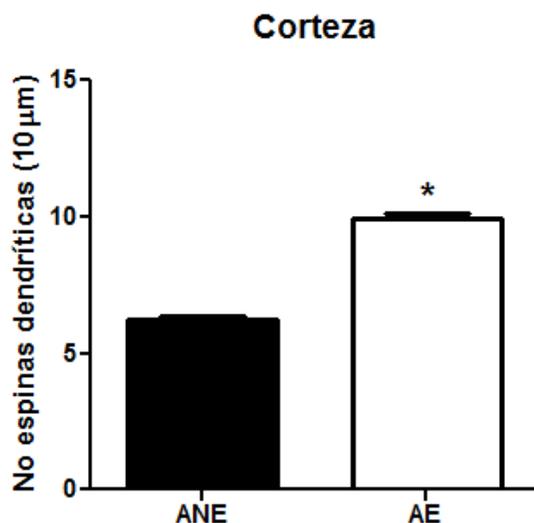


Figura 12. Número de espinas dendríticas en ANE y AE en la corteza. Los ratones criados en AE tuvieron una media de espinas dendríticas significativamente mayor (9.92 ± 0.02) que los ratones criados en ANE (6.21 ± 0.16) * $t = -14.169$, $gl = 214$, $p = 0.0001$. Las barras de error representan SEM.

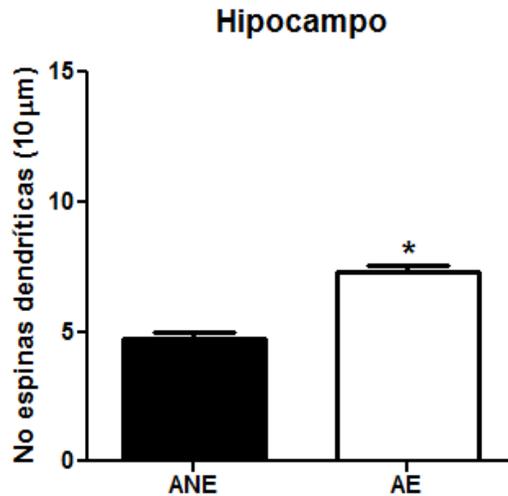


Figura 13. Número de espinas dendríticas en ANE y AE en el hipocampo. Dendritas pertenecientes a ratones criados en ANE tuvieron una media de espinas significativamente menor (4.7 ± 0.3) que las dendritas de ratones criados en AE (7.26 ± 0.2) * $t = -6.488$, $g/ = 58$, $p = 0.0001$. Las barras de error representan SEM.

Estos datos en su conjunto confirman que los AE propician la formación de nuevas espinas tanto en la corteza como en el hipocampo de ratones criados en ellos.

7.3 Los ratones C57BL/6J expresan Trombospondina-1 en el cerebro

La expresión de TSP-1 en el cerebro, se detectó durante el desarrollo embrionario y en ratones adultos (Iruela-Arispe et al., 1993; Hoffman et al., 1994). Se considera a los ratones como adultos, a partir de la semana 8 de edad (National Institutes of Health, U.S., 2013). Con el fin de determinar si en ratones C57BL/6J de 4 semanas de edad se expresaba TSP-1 en las zonas de interés (corteza e hipocampo), se realizó una inmunohistofluorescencia. En este trabajo, se observó que ratones C57BL/6J expresan ampliamente TSP-1 en el neuropilo de la corteza y el hipocampo. Particularmente, se pudo observar una notable expresión de TSP-1 en el giro dentado hipocampal (**Figura 14 A-B**). Una doble

immunohistofluorescencia demostró que la TSP-1 era de origen glial, ya que se observó una colocalización del marcador astrogial GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial, por sus siglas en inglés) con TSP-1 (**Figura 14C**). Los resultados confirman que la TSP-1 se expresa en células astrogiales de la corteza y el hipocampo.

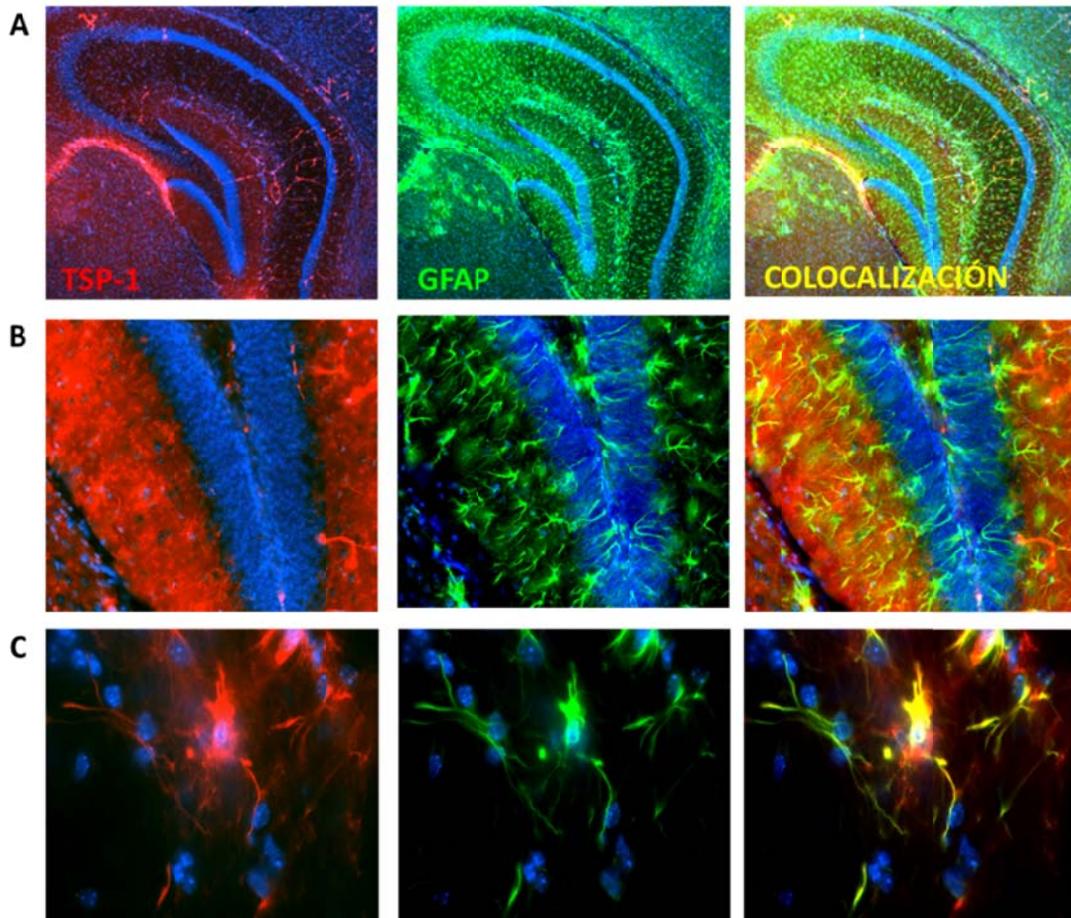


Figura 14. Expresión de TSP-1 en cerebro de ratón C57BL/6J. Doble inmunofluorescencia con anti-TSP-1 (rojo) y anti-GFAP (verde). Los núcleos celulares se marcaron con Hoechst (azul). **A)** La corteza y el hipocampo muestran una gran expresión de TSP-1 en el cerebro (4x). **B)** La zona del hipocampo con mayor expresión de TSP-1 es el giro dentado (20x). **C)** Un mayor acercamiento al tejido revela la colocalización de TSP-1 y astrocitos (63x).

Debido a la alta expresión de TSP-1 que se observó en el cerebro de los ratones C57BL/6J (**Figura 14**), los niveles de TSP-1 se cuantificaron por el inmunoensayo de ELISA en la corteza y el hipocampo. Los valores arrojados por el lector de ELISA se transformaron a su valor correspondiente a partir de una curva estándar de concentraciones conocidas de TSP-1.

A pesar de que el hipocampo es una estructura pequeña comparada con la corteza, los valores que se obtuvieron muestran que los niveles de TSP-1 fueron significativamente más altos en esta estructura (103.6 ± 3.8 ng/ml), que los niveles que se observaron en la corteza cerebral (87.93 ± 2.6 ng/ml) (**Figura 15**) de los ratones en ANE.

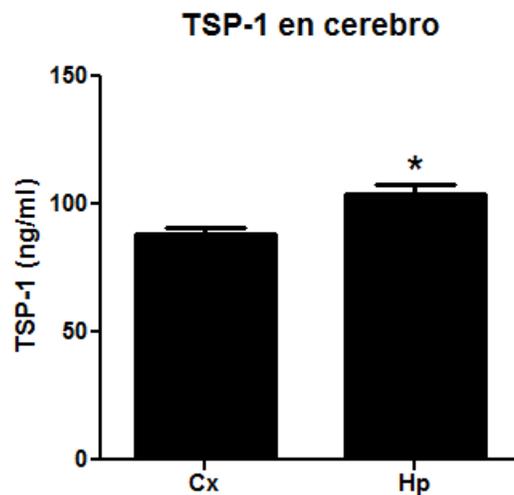


Figura 15. Expresión de TSP-1 en cerebro. Los niveles de TSP-1 en ratones en condiciones control (ANE) fueron más altos en el hipocampo que en la corteza. Las barras de error representan SEM. $*t = -3.357$, $gl = 10$, $p = 0.007$
Cx- Corteza. Hp- Hipocampo.

7.3.1 Los ambientes enriquecidos incrementan los niveles de Trombospondina-1 en la corteza de ratones C57BL/6J

Para corroborar si la TSP-1 participa en la formación de espinas que se observó en los cerebros de ratones expuestos a AE, los niveles de TSP-1 se determinaron en la corteza y el hipocampo de los ratones expuestos a AE.

De acuerdo a los valores que se obtuvieron con el inmunoensayo de ELISA, las cortezas de los ratones criados en AE mostraron un incremento en los niveles de TSP-1 en comparación con los valores observados en las cortezas de ratones criados en ANE. El grupo en AE tuvo una media más alta en los niveles de TSP-1 (118.7 ± 10.1 ng/ml) que el grupo en ANE (87.9 ± 2.6 ng/ml) (**Figura 16**).

De acuerdo a la prueba *t* de Student, las diferencias entre los niveles de TSP-1 encontrados en cortezas del grupo en ANE y las del grupo en AE son estadísticamente significativas ($t = -2.934$, $g/ = 5.66$, $p < 0.05$). Estos resultados sugieren que los AE producen un incremento en la expresión de TSP-1 en etapas posteriores a las primeras semanas postnatales, lo que se podría relacionar con la formación de nuevas espinas dendríticas en la corteza.

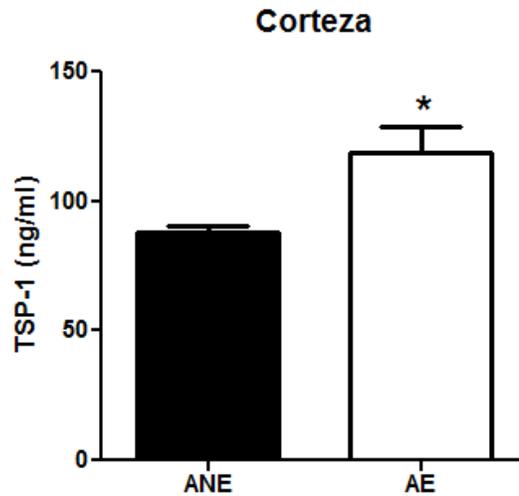


Figura 16. Expresión de TSP-1 en la corteza. Ratones expuestos a AE presentan un incremento estadísticamente significativo* en la expresión de TSP-1 en comparación con el grupo en ANE. Las barras de error representan SEM. * $t = -2.934$, $g/ = 5.66$, $p = 0.03$

7.3.2 Los ambientes enriquecidos no producen cambios significativos en los niveles de Trombospondina-1 en el hipocampo

Los resultados de este trabajo muestran que existe un incremento en el número de espinas dendríticas en el hipocampo, después de que los ratones son expuestos a AE (**Figuras 11 y 13**). Además, se detectaron altos niveles de TSP-1 en el hipocampo (**Figura 14**). Con el objetivo de determinar si la formación de espinas en el hipocampo dependiente de AE (**Figura 13**) se relacionaba con un incremento en la expresión de TSP-1, los niveles de esta proteína se determinaron en el hipocampo de ratones expuestos a AE.

Los valores encontrados mostraron que no existe un incremento significativo en los niveles de TSP-1 en los hipocampos de ratones expuestos a AE (105.2 ± 1.4 ng/ml) en comparación con los observados en el grupo de ratones en ANE ($103.6 \pm$

3.8 ng/ml) (**Figura 17**), sugiriendo que en el hipocampo otras proteínas podrían estar involucradas en la formación de espinas dendríticas dependiente de AE.

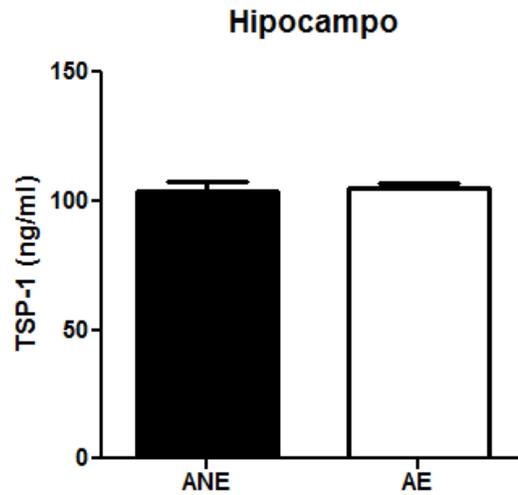


Figura 17. Expresión de TSP-1 en el hipocampo. Ratones expuestos a AE no presentan un incremento estadísticamente significativo en la expresión de TSP-1 en comparación con el grupo en ANE. Las barras de error representan SEM. $t = -0.408$, $gI = 5.66$, $p = 0.697$

8. Discusión

Investigaciones anteriores demuestran que organismos expuestos a AE sufren cambios en la morfología gruesa de sus neuronas. Los AE promueven el aumento en la complejidad y longitud de los árboles dendríticos, y el engrosamiento de las dendritas (van Praag et al., 2000). Por lo tanto, estructuras como la corteza y el hipocampo aumentan su grosor (Walsh et al., 1969; Rosenzweig y Bennett, 1996; van Praag et al., 2000). Adicionalmente, los AE inducen el incremento en el número de espinas dendríticas y sinapsis en diferentes estructuras cerebrales (Comery et al., 1996; Landers et al., 2011). Las espinas dendríticas están formadas principalmente de filamentos de actina y cuentan con la maquinaria biológica necesaria para hacer de éstas estructuras plásticas (Koleske, 2013). En consecuencia, las espinas dendríticas son capaces de responder a los estímulos y a su propia actividad sináptica cambiando su morfología o incluso desapareciendo (Bastrikova et al., 2008). Además, se forman nuevas espinas dendríticas como consecuencia de la propia actividad del organismo (Eadie et al., 2005; Yang et al., 2009).

En este trabajo, se observó que la exposición de ratones C57BL/6J a AE promueve la formación de nuevas espinas dendríticas en la corteza y el hipocampo, incrementando el número de espinas presentes en estas estructuras, en comparación con los ratones criados en ANE.

En la corteza, el incremento en el número de espinas fue mayor que el incremento que se observó en el hipocampo. El número de espinas dendríticas presente en la corteza, podría relacionarse con el procesamiento complejo de información que se

lleva a cabo en esta estructura (Ballesteros-Yáñez et al., 2006). La gran cantidad de espinas dendríticas presente en la corteza, refleja el número de entradas excitatorias integradas en esta estructura cerebral (Elston, 2000, 2002). Un incremento en el número de entradas excitatorias causado por la estimulación en los AE, causaría a su vez, un incremento en el número de espinas en las dendritas (Jung y Herms, 2012; Koleske, 2013). Adicionalmente, el hipocampo juega un papel importante al inducir cambios plásticos dependientes de experiencia en la corteza cerebral. La lesión unilateral del hipocampo produce un menor incremento de espinas dendríticas en la corteza ipsilateral, después de los AE (Sutherland et al., 2010), sugiriendo una interacción sináptica entre ambas estructuras.

La TSP-1, una proteína de matriz extracelular con actividad espinogénica y sinaptogénica, se localiza en tejido adulto, principalmente en las capas profundas de la corteza y en el hipocampo, donde la presencia de TSP-1 es mayor y se detecta especialmente en la capa granular, sobre todo del giro dentado (Hoffman et al., 1994). Los resultados de este trabajo concuerdan con los trabajos de Hoffman et al (1994), demostrando que el cerebro de los ratones tiene una expresión diferenciada de TSP-1 desde la semana 4 de edad.

En el SNC, el pico más alto de expresión de TSP-1 se detecta en el desarrollo postnatal temprano (primeras tres semanas) (Risher y Eroglu, 2012; Christopherson et al., 2005), lo que coincide con el periodo de mayor formación de espinas dendríticas y sinapsis. Sin embargo, en etapas posteriores, la síntesis y secreción de TSP-1 pueden aumentar y de esta forma participar en la generación de nuevas sinapsis en procesos de remodelación funcional del sistema nervioso (Hoffman y O'Shea, 1999; Liauw et al., 2008). En este trabajo se observó que el

hipocampo, a pesar de ser una estructura de menor tamaño que la corteza cerebral, presenta mayores niveles de TSP-1 con respecto a la corteza. Esta expresión diferencial entre ambas estructuras, también se observa en neurotrofinas como el BDNF, NT-3 y NGF. Teniendo además, una expresión diferencial de éstas durante el desarrollo y la edad adulta (Maisonpierre et al., 1990), lo que sugiere ventanas temporales diferenciadas en procesos de maduración y plasticidad en diversas estructuras del SNC.

Los mecanismos celulares asociados a la formación y estabilización de espinas dendríticas dependiente de experiencia, no se conocen en su totalidad, por lo que este trabajo tuvo como objetivo analizar si la TSP-1 participa en estos procesos. Para ello, los niveles de TSP-1 se analizaron en los cerebros de ratones C57BL/6J después de ser expuestos a AE. Los resultados de este trabajo demuestran la expresión diferencial de TSP-1 en cerebros de ratones expuestos a AE. Particularmente, en la corteza los niveles de TSP-1 aumentaron significativamente, mientras que en el hipocampo no hubo un incremento significativo de esta proteína, a pesar de que en ambas estructuras se observó un incremento en el número de espinas dendríticas.

El incremento en el número de espinas dendríticas en la corteza, después de los AE, podría estar relacionado con el aumento en los niveles de TSP-1 en la corteza inducido por este modelo conductual. En este caso, la TSP-1 podría contribuir a la formación de espinas mediante vías de señalización dirigidas al citoesqueleto (García et al., 2010) y a la estabilización de las nuevas espinas facilitando la sinaptogénesis mediante la alineación de los componentes de la pre y

postsinapsis (axón y espina, respectivamente) (Liauw et al., 2008), y el reclutamiento de proteínas sinápticas (Ehlers, 2005).

Además, en la corteza cerebral adulta, se expresan principalmente genes relacionados a procesos asociados con la función neuronal y sináptica (Pletikos et al., 2014). Cambios en la expresión de genes involucrados en la formación de nuevas espinas y sinapsis, después de los AE, se han reportado (Rampon et al., 2000). Por ejemplo, aumenta la expresión de cortactina, proteína asociada a citoesqueleto de actina, y la PSD-95, proteína asociada a la densidad postsináptica (Rampon et al., 2000), lo que demuestra una alta sensibilidad de la corteza cerebral a la estimulación ambiental.

El número de espinas dendríticas dentro de la corteza cerebral puede variar entre la corteza motora, somatosensorial y visual, siendo la corteza motora la que más espinas dendríticas presenta (Ballesteros-Yáñez et al., 2006). Estas diferencias podrían deberse a una expresión diferenciada de TSP-1 en cada una de las cortezas. Estudios sobre la expresión de TSP-1 en diferentes áreas de la corteza son necesarios para conocer el papel de la TSP-1 dentro de esta estructura.

En el caso del hipocampo, los resultados demuestran que los niveles de TSP-1, después de que los ratones fueran expuestos a AE, no incrementaron significativamente, a pesar de haber un aumento en el número de espinas. Este resultado podría deberse a que en el hipocampo la formación de espinas podría estar asociada a otros mecanismos. Estudios recientes reportan que en células hipocámpales, la TSP-1 acelera la formación de sinapsis (Xu et al., 2010), lo que podría relacionarse con el aumento en el número de espinas (éstas son el principal sitio de contacto sináptico excitatorio en el cerebro) que se observa en los

ratones expuestos a AE. La TSP-1 en el hipocampo podría ser una proteína involucrada en la formación de las espinas, pero no en el mantenimiento de las mismas. Sin embargo, es plausible que otras TSPs participen en la formación de espinas y sinapsis durante la exposición a AE, ya que todas tienen actividad sinaptogénica (Risher y Eroglu, 2012). Particularmente la TSP-2 y la TSP-4 podrían estar involucradas en la formación de espinas, ya que la TSP-2 parece trabajar junto con la TSP-1 (Liau et al., 2008), y la TSP-4 es la TSP más abundante en el SNC en etapas tardías del desarrollo (Arber y Caroni, 1995). En el hipocampo, la TSP-4 se expresa principalmente en las células granulares del giro dentado, y las células piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 (Arber y Caroni, 1995). Del mismo modo, existen otros factores que podrían contribuir a la formación y mantenimiento de espinas en el hipocampo, ya que después de la exposición a AE, existe un incremento en la expresión de factores neurotróficos como el BDNF, neurotrofina-3 (NT-3) y factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) (Torasdotter et al., 1998; Ickes et al., 2000; Simpson y Kelly, 2011). El BDNF, además, correlaciona significativamente con la formación de espinas promovida por los AE en el giro dentado (Stranahan, A., 2011). Asimismo, la ausencia de óxido nítrico en el hipocampo, previene la formación de espinas inducida por los AE en ratones (Nikonenko et al., 2013).

Por otra parte, en el hipocampo, la generación de nuevas neuronas continúa en etapas postnatales, especialmente en el giro dentado (Kuhn et al., 1996) y es promovida por la actividad física en los AE (Kempermann et al., 1998; van Praag et al., 2000). Recientemente, se demostró que la TSP-1 participa en procesos de proliferación y diferenciación de células progenitoras neurales (Lu y Kipnis, 2010).

Existen fallas en la neurogénesis en ratones deficientes de TSP-1 (TSP-1^{-/-}), la cual es restablecida mediante la adición de TSP-1 a cultivos celulares TSP-1^{-/-} (Lu y Kipnis, 2010). Por lo tanto, la TSP-1 en el hipocampo, podría participar en la neurogénesis inducida por los AE más que en los procesos de espinogénesis y sinaptogénesis dependientes de experiencia. Estudios sobre la expresión de la TSP-1 en diferentes ventanas temporales durante la exposición a AE, ayudarían a dilucidar qué papel juega la TSP-1 en procesos de plasticidad cerebral dependiente de experiencia y en qué momento de estos procesos se da su expresión más alta.

En humanos, existen deficiencias en TSP-1 y anomalías en las espinas dendríticas en el síndrome de Down (Marin-Padilla, 1976; García et al., 2010). Diversos modelos animales de este síndrome muestran deficiencia en la presencia de espinas dendríticas delgadas y de hongo (Belichenko et al., 2004; Haas et al., 2013), que se relacionan con procesos de aprendizaje y memoria, así como deficiencias en la densidad sináptica del hipocampo (Kurt et al., 2004). En consecuencia, la deficiencia de la expresión de TSP-1, en el síndrome de Down, podría estar involucrada en la anomalía de las espinas dendríticas y en los déficits cognitivos presentes en este síndrome.

Finalmente, modelos animales del síndrome de Down también se benefician de la exposición a AE. Mejorías en la plasticidad sináptica, habilidades motoras y cognitivas (Martínez-Cué et al., 2002; Begenisic et al., 2011) se reportan en estos modelos, después de la exposición a los AE. Además, programas de intervención temprana en pacientes con síndrome de Down mejoran las habilidades cognitivas de estas personas (Irwin, 1989). Las mejorías observadas tanto en modelos

animales, como en pacientes con síndrome de Down, podrían deberse a una estimulación de la espinogénesis que conlleve a un fortalecimiento de los contactos neuronales.

Este trabajo permite el acercamiento a un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en procesos de plasticidad dependiente de experiencia que permitirán desarrollar nuevas estrategias y programas de intervención que ayuden a mejorar los déficits cognitivos presentes en el síndrome de Down y otras patologías del neurodesarrollo.

9. Conclusiones

En los últimos años, la TSP-1 se ha estudiado como un factor espinogénico y sinaptogénico en el SNC. Su participación en procesos plásticos, como la recuperación de conexiones o tractos nerviosos dañados, sugirió su participación en procesos de plasticidad cerebral dependientes de experiencia. Con base en los resultados de este trabajo, podemos concluir que: 1) la TSP-1 participa en procesos de plasticidad estructural o morfológica dependiente de experiencia en la corteza de ratones C57BL/6J, 2) la formación de nuevas espinas dendríticas en la corteza cerebral, promovida por los AE, podría ser dependiente de TSP-1, y 3) en el hipocampo, otros factores con actividad espinogénica podrían estar involucrados en la formación de espinas dependiente de AE.

Los procesos de plasticidad dependiente de experiencia dan lugar a fenómenos como el aprendizaje y la memoria. Estudios encaminados a dilucidar los mecanismos activados por la TSP-1 para la formación de espinas dependiente de

experiencia, contribuirán al conocimiento y entendimiento del funcionamiento de la TSP-1 en este proceso de plasticidad, y ayudarán a entender los mecanismos afectados en la patología de las espinas dendríticas que dan lugar a las afectaciones cognitivas como las observadas en el síndrome de Down.

10. Referencias

- Adams, J. C. (1997) Thrombospondin-1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 29, 861- 865
- Adams, J. C. and Lawler, J. (2004) The thrombospondins. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36, 961-968
- Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas, [en línea] 2012, [Agosto, 2013]. Disponible en la web: <http://mouse.brain-map.org/>
- Amaral, O. B., Vargas, R. S., Hansel, G., Izquierdo, I., Souza, D. O. (2008) Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiology and Behavior* 93, 388-394
- Anlar, B., Atilla, P., Cakar, N. A., M. F. Kose., Beksac, M. S., Dagdeviren, A. and Akcören, Z. (2002) Expression of adhesion and extracellular matrix molecules in the developing human brain. *Journal of Child Neurology* 17, 707-713
- Arber, S. and Caroni, P. (1995) Thrombospondin-4, an extracellular matrix protein expressed in the developing and adult nervous system promotes neurite outgrowth. *The Journal of Cell Biology* 131, 1083-1094
- Asch, A. S., Leung, L. L. K., Shapiro, J. and Nachman, R. L. (1986) Human brain glial cells synthesize thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2904-2908
- Asch, A. S., Silbiger, S., Heimer, E. and Nachman, R. L. (1992) Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 182, 1208-1217
- Avila-Costa, M. R., Fortoul, T. I., Niño-Cabrera, G., Colín-Barenque, L., Bizzarro-Nevares, P., Gutiérrez-Valdez, A. L., Ordóñez-Librado, J. L., Rodríguez-Lara, V., Mussali-Galante, P., Díaz-Bech, P. and Anaya-Martínez, V. (2006) Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V₂O₅) promote memory deterioration. *NeuroToxicology* 27, 1007-1012
- Ballesteros-Yáñez, I., Benavides-Piccione, R., Elston, G. N. and DeFelipe, J. (2006) Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience* 138, 403-409
- Barres, B. B. (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60, 430-440
- Bastrikova, N., Gardner, G. A., Reece, J. M., Jeromin, A. and Dudek, S. M. (2008) Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Science* 105, 3123-3127

Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M. and Malenka, R. C. (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nature Neuroscience* 3, 1291-1300

Begenisic, T., Spolidoro, M., Braschi, C., Baroncelli, L., Milanese, M., Pietra, G., Fabbri, M. E., Bonanno, G., Cioni, G., Maffei, L. and Sale, A. (2011) Environmental enrichment decreases GABAergic inhibition and improves cognitive abilities, synaptic plasticity, and visual functions in a mouse model of Down syndrome. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 5, 1-9

Belichenko, P. V., Masliah, E., Kleschevnikov, A. M., Villar, A. J., Epstein, C. J., Salehi, A. and Mobley, W. C. (2004) Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of down syndrome. *The Journal of Comparative Neurology* 480, 281–298

Blaw-Hospers, C.H., de Graaf-Peters, V. B., Dirks, T., Bos, A. F. and Hadders-Algra, M. (2007) Does early intervention in infants at high risk for a developmental motor disorder improve motor and cognitive development? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31, 1201-1212

Bourne, J. N. and Harris K. M. (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Reviews of Neuroscience* 31, 47-67

Brüning, I., Kaech, S., Brinkhaus, H., Oertner, T. G. and Matus, A. (2004) Influx of extracellular calcium regulates actin-dependent morphological plasticity in dendritic spines. *Neuropharmacology* 47, 669–676

Bryck, R. L. and Fisher, P. A. (2012) Training the brain practical applications of neural plasticity from the intersection of cognitive neuroscience, developmental psychology, and prevention science. *American Psychologist* 67, 87-100

Cáceres, M., Suwyn, C., Maddox, M., Thomas, J. W., and Preuss, T. M. (2007) Increased cortical expression of two synaptogenic thrombospondins in human brain evolution. *Cerebral Cortex* 17, 2312-2321

Chamak, B., Dobbertin, A. and Mallat, M. (1995) Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neuroscience* 69, 177-187

Chen, H., Herndon, M. E. and Lawler, J. (2000) The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology* 19, 597-614

Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes C. C. A., Mullowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D. F., Bornstein, P. and Barres, B. A. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421-433

Clarke, L. E. and Barres, B. A. (2013) Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews* 14, 311-321

Comery, T. A., Stamoudis, C. X., Irwin, S. A. and Greenough, W. T. (1996) Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment. *Neurobiology of Learning and Memory* 66, 93-96

Corless, C. L., Mendoza, A., Collins, T. and Lawler, J. (1992) Colocalization of thrombospondin and syndecan during murine development. *Developmental Dynamics* 193, 346-358

Crawford, D. C., Jiang, X., Taylor, A. and Mennerick, S. (2012) Astrocyte-derived thrombospondins mediate the development of hippocampal presynaptic plasticity *in vitro*. *The Journal of Neuroscience* 38, 13100-13110

DeFelipe, J. (2006) Brain plasticity and mental processes: Cajal again. *Nature Reviews* 7, 811-817

D'Hooge, R. and De Deyn, P. P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36, 60-90

Eadie, B. D.; Redila, V. A. and Christie, B. R. (2005) Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *The Journal of Comparative Neurology*, 486, 39-47

Ehlers, M. D. (2005) Synapse formation: astrocytes spot off. *Current Biology* 15, 134-137

Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S. and Malinow, R. (2007) PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *PNAS* 104, 4176-4181

Elston, G.N. (2000) Pyramidal cells of the frontal lobe: all the more spinous to think with. *The Journal of Neuroscience* 20, 1-4

Elston, G.N. (2002) Cortical heterogeneity: implications for visual processing and polysensory integration. *Journal of Neurocytology* 31, 317-335

Eroglu, C., Allen, N. J., Susman, M. W., O'Rourke, N. A., Park, C. Y., Özkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, S. B., Annis, D. S., Huberman, A. D., Green, E. M., Lawler, J., Dolmetsch, R., García, K. C., Smith, S. J., Luo, Z. D., Rosenthal, A., Mosher, D. F. and Barres, B. A. (2009) Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139, 380-392

Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V. and Harris, K. M. (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *The Journal of Neuroscience* 18, 8900–8911

Fiala, J. C., Spacek, J. and Harris, K. M. (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Research Reviews* 39, 29–54

Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D. and Matus, A. (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847–854

García-López, P., García-Marín, V. and Freire, M. (2007) The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience. *Progress in Neurobiology* 83, 110–130

García-López, P., García-Marín, V. and Freire, M. (2010) Dendritic spines and development: towards a unifying model of spinogenesis—a present day review of Cajal's histological slides and drawings. *Neural Plasticity* 2010, 1-29

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, e14200. doi:10.1371/journal.pone.0014200

Greenough, W. T. and Volkmar, F. R. (1973) Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Experimental Neurology* 40, 491- 504

Greenough, W. T., Volkmar, F. R. and Juraska, J. M. (1973) Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Experimental Neurology* 41, 371-378

Haas, M. A., Bell, D., Slender, A., Lana-Elola, E., Watson-Scales, S. Fisher, E. M. C., Tybulewicz, V. L. J., Guillemot, F. (2013) Alterations to dendritic spine morphology, but not dendrite patterning, of cortical projection neurons in Tc1 and Ts1Rhr mouse models of down syndrome. *PLoS ONE* 8, e78561. doi:10.1371/journal.pone.0078561

Haber, M. Zhou, L. and Murai, K. K. (2006) Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *The Journal of Neuroscience* 26, 8881-8891

Harris, K. M. and Kater, S. B. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341-371

Hering, H. and Sheng, M. (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews* 2, 880-888

Hoffman, J. R., Dixit, V. A., and O'Shea, K. S. (1994) Expression of thrombospondin in the adult nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 340, 126-139

Hoffman, J. R. and O'Shea, K. S. (1999) Thrombospondin expression in nerve regeneration II. Comparison of optic nerve crush in the mouse and goldfish *Brain Research Bulletin* 48, 421–427

Holtmaat, A., De Paola, V., Wilbrecht, L. and Knott, G. W. (2008) Imaging of experience-dependent structural plasticity in the mouse neocortex in vivo. *Behavioural Brain Research* 192, 20–25

Hotulainen, P. and Hoogenraad, C. C. (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* 189, 619–629

Ickes, B. R., Pham, T. M., Sanders, L.A., Albeck, D. S., Mohammed, A. H. and Granholm, A-C. (2000) Long- term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental Neurology* 164, 45-52

Ilin, Y. and Richter-Levin, G. (2009) Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. *PLoS ONE* 4, e4329. doi:10.1371/journal.pone.0004329

Iruela-Arispe, M. L., Liska, D. J., Sage, E. H. and Bornstein, P. (1993) Differential expression of thrombospondin 1,2, and 3 during murine development. *Developmental Dynamics* 197, 40-56

Irwin, K. C. (1989) The school achievement of children with Down's Syndrome. *New Zealand Medical Journal* 102, 11-13

Jones, T. A., Klintsova, A. Y., Kilman, V. L., Sirevaag, A. M. and Greenough, W. T. (1997) Induction of multiple synapses by experience in the visual cortex of adult rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 68, 13-20

Jung, C. K. E. and Herms, J. (2012) Structural dynamics of dendritic spines are influenced by and environmental enrichment: an in vivo imaging study. *Cerebral Cortex* doi:10.1093/cercor/bhs317

Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N. and Nakahara, H. (2003) Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences* 26, 360-368

Kempermann, G., Khun, H. G. and Gage, F. H. (1998) Experienced-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience* 18, 3206-3212

Khun, H. G., Dickinson-Anson and Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience* 16, 2027-2033

Kim, E. and Sheng, M. (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews* 5, 771-781

Kolb, B., Gorny, G., Söderpalm, A. H. V. and Robinson, T. E. (2003) Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse* 48, 149-153

Koleske, A. J. (2013) Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nature Reviews* 14, 536-550

Korobova, F. and Svitkina, T. (2010) Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 21, 165–176

Kozorovitskiy, Y., Gross, C. G., Kopil, K., Battaglia, L., McBreen, M., Stranahan, A. M. and Gould, E. (2005) Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *PNAS* 102, 17478- 17482

Krech, D., Rosenzweig, M. R. and Bennett, E. D. (1966) Environmental impoverishment, social isolation and changes in brain chemistry and anatomy. *Physiology and Behavior* 1, 99-104

Kurt, M. A., Kafa, M. I., Dierssen, M. and Davies, D. C. (2004) Deficits of neural density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain Research* 1022, 101-109

Lamprecht, R. and LeDoux, J. (2004) Structural plasticity and memory. *Nature Reviews* 5, 45-54

Landers, M. S., Knott, G. W., Lipp, H. P., Poletaeva, I., and Welker, E. (2011) Synapse formation in adult barrel cortex following naturalistic environmental enrichment. *Neuroscience* 199, 143-152

Laviola, G., Hannan, A. J., Macri, S., Solinas, M. and Jaber, M. (2008) Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease* 31, 159-168

Lawler, J. (2000) The functions of thrombospondin-1 and -2. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 634-640

Levenga, J. and Willemsen, R. (2012) Perturbation of dendritic protrusions in intellectual disability. *Progress in Brain Research* 197, 153-168

Liu, N., He, S. and Yu, X. (2012) Early natural stimulation through environmental enrichment accelerates neuronal development in the mouse dentate gyrus. *Plos One* 7, 1-9

Liau, J., Hoang, S., Choi, M., Eroglu, C., Choi, M., Sun, G., Percy, M., Wildman-Tobriner, B., Bliss, T., Guzman, R. G., Barres, B. A. and Steinberg, G. K. (2008) Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28, 1722-1732

Lu, Z. and Kipnis, J. (2010) Thrombospondin 1- a key astrocyte-derived neurogenic factor. *The FASEB Journal* 24, 1925-1934

Luebke, J., Barbas, H. and Peters, A. (2010) Effects of normal aging on prefrontal area 46 in the rhesus monkey. *Brain Research Reviews* 62, 212-232

Lawler, J. (2000) The functions of thrombospondin-1 and -2. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 634-640

Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R. F., Wiegmann, S. J., Furth, M. E., Lindsay, R. M. and Yancopoulos, G. D. (1990) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5, 501-509

Marin-Padilla, M. (1976) Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome: a Golgi study. *Journal of Comparative Neurology* 167, 63-82

Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Lumberras, M., Paz, J., Davisson, M. T., Schmidt, C., Dierssen, M. and Flórez, J. (2002) Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behavioural Brain Research* 134, 185-200

Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Lino, M. and Kasai, K. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience* 4, 1086-1092

Miller, M. and Peters, A. (1981) Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *The Journal of Comparative Neurology* 203, 555-573

MitoSciences. Sandwich ELISA Kits, [en línea] 2004, [Enero, 2014]. Disponible en la web: <http://www.mitosciences.com/>

Miyashita, M., Ohnishi, H., Okazawa, H., Tomonaga, H., Hayashi, A., Fujimoto, T., Furuya, N. and Matozaki, T. (2004) Promotion of neurite and filopodium formation by CD47: roles of integrins, Rac and Cdc42. *Molecular Biology of the Cell* 15, 3950-3963

Mora, F., Segovia, G. and del Arco, A. (2007) Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews* 55, 78-88

Moser, M. B., Trommald, M. and Andersen, P. (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggest the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12673-12675

National Institutes of Health. Science Education, [en línea] Septiembre 2013, [Enero, 2014]. Disponible en la web:
http://science.education.nih.gov/supplements/nih4/Energy/activities/508/mice-ref/mice_ref.htm

Nikonenko, I., Boda, B., Steen, S., Knott, G., Welker, E. and Muller, D. (2008) PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *Journal of Cell Biology* 183, 1115–1127

Nikonenko, I., Nikonenko, A., Mendez, P., Michurina, T. V., Enikolopov, G. and Muller, D. (2013) Nitric oxide mediates local activity- dependent excitatory synapse development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E4142-E4151

Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L. and Svoboda, K. (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 313–53

Nithianantharajah, J. and Hannan, A. J. (2006) Enriched environments, experienced-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 697-709

Nithianantharajah, J., Levis H. and Murphy, M., (2004) Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of Learning and Memory* 81, 200-210

Nishida, H. and Okade, S. (2007) Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines. *The Journal of Neuroscience* 27, 331-340

O'Brien, J. and Unwin, N. (2006) Organization of spines on the dendrites of Purkinje cells. *PNAS* 103, 1575–1580

Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A. and Hayashi, Y. (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature Neuroscience* 7, 1104-1112

Olsson, A. S. and Dahlborn, K. (2002) Improving housing conditions for laboratory mice: a review of “environmental enrichment”. *Laboratory Animals* 36, 243-270

Osterhout, D. J., Frazier, W. A. and Higgins, D. (1992) Thrombospondin promotes process outgrowth in neurons from the peripheral and central nervous systems. *Developmental Biology* 150, 256- 265

Palmer, F. B., Shapiro, B. K., Allen, M. C., Mosher, B. S., Bilker, S. A., Harryman, S. E., Meinert, C. L. and Capute, A. J. (1990) Infants stimulation curriculum for infants with cerebral palsy: effects on infant temperament, parent-infant interaction, and home environment. *Pediatrics* 85, 411-415

Park, M., Salgado, J. M., Ostroff, L., Helton, T. D., Robinson, C. G., Harris, K. M. and Ehlers, M. D. (2006) Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52, 817–830

Petrosini, L., De Bartolo, P., Foti, F., Gelfo, F., Cutuli, D., Giuseppa Leggio, M. and Mandolesi, L. (2009) On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Research Reviews* 61, 221-239

Pletikos, M., Sousa, A. M. M., Sedmak, G., Meyer, K. A., Zhu, Y., Cheng, F., Li, M., Imamura Kawazawa, Y. and Sestan, N. (2014) Temporal specification and bilaterality of human neocortical topographic gene expression. *Neuron* 81, 321-332

Portera-Cailliau, C.; Pan, D. T., Yuste, R. (2003) Activity regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *The Journal of Neuroscience* 23, 7129-7142

Raine, A., Venables, P. H., Dalais, C., Mellingen, K., Reynolds, C. and Mednick, S. A. (2001) Early educational and health enrichment at age 3-5 years is associated with increased autonomic and central nervous system arousal and orientating at age 11 years: evidence from the Mauritius Child Health Project. *Psychophysiology* 38, 254-266

Ramey, C. T. and Ramey, S. L. (1998) Prevention of intellectual disabilities: early interventions to improve cognitive development. *Preventive medicine* 27, 224-232

Rampon, C., Jiang, C. H., Dong, H., Tang, Y., Lockhart, D. J., Schultz, P. G., Tsien, J. Z. and Hu, Y. (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *PNAS*. 23, 12880–12884

Rasin, M. R., Darmopil, S., Petanjek, Z., Tomic-Mahecic, T., Mohammed, A. H. and Bogdanovic, Nenad. (2011) Effect of environmental enrichment on morphology of deep layer III and layer V pyramidal cells of occipital cortex in oldest-old rat- a quantitative Golgi Cox study. *Collegium Antropologicum* 35, 253-258

Reynolds, S., Lane, S. J. and Richards, L. (2010) Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2, 120-132

Risher, W. C. and Eroglu, C. (2012) Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biology*, doi:10.1016/j.matbio.2012.01.004

Rosenzweig, M. and Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural Brain Research*. 78, 57-65

Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L. and Diamond, M. C. (1962) Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 55, 429-437

Sakamoto, H., Mezaki, Y., Shikimi, H., Ukena, K. and Tsutsui, K. (2003) Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology* 144, 4466–4477

Sasahara, K., Shikimi, H., Haraguchi, H., Sakamoto, H., Honda, S., Harada, N. and Tsutsui, K. (2007) Mode of action and functional significance of estrogen-inducing dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis in the developing Purkinje cell. *The Journal of Neuroscience*, 27, 7408 –7417

Segal, M., Vlachos, A. and Korkotian, E. (2010) The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. *Neuroscientist* 16, 125-132

Simpson, J. and Kelly, J. P. (2011) The impact of environmental enrichment in laboratory rats. Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research* 222, 246-264

Sorra, K. E. and Harris, K. M. (2000) Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10, 501–511

Sotelo, C. (1990) Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *Journal of Experimental Biology* 153, 225–279

Stellwagen, D. and Malenka, R. C. (2006) Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440, 1054-1059

Stevens, B. (2008) Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals* 16, 278-288

Stranahan, A. M. (2011) Physiological variability in brain-derived neurotrophic factor expression predicts dendritic spine density in the mouse dentate gyrus. *Neuroscience Letters* 495, 60-62

Sutherland, R., Gibb, R. and Kolb, B. (2010) The hippocampus makes a significant contribution to experience-dependent neocortical plasticity. *Behavioral Brain Research* 214, 121-124

Sztainberg, Y. and Chen, A. (2010) An environmental enrichment model for mice. *Nature Protocols* 5, 1535-1539

Tashiro, A. and Yuste, R. (2003). Structure and molecular organization of dendritic spines. *Histology and Histopathology* 18, 617-634

Torasdotter, M., Metsis, M., Henriksson, B. G., Winblad, B. and Mohammed, A. H. (1998) Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behavioural Brain Research* 93, 83-90

Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E. and Svoboda, K. (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420, 788-794

Turner, A. M. and Greenough, W. T. (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapse per neuron. *Brain Research* 329, 195-203

Tyler, W. J. and Pozzo-Miller, L. (2003) Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *Journal of Physiology* 553.2, 497–509

van Praag, H., Kempermann, G. and Cage, F. H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews* 1, 191-198

von Bohlen und Halbach, O. (2009) Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Annals of Anatomy* 191, 518—531

Walsh, R. N., Budtz-Olsen, O. E., Penny, J. E. and Cummins, R. A. (1969) The effects of environmental complexity on the histology of the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology* 137, 361-366

Wosiski-Kuhn, M. and Stranahan, A. M. (2012) Transient increases in dendritic spine density contribute to dentate gyrus long-term potentiation. *Synapse* 66, 661-664

Xu, J., Xiao, N. and Xia, J. (2010) Thrombospondin-1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons through neuroligin 1. *Nature Neuroscience* 13, 22-24

Yang, G., Pan, F. and Gan, W. (2009) Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462, 920-925

Yoshihara, Y., De Roo, M. and Muller, D. (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion in Neurobiology* 19, 146- 153

Yuste, R. (2002) History of neuroscience: The Discovery of Dendritic Spines, IBRO History of Neuroscience.
[http://www.ibro.info/Pub/Pub_Main_Display.asp?LC_Docs_ID=3532]

Yuste, R. (2010). *Dendritic Spines*. MIT Press.

Yuste, R. (2011) Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron* 71, 772-78

Yuste, R. and Bonhoeffer, T. (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual Reviews of Neuroscience* 24, 1071–1089

Yuste, R. and Bonhoeffer, T. (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 24-34

Yuste, R., Majewska, A. and Holthoff, K. (2000) From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nature Neuroscience* 3, 653-659

Ziv, N. E. and Smith, S. J. (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91-102

Zuo, Y., Lin, A., Chang, P. and Gan, W. (2005) Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* 46, 181–189