



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



**La separación materna temprana y la formación de las espinas dendríticas en ratones**

TESIS PARA OBTENER TÍTULO DE LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

SUSANA DEL CARMEN GORDILLO HIGAREDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. OCTAVIO CESAR GARCÍA GONZÁLEZ

REVISOR DE TESIS: LIC. OLGA ROJAS RAMOS

MÉXICO, D.F. 2014

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología del Síndrome de Down de la Facultad de Psicología, UNAM y fue apoyado parcialmente por el proyecto PAPIIT IN217211-3. Patología y plasticidad de las espinas dendríticas en el síndrome de Down. Contribución de la trombospondina – 1 (TSP-1).

A Irma López Martínez e Ivonne Sánchez Cervantes de la Facultad de Medicina por el apoyo en la realización y análisis de la tinción rápida de Golgi.

A Laura Colín-Barenque de la FES Iztacala por el apoyo en la realización y análisis de la tinción rápida de Golgi y espinas dendríticas.

A Mayra por perseguir ratones conmigo los domingos al alba.

A Rocío y a Juan José por creer que lo lograría.

A Cecilia, Angie y Fernanda por estar ahí, alimentándome en los contratiempos.

A mi madre y a mi hermana por darme la oportunidad de ser cualquier cosa que quiera.

A mi padre por estar al pendiente.

A la Dra. Cluida por todo el apoyo e impulsarme con su buen humor.

A Juan José por el optimismo.

A mis buenos profesores

A mi director de tesis Octavio García que me llevo de la mano en la escritura de este trabajo.

A Camila.

---

---

There is no substitute for hard work.

**Thomas A. Edison**

Hope is the thing with feathers  
That perches in the soul  
And sings the tune without the words  
And never stops at all.

**Emily Dickinson**

Do what you can, with what you have, where you are.

**Theodore Roosevelt**

---

---

## Abreviaturas

(A)	Adrenalina
(CA)	Catecolaminas
(CCA)	Corteza cingulada anterior
(COF)	Corteza orbitofrontal
(CP)	Corteza prefrontal
(CSS)	Corteza somatosensorial
(DPN)	Día postnatal
(GC)	Glucocorticoides
(HHA)	Hipotálamo-hipófisis-adrenal
(HACT)	Hormona adrenocorticotrópica
(HLC)	Hormona liberadora de corticotropina
(MT)	Manipulación temprana
(NA)	Noradrenalina
(PFA)	Paraformaldehído
(RG)	Receptores de glucocorticoides
(RM)	Receptores de mineralocorticoides
(SM)	Separación materna
(SNC)	Sistema Nervioso Central
(SSS)	Sistema simpato-suprarrenal

---



<b>RESUMEN .....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>- 5 -</b>
1. SEPARACIÓN MATERNA.....	- 5 -
1.1. <i>Características de la SM.....</i>	- 10 -
1.1.1. Modelos de SM en roedores.....	- 11 -
1.2. <i>Cambios neuroanatómicos relacionados con la SM .....</i>	- 13 -
2. ESPINAS DENDRÍTICAS.....	- 20 -
2.1. <i>Espinas dendríticas en la SM.....</i>	- 22 -
2.2. <i>Cambios en la densidad dendrítica debido a la SM .....</i>	- 23 -
3. JUSTIFICACIÓN.....	- 28 -
4. OBJETIVO .....	- 29 -
5. HIPÓTESIS .....	- 29 -
6. MATERIALES Y MÉTODO .....	- 30 -
6.1. <i>Sujetos.....</i>	- 30 -
6.2. <i>Material y equipo.....</i>	- 30 -
6.3. <i>Procedimiento.....</i>	- 31 -
6.4. <i>Análisis histológico.....</i>	- 34 -
6.4.1. Tinción de Golgi .....	- 34 -
6.4.2. Análisis de espinas .....	- 36 -
6.4.3. Análisis estadístico.....	- 37 -
7. RESULTADOS.....	- 39 -
7.1. <i>La SM produce una disminución del número total de espinas dendríticas en el hipocampo. ....</i>	- 39 -
7.1.1. La SM induce una disminución selectiva del total de espinas tipo hongo .....	- 41 -
7.1.2. La SM produce una disminución de espinas indiferenciadas.....	- 43 -
7.1.3. La SM produce un incremento de la formación de espinas dendríticas cortas .....	- 44 -
7.2. <i>La separación materna induce alteraciones en la arborización dendrítica.....</i>	- 47 -
7.2.1. La SM produce una disminución del largo de arborización .....	- 48 -
7.2.2. La SM no produce cambios en el ancho de arborización dendrítica.....	- 50 -
7.2.3. La SM produce una disminución significativa del ángulo de arborización .....	- 51 -
7.2.4. SM produce una disminución del área de arborización.....	- 52 -
8. DISCUSIÓN .....	- 53 -
9. LIMITACIONES .....	- 57 -
10. CONCLUSIONES .....	- 58 -
REFERENCIAS.....	- 59 -

## RESUMEN

Las experiencias aversivas y estresantes en etapas tempranas del desarrollo se han relacionado con trastornos psicológicos como ansiedad, depresión y neuropsiquiátricos como la esquizofrenia entre otros. La separación materna (SM), es un modelo animal que se usa para inducir estrés por medio de una experiencia temprana adversa en las primeras semanas de vida en roedores. La SM produce cambios conductuales y hormonales que pueden permanecer hasta la edad adulta. Periodos prolongados de estrés están relacionados con cambios en la micro y macro arquitectura del sistema nervioso central. El hipocampo es una estructura cerebral que subyace a los procesos de memoria y aprendizaje, y que modifica su morfología debido a cambios producidos por la experiencia. Pero no se conoce del todo el efecto de la SM sobre el hipocampo. En este estudio se utilizó un modelo de SM para evaluar cambios microanatómicos en el hipocampo de ratón. Separando a las crías recién nacidas de sus madres 2 horas durante los primeros 14 días postnatales (DPN), se observó que experiencias adversas como SM en etapas tempranas de desarrollo, tiene un efecto directo sobre la arborización dendrítica y la densidad de las espinas dendríticas en el hipocampo. Particularmente se encontró una disminución en las espinas dendríticas tipo hongo, espinas asociadas principalmente con procesos de memoria. Mientras que espinas cortas relacionadas con procesos de aprendizaje, y espinas indiferenciadas no tienen cambios significativos. Estos resultados sugieren que la SM tiene un efecto directo sobre la arborización y la densidad dendrítica, que puede afectar procesos como la memoria en etapas posteriores de desarrollo y permanecer hasta la edad adulta.



## INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo de los individuos, los factores ambientales y cuidados parentales, son necesarios para que el sujeto adquiriera experiencias que le permitan fortalecer su desarrollo cognitivo. Las alteraciones durante estos periodos pueden influir directamente en cambios conductuales, que podrían permanecer a lo largo de la vida.

Las experiencias que se acumulan durante la historia de vida producen cambios en la morfología de la neurona (Kolb et al., 1998). Los cambios, como el crecimiento dendrítico y alteraciones en la densidad y morfología de las espinas dendríticas, pueden asociarse con modificaciones en la estructura sináptica, alterando los circuitos neuronales involucrados en diversas funciones cognoscitivas.

El sistema nervioso central (SNC), posee una gran capacidad de cambio estructural-funcional por influencias endógenas y exógenas, las cuales pueden ocurrir en cualquier momento de la vida (Pascual-Castroviejo, 1996). El hipocampo es una estructura cerebral susceptible a la modificación debido a experiencias relacionadas con los mecanismos de la memoria y el aprendizaje, por lo que sufre cambios constantes a lo largo de la vida. Sin embargo, los mecanismos asociados a estos cambios no se conocen totalmente (Squire, 1992).

La separación materna (SM), es un modelo animal que puede ser usado como una experiencia temprana adversa que modifica distintas estructuras neuronales relacionadas con la experiencia. La SM consiste en aislar a una cría del cuidado materno y del contacto del resto de las crías de la camada (Meaney, 2001). Este

modelo animal representa una analogía de un cuidado parental deficiente. En roedores la SM afecta la generación de neuronas, la arborización dendrítica y el número de espinas en la edad adulta en la corteza cerebral (Bock et al., 2005; Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010; Ovtsharoff, Helmeke, & Braun, 2006; Takatsuru et al., 2009); sugiriendo que la experiencia aversiva en edades temprana produce cambios a largo plazo en el desarrollo del individuo (Leslie et al., 2011; Romeo et al., 2003; Takatsuru et al., 2009). Sin embargo, son pocos los estudios sobre el efecto de la SM en el hipocampo y los mecanismos asociados a éstos. Por lo tanto, en este estudio se busca determinar si la SM tiene un efecto sobre la morfología de neuronas hipocampales.

## ANTECEDENTES

### 1. Separación materna

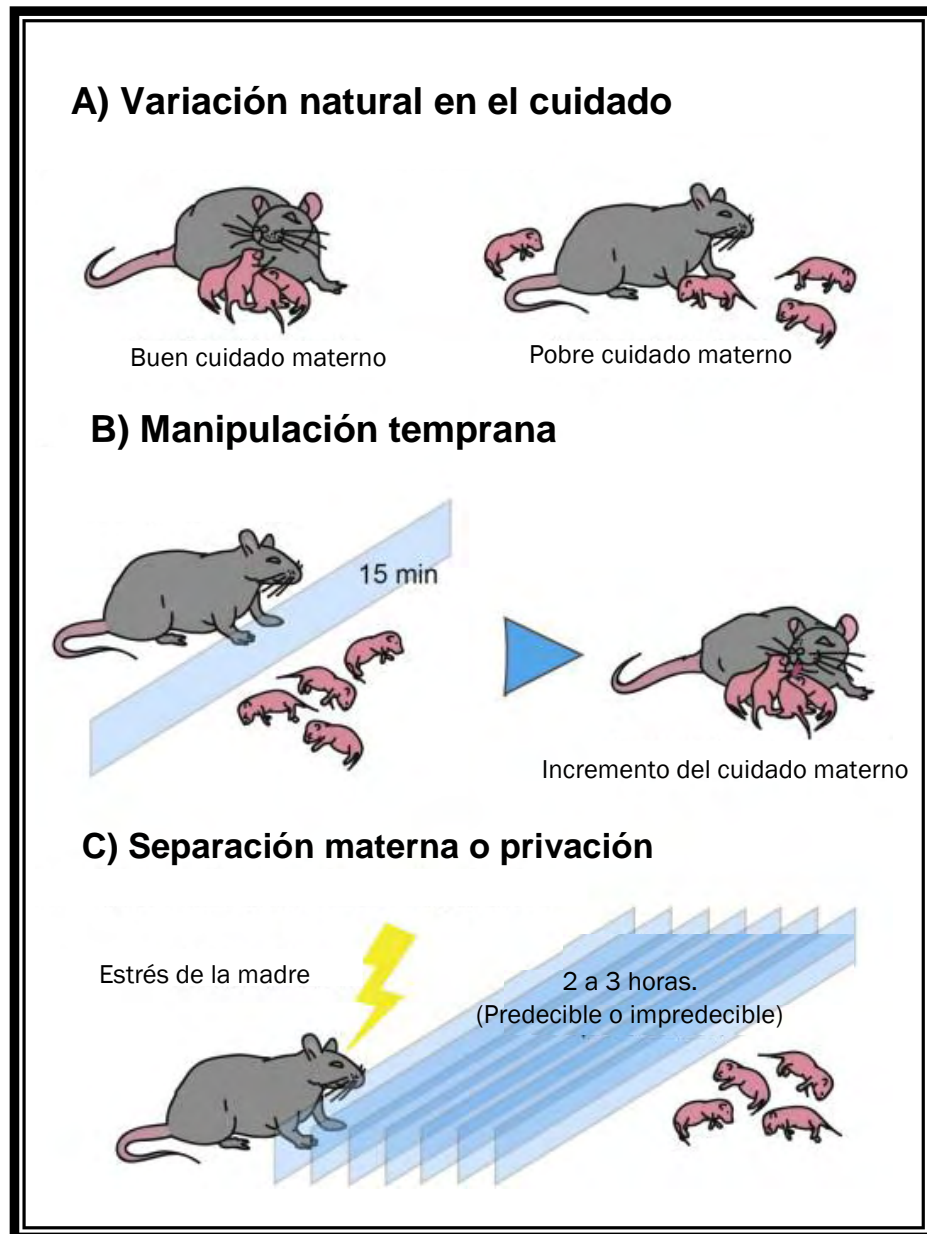
En el mamífero los primeros cuidados parentales son un factor influyente en el desarrollo fisiológico y conductual de los animales; cambios o detrimentos en esta etapa debido a estresores ambientales o deficiencia en el cuidado parental, pueden tener efectos directos en la sobrevivencia de la especie.

En humanos, no sólo la adversidad en el ambiente sino también el contexto social, emocional y económico producen cambios en la conducta de los padres (Conger et al., 1994; Eisenberg & Earls, 1975), que son determinantes en la relación padres e hijos. El cuidado parental en humanos bajo condiciones de estrés crónico asociados a dificultades económicas, las disputas maritales y una falta de compromiso social y apoyo emocional, puede generar nichos negligentes o de deficiente cuidado parental que puede afectar a los hijos en sus primeros años de vida. A su vez, es frecuente que los padres de hogares negligentes sean a su vez producto de hogares similares y/o abuso en la niñez (Miller et al., 1997). La negligencia en el cuidado durante la infancia temprana, abuso sexual o físico, o eventos traumáticos incrementan el riesgo de presentar desórdenes del estado de ánimo, afectivos o conductuales a lo largo de la vida del individuo (Daskalakis et al., 2012; Dietz & Nestler, 2012; Hulme, 2011). El aislamiento social temprano, la separación de los padres o la pérdida de los mismos puede generar que los hijos tengan una mayor predisposición desarrollar algunos

padecimientos como la depresión, trastornos de ansiedad y neuropsiquiátricos como la esquizofrenia (Kaufman et al., 2000). Por lo tanto, la relación de los padres con los hijos juega un papel muy importante en el desarrollo posterior de los sujetos (Makinodan et al., 2012; Meaney, 2001).

En roedores, las hembras primerizas muestran un despliegue de conductas estereotipadas, indicadores de conducta materna durante los diversos momentos del parto, por ejemplo: la construcción del nido antes del parto, el control durante el nacimiento jalando individualmente a las pupas del canal vaginal y limpieza de las mismas, corte del cordón umbilical, eliminación de la placenta, traslado, alimentación y protección de las crías contra depredadores (Kuhn & Schanberg, 1998). Para las hembras que se encuentran lactando, sus crías son una intensa fuente de atracción (Fleming, O'Day, & Kraemer, 1999). El cuidado materno en estas especies se determina por las conductas de aseo (*groomin*), de la madre que incluyen limpiar, lamer, mantener calientes a las crías y amamantarlas. En condiciones naturales en el reino animal, el cuidado parental en roedores puede ser de dos formas: buen cuidado materno o pobre cuidado materno (**Figura 1A**) (Daskalakis et al., 2012; Dietz & Nestler, 2012; Hulme, 2011). Un pobre cuidado materno implica una disminución de la frecuencia de conductas de aseo, limpiar, lamer, mantener calientes a las crías y dejar que las crías se dispersen, mientras que en un buen cuidado materno, la madre mantiene siempre a las crías calientes, las limpia y lame frecuentemente, las mantiene dentro del nido y amamanta con frecuencia (**Figura 1A**). El tipo de cuidado materno animal natural puede influir en cómo se modifica la conducta materna una vez que se

inserta una condición adversa, como la separar a las crías de la madre (**Figura 1B,C**) (Kuhn & Schanberg, 1998).



**Figura 1. | Paradigmas experimentales basados en cuidado materno. A)** las ratas y ratones que son madres despliegan una variación de conductas maternas. “Buen” cuidado materno (izquierda), provee un alto nivel de cuidado maternal activo como lamer y limpiar y a las pupas, proveer calor y construir el nido. “Pobre” cuidado materno (derecha) provee un menor nivel de este despliegue de conductas. Las conductas, maternas son determinantes en etapas posteriores de vida. **B)** La manipulación temprana involucra cortos periodos de 15 min de separación de la madre y las crías. Cuando se reúnen las madres proveen mas cuidados, factor que favorece la resiliencia en la edad adulta. **C)** la SM o paradigmas de privación involucran periodos más largos de separación, clásicamente de 2 a 24 horas por una sesión (1 x 24 hr, “de privación”), o diariamente durante las primeras semanas postnatales (“separación crónica”). La separación puede ser predecible (a la misma hora todos los días) o impredecible y puede ser combinada con el estrés materno. La separación de la madre o la privación perturba la continuidad de la atención materna y causa estrés a las crías que pueden afectar sus conductas a lo largo de la vida (Tomado y modificado de Franklin, Saab & Mansuy, 2012).

En roedores, las primeras dos semanas de vida son fundamentales para el desarrollo posterior del neonato. Las crías nacen sin el sentido del oído y la vista, por lo que dependen totalmente de su madre para regular su temperatura y alimentarse. Los primeros días después del parto, la madre pasa mucho tiempo lamiendo a las crías, alimentándolas y siendo la principal fuente de calor. Conforme avanzan los días, la madre va pasando cada vez menos tiempo en el nido, dejando paulatinamente a las crías cada vez más tiempo solas. Durante éstos primeros días, cuando una cría es separada de su madre, comienza a emitir sonidos ultrasónicos con la finalidad de llamarla, la madre se ve intensamente atraída por el llamado. El impedimento para atender el llamado de una cría es una experiencia adversa, tanto para la madre como para la cría (Kuhn & Schanberg, 1998).

Así como los cambios en el cuidado materno pueden variar naturalmente debido a la variabilidad individual de la maternidad, también se pueden inducir cambios en forma experimental mediante la manipulación en modelos animales, principalmente en roedores. Algunos ejemplos de estos modelos son: 1) manipulación temprana (MT), es un paradigma simple que consiste en someter a las crías a periodos cortos (5-15 min) de separación de su madre durante las primeras semanas de vida (**Figura 1B**). Este modelo reduce la capacidad de respuesta general de estrés y favorece un aumento rápido y retorno a la línea de base de los glucocorticoides (Cirulli, Berry & Alleva, 2003). Tal respuesta de adaptación rápida minimiza el riesgo de daños en el sistema nervioso, reduce la ansiedad y mejora la actividad exploratoria a través de la vida (Núñez et al, 1997; Weinberg, Smotherman & Levine, 1978). 2) En contraste con el modelo de MT, la SM implica largos períodos de separación de las crías de la madre. La SM puede

interferir constantemente con las respuestas neuroquímicas, hormonales y de comportamiento durante las primeras semanas postnatales e inducir vulnerabilidad al estrés (**Figura 1C**) (Franklin, Saab & Mansuy, 2012).

### **1.1. Características de la SM**

La separación materna (SM) neonatal (ver figura **1C**), es un modelo experimental de estrés en etapas tempranas del desarrollo en roedores (ratas y ratones), que se usa para estudiar los efectos neuroendocrinos y conductuales del estrés, condiciones adversas en las primeras etapas de vida y como analogía del mal cuidado parental en mamíferos (Tata, 2012). La SM consiste en separar a una cría de roedor del cuidado materno y del contacto del resto de las crías de la camada, por algunas horas al día durante las dos primeras semanas de vida. La SM en roedores permite controlar un aislamiento físico y social, privándolos del contacto con la madre y los hermanos y seguir su desarrollo a lo largo del tiempo (Meaney, 2001).

Existen varios modelos de SM dependiendo de las condiciones en donde se han visto diversos efectos adversos conductuales y cambios en la morfología neuronal. Cada uno de los modelos de SM varían en función de: 1) tiempo de privación, desde 15 minutos de privación hasta varias horas, se ha visto que a mayor tiempo de separación de la madre mayor es la ocurrencia de efectos adversos a corto y largo plazo (Boccia & Pedersen, 2001); 2) contacto con los hermanos; este punto tiene diversas variantes que dependen el diseño de la incubadora y el lugar donde se coloquen las crías



durante la privación, por ejemplo: A) aislamiento olfativo, táctil, visual y auditivo, si la incubadora se encuentra en otra habitación separada por barreras físicas como paredes que no permiten el paso de sonidos u olores; B) aislamiento táctil y visual, si las crías se encuentran en una sola incubadora dividida en pequeños compartimientos para cada cría, dejando pasar señales olfativas y auditivas de sus hermanos; 3) la estancia de la madre, se puede dejar en la jaula de alojamiento diario con las crías que no se van a utilizar en procedimiento experimental o dejar a la madre completamente aislada (Arborelius & Eklund 2007; Boccia & Pedersen, 2001).

### **1.1.1. Modelos de SM en roedores**

Como mencionamos anteriormente la SM temprana en ratones consiste en privar a la cría recién nacida del contacto materno, tanto olfativo, como táctil, visual y auditivo retirando a la cría de su madre por un tiempo establecido. A partir del nacimiento comienzan a contarse los días postnatales (DPN). El día del nacimiento se cuenta como el DPN 0. La separación comienza a partir del DPN 1 hasta el DPN 14, dejándolos con la madre hasta el DPN 22, día del destete. Por ejemplo, Bock et al., (2005), separan individualmente durante una hora diaria a cada cría colocándolas en una incubadora para controlar la temperatura y humedad. Durante el aislamiento, no hay contacto visual o táctil, sólo contacto auditivo y olfativo con las demás crías de la camada. Para la madre solo hay paso de señales auditivas de las crías y por lo que aumenta la experiencia aversiva al no poder acudir al llamado.

La manipulación de estas variables es importante ya que a esta edad el ratón es completamente dependiente de la madre y el contacto físico es vital para el bienestar de las crías. También es importante dejar a la madre completamente aislada para que todas las crías y la madre estén bajo la misma condición aversiva sin importar su sexo, aún cuando sólo se utilicen los ratones macho para la cuantificación de resultados.

Los modelos de SM se han usado para inducir conductas relacionadas con depresión, ansiedad y también como una respuesta de mayor actividad del eje hipotálamo hipofisario durante el estrés en la edad adulta (Meaney, 2001; Plotsky & Meaney 1993; Pryce & Feldon 2003). Por ejemplo: La exposición de individuos a los diferentes factores de estrés activa el sistema simpato-suprarrenal (SSS) y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), lo que resulta en un aumento simultáneo de los niveles de catecolaminas (CA) liberados del SSS y hormona liberadora de corticotropina (HLC), hormona adrenocorticotrópica (HACT) y glucocorticoides (GC), liberado del eje HPA (Kvetnansky et al., 1995). Cantidades excesivas y continuas de los GC pueden ser perjudiciales para el organismo, el eje HHA está bajo regulación estricta por retroalimentación negativa, a través de los receptores de mineralocorticoides (MR) y receptores de glucocorticoides (GR) ubicados en diferentes regiones del cerebro (De Kloet et al., 1998). El hipocampo, junto con los núcleos amigdalinos y otras estructuras del cerebro, controlan la actividad del eje HPA (Herman & Cullinan, 1997), en la que a su vez, regula la actividad del SSS por la liberación de los GC y CRH (Peñalva et al., 2002).

La SM puede afectar también el aprendizaje y la memoria en la edad adulta (Wang, Jiao, & Dulawa, 2011). Por ejemplo, se ve afectada la extinción del condicionamiento clásico de parpadeo (Wilber, Southwood, & Wellman, 2009), hay un peor desempeño en el laberinto acuático de Morris (Huot et al., 2001), y dificultad para realizar tareas de reconocimiento de objetos novedosos (Aisa et al., 2007; Grace et al., 2009).

Algunas investigaciones sugieren que el tiempo de separación es un factor determinante en los efectos a largo plazo en sujetos sometidos al paradigma de SM (Anand et al., 2000; Bock et al., 2005).

Por todo esto, el modelo de SM puede ser usado como un modelo experimental de condiciones adversas en etapas tempranas del desarrollo; y para tratar de entender la predisposición a diversos trastornos psicológicos que prevalecen en la edad adulta en los trastornos del ánimo, como la depresión, trastorno de ansiedad y neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, relacionados con experiencias adversas y cuidados maternos deficientes a edades tempranas de desarrollo.

## **1.2. Cambios neuroanatómicos relacionados con la SM**

La experiencia temprana altera la organización estructural del sistema nervioso central (SNC). Estos cambios que se dan tanto en neuronas como en células gliales pueden producir cambios en el comportamiento, por ejemplo, en aves y roedores recién nacidos que son sometidos a experiencias con carga emocional, ya sean positivas o negativas, alteran la conectividad sináptica en regiones límbicas, por lo que el

desarrollo sináptico de éstas regiones son sensibles a las condiciones ambientales, en particular a experiencias con contenido emocional (Bock et al., 2005).

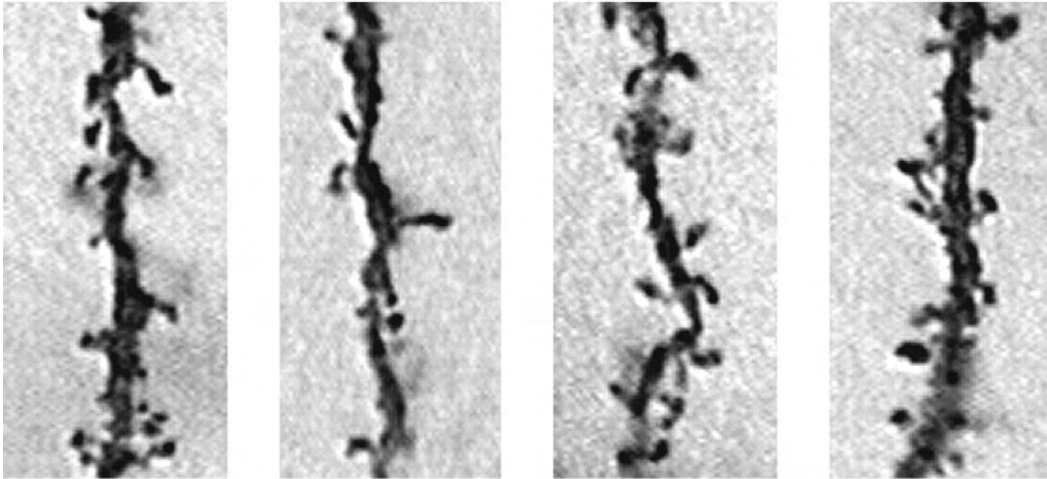
A nivel del SNC, durante los primeros 14 días de vida del ratón ocurre el principal desarrollo de las neuronas, los axones y las dendritas. También ocurre la poda neural, crecimiento general de la materia gris, un incremento en ácidos nucleicos, lípidos y colinesterasas (Fox, 1965). Después de éstos 14 días hasta el día 22 postnatal, ocurre una rápida mielinización y, a nivel autónomo, el ratón logra mantener su temperatura corporal (Fox, 1965).

En general, se relaciona una larga extensión dendrítica con una mayor eficacia en la conectividad de las redes neuronales y un mayor número de espinas dendríticas con una neurotransmisión más eficiente en la sinapsis. Los animales con mayor crecimiento dendrítico en relación con los animales control tienen un mejor rendimiento en tareas cognitivas (Tronel et al., 2010). Los efectos de la experiencia pueden variar tanto cualitativa como cuantitativamente con la edad en mamíferos. Por ejemplo, experiencias enriquecidas (condición experimental donde se provee al roedor de un ambiente rico y variado), durante el periodo postnatal no tienen un efecto medible en la longitud dendrítica, pero parecen tener un efecto en la densidad de espinas dendríticas. Experiencias similares en un periodo más avanzado de la vida, produce un aumento tanto en la longitud dendrítica como en la densidad de espinas dendríticas. Este cúmulo de experiencias puede influir en la edad adulta, aunque, se desconoce cómo distintas experiencias, en diferentes momentos de la vida de un sujeto, pueden

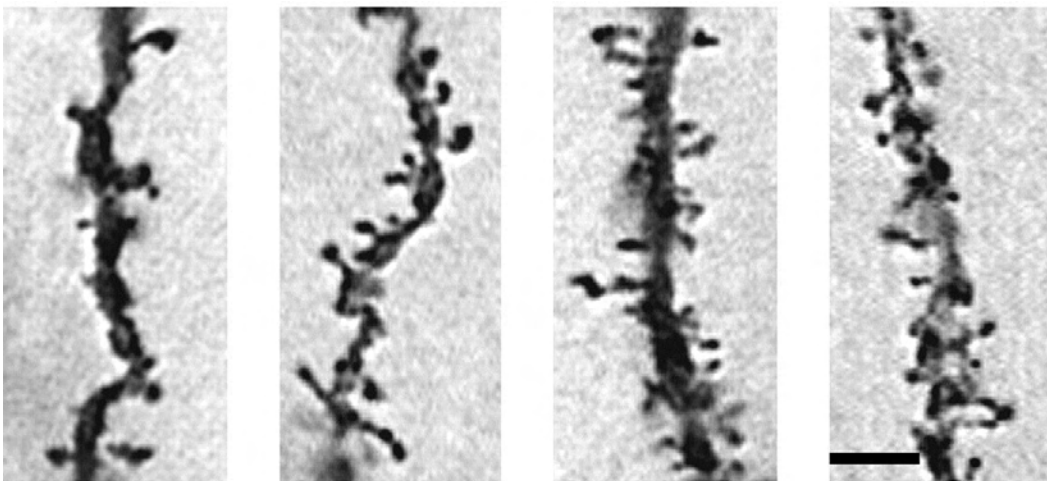
cambiar la manera en la que influyen en la adultez, y en qué medida la ausencia de una experiencia en particular puede ser compensada más adelante en la vida del sujeto (Kolb et al., 1998).

En el caso de la SM, se ha visto que ratones aislados durante dos semanas inmediatamente después del destete tienen alteraciones en la función de la corteza prefrontal, con un peor desempeño en comparación con ratones controles, en tareas de interacción social y memoria de trabajo; y alteraciones en la mielinización que no se recuperan con la reintroducción al entorno social (Makinodan et al., 2012). Además, una SM temprana en ratas, en las primeras cuatro semanas de vida, afecta la generación de neuronas, la arborización dendrítica y la densidad de las espinas dendríticas en la corteza cingulada anterior (CCA) y corteza somatosensorial (CSS) que se puede mantener hasta la edad adulta (**Figura 2**) (Bock et al., 2005; Leslie et al., 2011; Takatsuru et al., 2009), sugiriendo que la experiencia aversiva en edades temprana produce cambios a largo plazo en el desarrollo del individuo.

## CCA



## CSS



**Control**

**SM 1-3**

**SM 5-7**

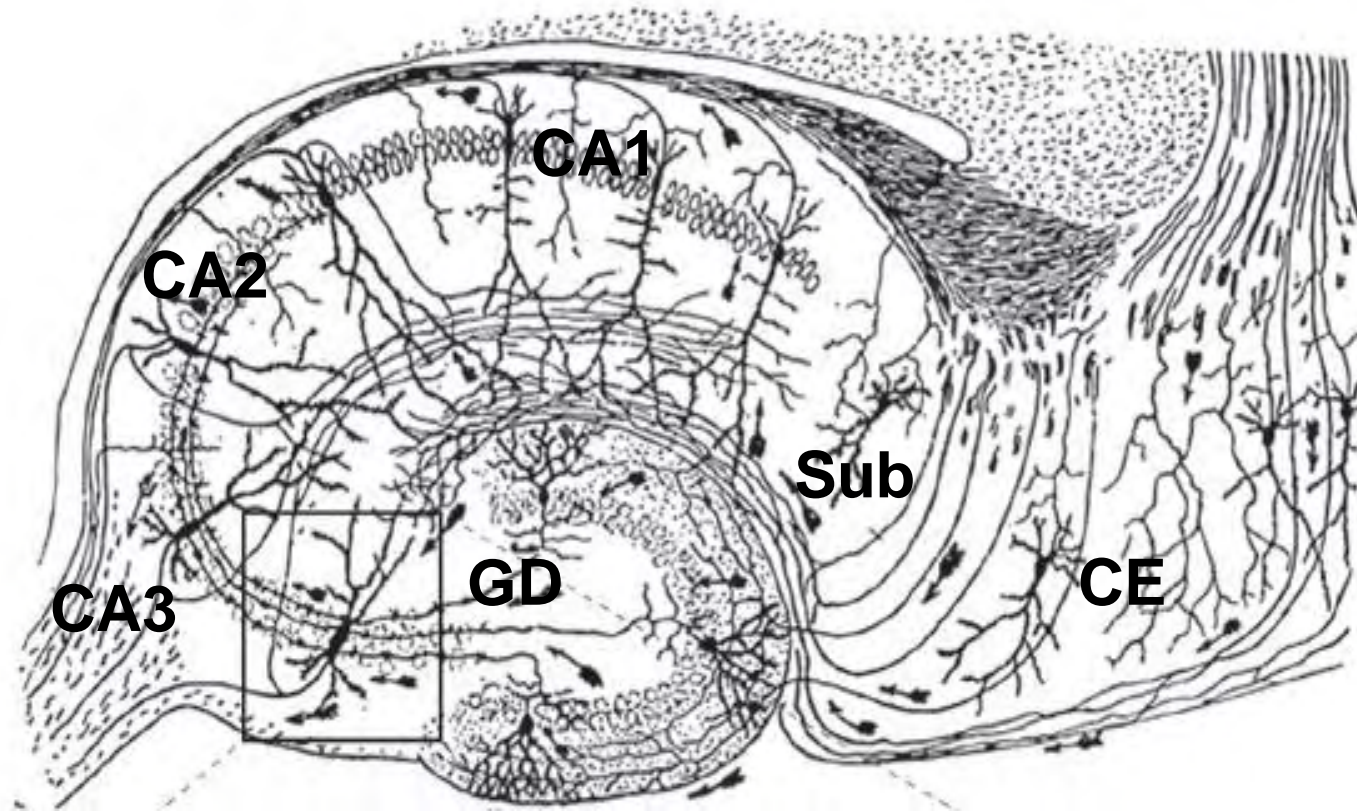
**SM 14-16**

**Figura 2. | Efecto de la SM en la corteza cerebral. La imagen muestra fotos representativas de los segmentos de dendritas basales teñidos con la técnica de Golgi. La fila superior muestra los segmentos de dendritas de la corteza cingulada anterior (CCA), se puede observar una disminución en la densidad dendrítica en los periodos de 1-3 DPN y 5-7 DPN debido a la SM y un aumento en la densidad dendrítica en el periodo de 14-16 DPN. La fila inferior muestra segmentos en dendrita la corteza somatosensorial (CSS), se puede observar una disminución en la densidad dendrítica en el periodo de 1-3 DPN y un aumento en la densidad dendrítica en los periodos de 5-7 DPN y 14-16 DPN. Escala gráfica, 5 micras. Tomado de Bock et al., (2005)**

A pesar de éstos resultados, los estudios sobre el efecto de la SM en otras estructuras cerebrales como el hipocampo han recibido poca atención.

El hipocampo es una invaginación del giro parahipocampal localizado en el cuerno inferior del ventrículo lateral y consta de tres regiones: los cuernos de Ammon, el giro dentado y el subínculo.

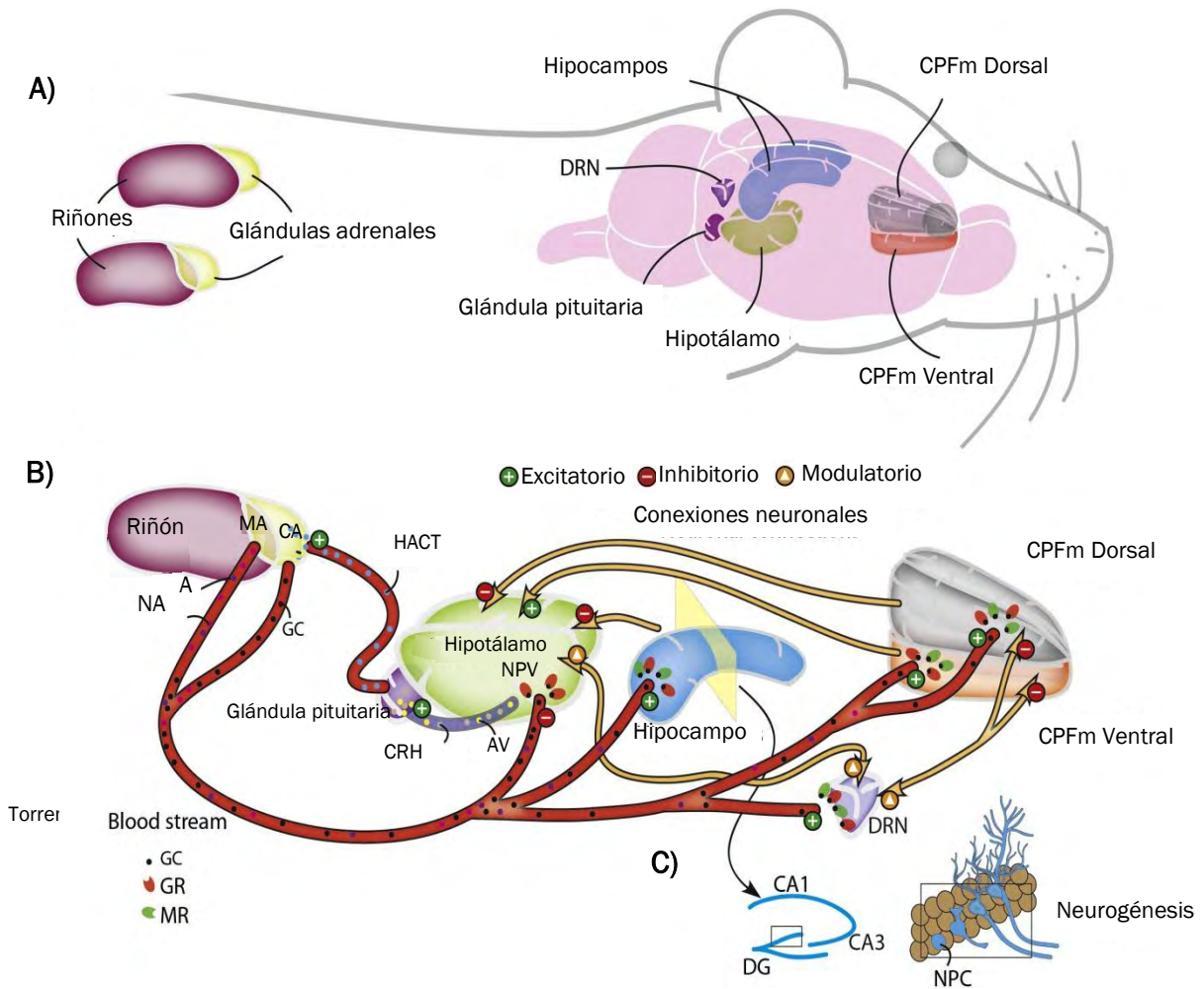
Cada región hipocampal tiene a su distintos tipos de neuronas: células piramidales (en los cuernos de Ammon, CA1,2 y 3), células granulares (en el giro dentado), células intrínsecas (células polimorfas, células de canasta), interneuronas GABAérgicas y células musgosas (**Figura 3**). El hipocampo subyace en procesos emocionales así como en procesos de aprendizaje, motivación y memoria. Las alteraciones de la memoria, el aprendizaje y los trastornos del estado de ánimo forman parte del cuadro clínico de la psicopatología relacionada con las alteraciones de los procesos estresantes. El hipocampo tiene una gran concentración de receptores a glucocorticoides y también tiene receptores a mineralocorticoides que contienen una enzima que metaboliza el cortisol. La respuesta del hipocampo a situaciones de estrés y emocionales podría deberse a la respuesta integradora de procesos neurohormonales que implican un efecto inhibitor de los glucocorticoides sobre el eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (HHA) (**Figura 4**)



**Figura 3. | Hipocampo.** La imagen representa un corte coronal del hipocampo marcando las diferentes regiones del: **GD** Giro dentado; **CA** Cuerno de amon, dividido en CA1, CA2 y CA3; **Sub** subínculo; **CE** corteza entorrinal.

(Tomado y modificado de Nicoll & Schmitz, 2005)

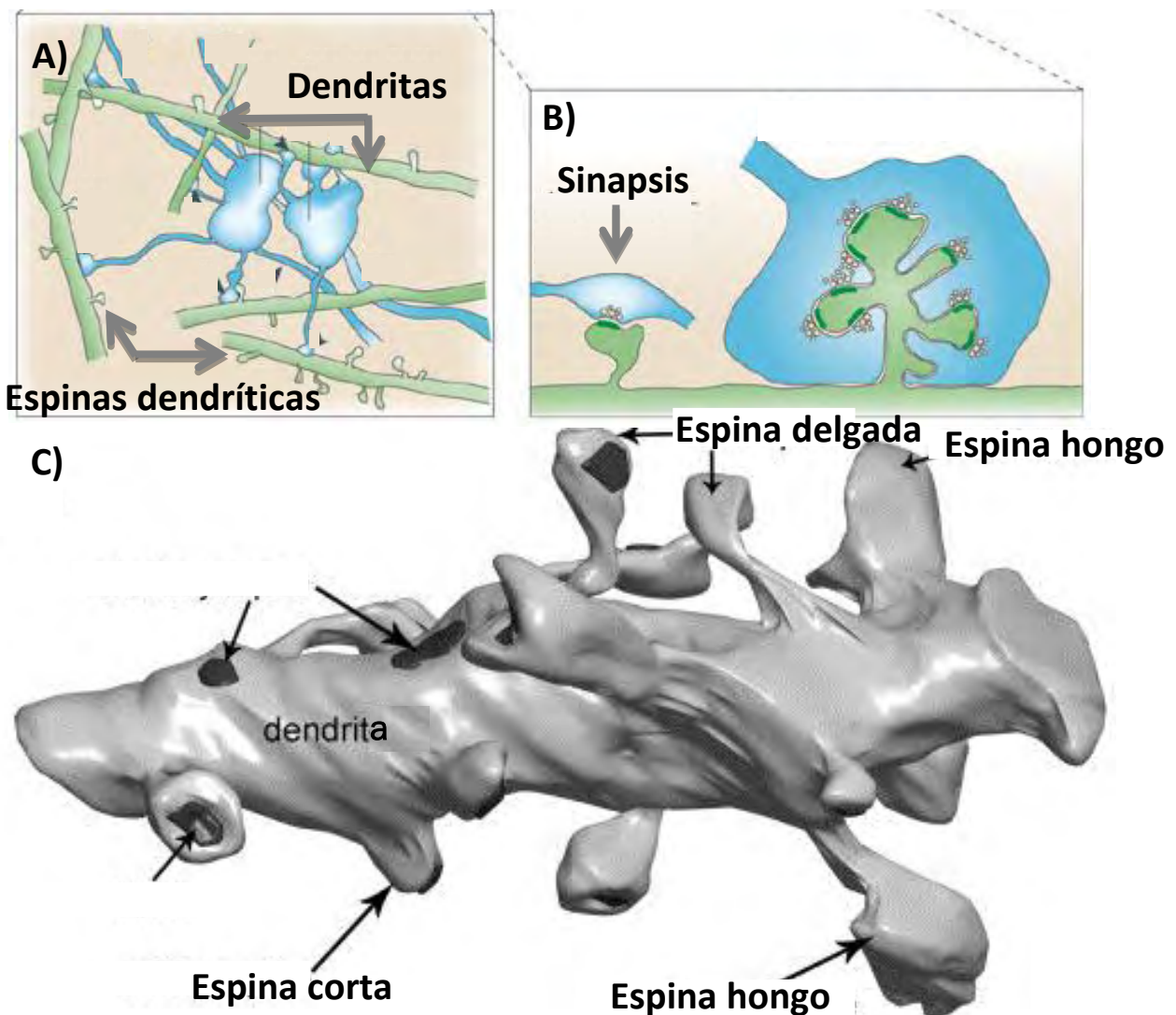




**Figura 4. | Disposición anatómica y funcional del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (HHA) y estructuras asociadas en rata** (A) los principales componentes del eje HHA y estructuras cerebrales asociadas. (B) conexiones entre el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas suprarrenales con el eje HHA, y el hipocampo, corteza prefrontal medial y núcleo dorsal del rafé (NDR). La activación del eje HHA se inicia por la estimulación de las neuronas en la región parvocelular medial del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo y la secreción de hormona liberadora de corticotropina (HLC) y arginina vasopresina (AVP) que amplifica el efecto de la CRH, en la vena porta. La glándula pituitaria segrega la hormona adrenocorticotrópica (HACT), iniciando la liberación de los glucocorticoides (GC) a partir de la corteza suprarrenal (CA), y adrenalina (A) y noradrenalina (NA) a partir de la médula suprarrenal (MA) en el torrente sanguíneo. Esta cascada es transitoria, y después de la terminación o la eliminación del estímulo, el eje HHA vuelve a un estado inicial por la acción de varios bucles de retroalimentación negativa. En estos bucles, GC actúan directamente para apagar la respuesta de la hipófisis y el hipotálamo, y la liberación de CRH a continuación, HACT, e indirectamente mediante la activación de los receptores de glucocorticoides (GRs) en el hipocampo y la corteza frontal, que se proyectan de nuevo al hipotálamo. Los GC también activan los receptores de mineralocorticoides (MRs), y la acción coordinada de los GRs y la MRs regulan la respuesta al estrés. El hipotálamo y el córtex prefrontal medial tienen proyecciones recíprocas con NDR. La neurogénesis ocurre en el giro dentado y los rendimientos nuevas neuronas a partir de células progenitoras neuronales (CPN). Los signos más y menos indican la regulación positiva y negativa, respectivamente; los triángulos indican que la modulación puede ser inhibitoria o excitadora. (Tomado y modificado de Franklin, Saab & Mansuy, 2012)

## 2. Espinas dendríticas

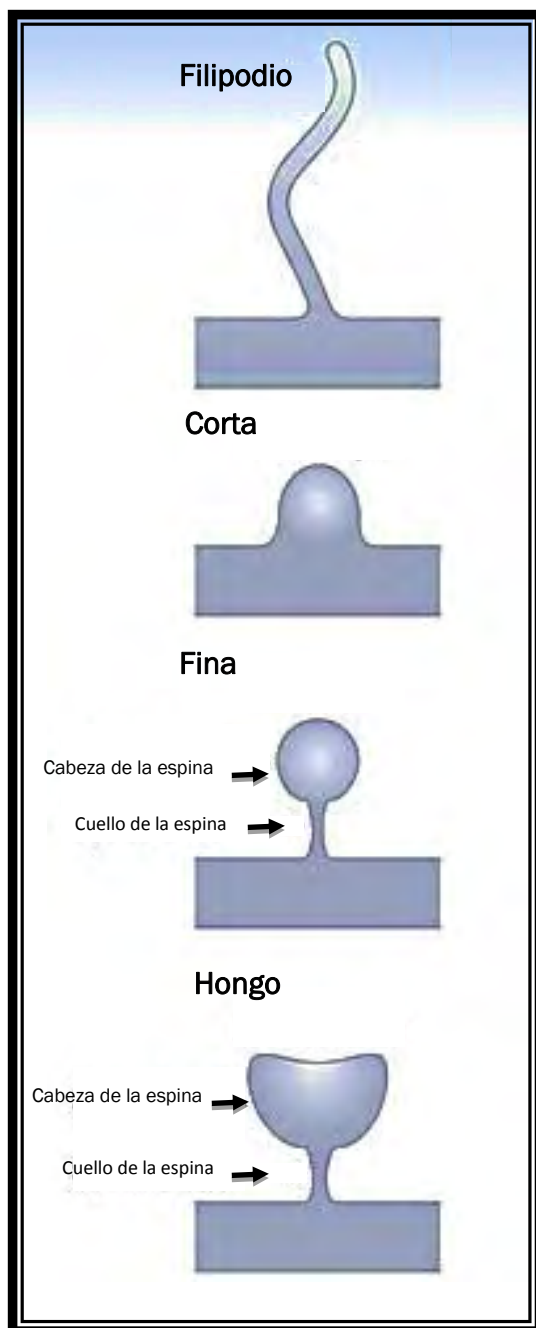
La mayoría de las sinapsis excitadoras que ocurren en el cerebro de los mamíferos maduros se producen en las espinas dendríticas (Hering & Sheng, 2001). Las espinas dendríticas son especializaciones morfológicas que sobresalen del eje principal de las dendritas neuronales (**Figura 5**).



**Figura 5. | Espinas dendríticas.** El panel **A)** Se muestra la composición del hipocampo por dendritas donde se encuentran las espinas dendríticas. **B)** Se muestra una sinapsis de una espina dendrítica. (Tomado y modificado de Nicoll & Schmitz, 2005). **C)** muestra un segmento de la dendrita y la morfología de tres tipos de espinas: corta, delgada y hongo. (Tomado y modificado de Medvedev et al., 2010).

Normalmente las espinas miden 0.5-2  $\mu\text{m}$  de largo, pero pueden llegar a medir hasta 6  $\mu\text{m}$  en la región CA3 del hipocampo (Chicurel & Harris 2004; Harris & Kater 1994). En neuronas maduras las espinas dendríticas se encuentran en una densidad lineal de 1-10 espinas por  $\mu\text{m}$  de longitud en la dendrita (Sorra & Harris 2000). Las espinas dendríticas representan el principal compartimiento unitario postsináptico excitatorio (Hering & Sheng, 2001). Múltiples estudios en diferentes sistemas han demostrado que estas estructuras son bastante sensibles al desarrollo, la experiencia y la plasticidad sináptica inducida farmacológicamente (Bock & Braun, 1999; Goldin, Segal & Avignone, 2001; Segal, 2002; Lieshoff & Bischof, 2003).

Las espinas dendríticas tienen una amplia variedad de formas y tamaños. Estudios anatómicos en tejido cerebral fijo, han permitido tener una clasificación general de las espinas de acuerdo a su estructura, siendo las formas fina (thin), corta (stubby), hongo (mushroom) y en forma de copa (cup-shaped) las más



**Figura 6. | Organización estructural de las espinas dendríticas.** Tomado de Rochefort & Konnerth (2012)

comunes (Chang & Greenough 1984; Harris, Jensen & Tsao 1992). (**Figura 6**) Las espinas son muy dinámicas, cambian de tamaño y de forma en escalas de tiempo de segundos a minutos y de horas o días y pueden mantenerse a largo de la vida (Parnass, Tashiro, & Yuste, 2000), sugiriendo un papel importante de estas estructuras en la plasticidad sináptica (Calverley & Jones 1990).

### **2.1. Espinas dendríticas en la SM**

Como mencionamos anteriormente, la SM produce cambios en la densidad de las espinas dendríticas en la corteza cerebral. Sin embargo, los mecanismos involucrados en este proceso y su efecto sobre otras estructuras cerebrales, como el hipocampo, no se conocen completamente. Son pocos los estudios que buscan encontrar cambios en las espinas dendríticas debido a la SM. La mayoría de los estudios son hechos en corteza prefrontal (CPF) (Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010; Muhammad & Kolb, 2011), corteza orbitofrontal (COF) (Muhammad & Kolb, 2011), corteza somatosensorial (CSS) (Bock et al., 2005; Poeggel et al., 2003) corteza cingulada anterior (CCA) (Bock et al., 2005; Helmeke, Poeggel & Braun, 2001; Ovtcharoff, Helmeke, & Braun, 2006; Poeggel et al., 2003), núcleo accumbens (NA) (Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010; Muhammad & Kolb, 2011), amígdala (Poeggel et al., 2003). Solamente un trabajo se ha reportado en hipocampo en ratas (Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010) y un trabajo en otros roedores (Poeggel et al., 2003).

## 2.2. Cambios en la densidad dendrítica debido a la SM

Los trabajos relacionados con espinas dendríticas y SM han demostrado distintos resultados. En CPF de rata se ha reportado que la SM disminuye el número total de espinas dendríticas (Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010). Esta disminución puede ser revertida por la presencia de anfetaminas en la edad adulta. También se ha visto un aumento de la densidad dendrítica en COF (Muhammad & Kolb, 2011). En un modelo de SM en ratas con un periodo de separación del DPN 1 al día DPN 3 durante 1 hora, se encontró una disminución en la densidad de espinas dendríticas de neuronas apicales y basales en la CCA, así como también una disminución del largo de las dendritas (Bock, et al 2005). Sin embargo, en un modelo donde interactúan ambos padres en el cuidado de las crías, con el ratón cola de trompeta (*Octodon degus*), se encontró un aumento en la densidad dendrítica en neuronas basales separando a las crías sólo del padre (Helmeke, Poeggel & Braun, 2001), basales y apicales separando a las crías de ambos padres (Poeggel et al., 2003) y no se encontraron cambios en el largo de las dendritas. (Helmeke, Poeggel & Braun, 2001; Poeggel et al., 2003). En la CSS se encontró un incremento de espinas dendríticas en rata (Bock, et al 2005) y en el *octodon degus* no se encontraron diferencias en la densidad dendrítica, aunque se encontró una mayor densidad en dendritas de 1° orden (Poeggel et al., 2003). En el NA se ha reportado una disminución del número de espinas dendríticas en ratas (Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010) y en el *octodon degus* (Ovtscharoff, Helmeke, & Braun, 2006) así como una reducción del largo de las dendritas (Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010). Se ha visto que

en la amígdala hay una disminución del número de espinas dendríticas en el *octodon degus* (Poeggel et al., 2003). Sugiriendo que la SM puede tener un efecto diferente entre las especies, entre otros efectos colaterales (**Tabla 1**).

**Tabla 1 | Estudios sobre SM y espinas dendríticas en la corteza**

Corteza	Modelo animal	DPN de SM / tiempo de separación	Edad DPN	Efecto en las espinas dendríticas	Referencia	
CPF	Ratas ♂♀	1 – 12/2h	Pre-pubertad 35	↓↑ sin cambios	Monroy, Hernández-	
			Post-pubertad 60	↓ número total de espinas en neuronas piramidales	Torres & Flores, 2010	
COF	Ratas ♂♀	1 – 21/3h	Adulto 80	↑ número total de espinas en neuronas piramidales	Muhammad & Kolb, 2011	
			Adulto 80	↑ número total de espinas en neuronas basilares	Muhammad & Kolb, 2011	
CSS	Ratas ♂	1 – 3/1h		↑ densidad dendrítica en dendritas apicales y basales	Bock, et al 2005	
		5 -7/1h				
CCA	Ratón <i>Octodon degus</i> ♂	1 – 21/1h (separación de ambos padres)	Pre-pubertad 21	↓↑ sin cambios	Poeggel et al., 2003	
		Ratas ♂	1 – 3/1h		↓ densidad dendrítica en dendritas apicales y basales	Bock, et al 2005
14 – 16/1h	↑ densidad dendrítica en dendritas basales					
CCA	Ratón <i>Octodon degus</i> ♂♀	1 – 21/1h (separación de ambos padres)		↑ densidad dendrítica en dendritas basales	Helmeke, Poeggel & Braun, 2001	
		0 – 21/24h (separación del padre)		Pre-pubertad 21	↓ densidad dendrítica en dendritas apicales	Ovtscharoff, Helmeke, & Braun, 2006
		1 – 21/1h (separación de ambos padres)		Pre-pubertad 21	↑ densidad dendrítica en dendritas apicales y basales	Poeggel et al., 2003

Resumen de los trabajos relacionados con modelos de SM y espinas dendríticas en corteza.

Estudios en hipocampo de ratas se ha demostrado que la SM produce una disminución en el número de espinas dendríticas en la región CA1 (Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010), aunque en el ratón *octodon degus* se encontró un aumento en la densidad de espinas dendríticas en la misma región y una disminución de la densidad en la región del giro dentado (Poeggel et al., 2003). También se ha visto una disminución en el largo de todas las dendritas (Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010; Poeggel et al., 2003). (Tabla 2)

**Tabla 2 | Estudios sobre SM y espinas dendríticas en otras estructuras cerebrales**

Otras estructuras	Modelo animal	DPN de SM / tiempo de separación	Edad DPN	Efecto en las espinas dendríticas	Referencia
NA	Ratas ♂♀	1 – 12/2h	Pre-pubertad 35	↓ numero total de espinas en neuronas espinosas	Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010
			Post-pubertad 60	↓ numero total de espinas en neuronas espinosas	
	Ratas ♂♀	1 – 21/3h	Adulto 80	↑ densidad de espinas dendríticas	Muhammad & Kolb, 2011
Amígdala	Ratón <i>Octodon degus</i> ♂	1 – 21/1h (separación de ambos padres)	Pre-pubertad 21	↓ densidad dendrítica en dendritas apicales y basales	Poeggel et al., 2003
Hipocampo	Ratas ♂♀	1 – 12/2h	Pre-pubertad 35	↓↑ sin cambios	Monroy, Hernández-Torres & Flores, 2010
			Post-pubertad 60	↓ número total de espinas en neuronas piramidales	
	Ratón <i>Octodon degus</i> ♂	1 – 21/1h (separación de ambos padres)	Pre-pubertad 21	↑ densidad dendrítica en dendritas apicales y basales ↓ densidad dendrítica neuronas granulares del giro dentado	Poeggel et al., 2003

Resumen de los trabajos relacionados con modelos de SM y espinas dendríticas en otras estructuras cerebrales.



No se han reportado diferencias significativas de peso y talla en ratas al término de la separación materna a los 14 DPN en comparación con los grupos control (Biagini, Pich, Carani, Marrama, & Agnati, 1998; Ploj, Roman & Nylander, 2003; Soderholm, Yates, Gareau, Yang, MacQueen, & Perdue, 2002), pero las medidas de peso en la edad adulta muestran una baja significativa en los grupos de SM en comparación con los grupos control (Soderholm, Yates, Gareau, Yang, MacQueen, & Perdue, 2002). En ningún estudio se han encontrado cambios en el peso del cerebro debido a la SM (Bock, et al 2005; Helmeke, Poeggel & Braun, 2001; Ovtcharoff, Helmeke, & Braun, 2006), lo que sugiere un efecto principal en la arquitectura neuronal, afectando principalmente las conexiones y redes neuronales sin afectar la masa total de la materia gris. Los efectos tan variados que se presentan en los distintos estudios pueden deberse a los distintos animales que se utilizan como modelo experimental, las diferencias entre las especies de ratones puede influir en la variabilidad de los efectos de la SM.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la SM se ha asociado con el desarrollo posterior de trastornos que afectan a un gran número de la población mundial como la depresión y trastornos de ansiedad, develar los mecanismos que se encuentran detrás de los cambios morfológicos es muy importante. Se sabe que hay cambios morfológicos asociados a la SM particularmente en corteza prefrontal y somatosensorial, que permanecen hasta la edad adulta, pero no se ha profundizado el papel de la SM en el hipocampo, estructura relacionada con procesos de aprendizaje y memoria, así como los mecanismos involucrados en estos cambios morfológicos.

En este estudio se busca determinar como la SM modifica la morfología y la generación de espinas dendríticas en el hipocampo en ratones de la cepa CB57BL6/J.

## **4. OBJETIVO**

### **Objetivo general**

- Conocer si la SM afecta el desarrollo normal de las dendritas y espinas dendríticas hipocámpales en ratones machos.

### **Objetivo específico**

- Conocer si la SM afecta la morfología de las espinas dendríticas de neuronas hipocámpales de la región CA1 en ratones machos.
- Conocer si la SM disminuye la densidad de las espinas dendríticas de neuronas hipocámpales de la región CA1 en ratones machos
- Conocer si la SM afecta la arborización dendrítica de neuronas hipocámpales de la región CA1 en ratones machos.

## **5. HIPÓTESIS**

### **Hipótesis general**

- La SM tendrá un efecto en el desarrollo normal de las dendritas y espinas dendríticas hipocámpales en ratones machos.

### **Hipótesis específicas**

- La SM afectará la morfología de las espinas dendríticas del hipocampo en ratones machos.
- La SM disminuirá la densidad de las espinas dendríticas del hipocampo en ratones machos.

- La SM afectará la arborización dendrítica del hipocampo en ratones machos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODO

### 6.1. Sujetos

Se utilizaron crías de ratones machos de la cepa C57BL/6J. La fecha de nacimiento, fue designada como día postnatal cero (DPN 0), después del nacimiento 18 ratones (9 control y 9 experimental asignados de forma aleatoria), fueron separados y usados para el protocolo de SM. Los sujetos se mantuvieron en ciclo de luz/oscuridad (12:12 h) con las luces encendidas a las 07:00 horas, a temperatura y humedad constantes. Los roedores tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento. Todos los procedimientos de manipulación y cuidado de los ratones siguieron las recomendaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-06-200.1999, procurando siempre minimizar el sufrimiento animal.

### 6.2. Material y equipo

#### ✓ Para las incubadoras

- Caja comunal de rata previamente lavada y desinfectada con alcohol
- Pliego de vinil grueso oscuro para hacer compartimientos individuales
- Aserrín limpio

- Termómetro
- Cojín térmico
- Palos de madera de 20 cm de largo y 2 cm de diámetro
  - Termómetro

✓ **Para el procedimiento experimental**

- Guantes de látex
- Cronómetro
- Alcohol o gel antibacterial

### **6.3. Procedimiento**

#### Grupo de SM

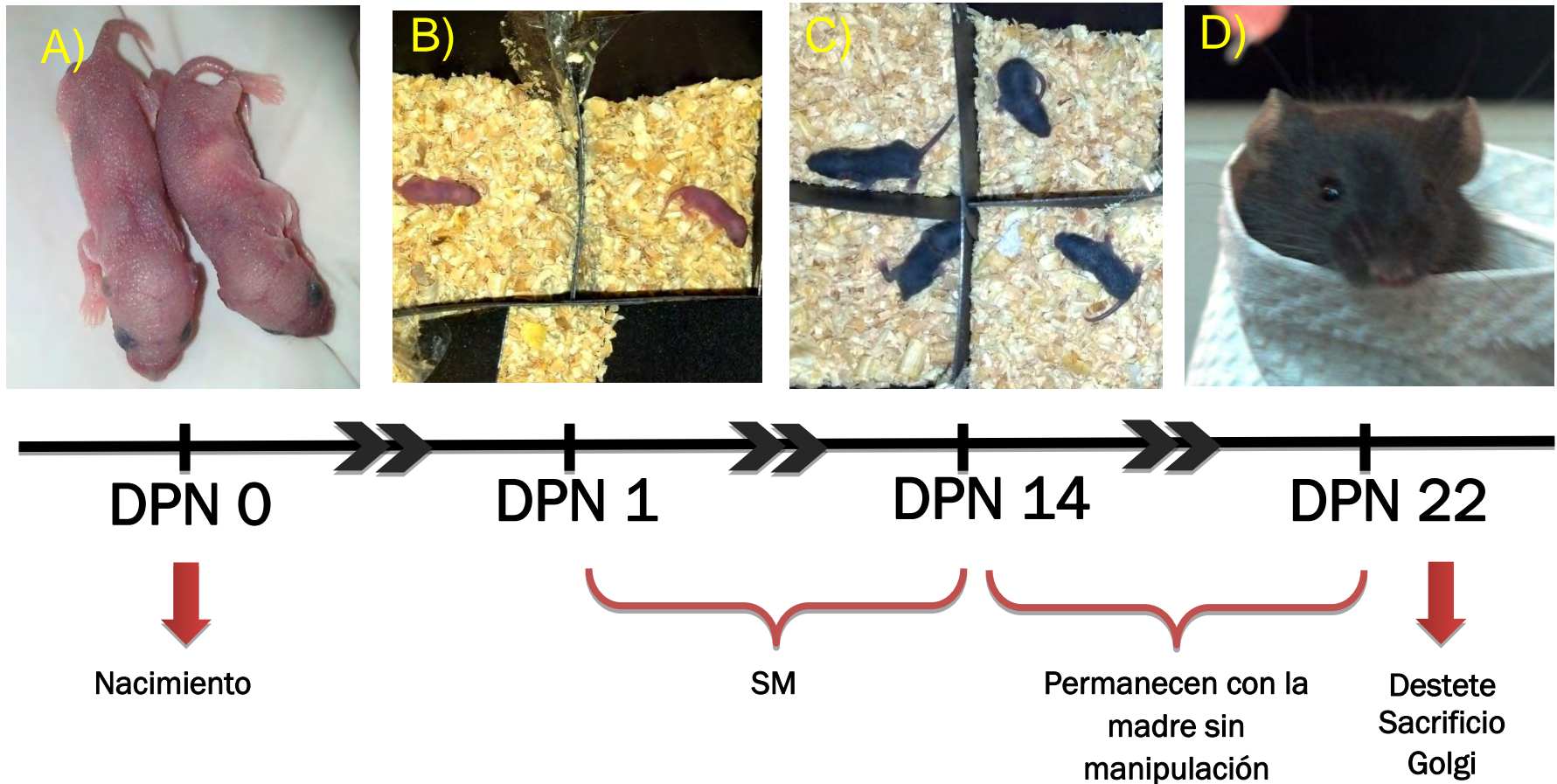
La SM siguió el protocolo descrito en Bock et al., (2005), con pequeñas modificaciones. Se utilizó una incubadora de 36 cm de ancho por 44 cm de largo con una altura de 21 cm, dividida en pequeños compartimentos individuales de 9 cm por lado por 8 cm de alto, para un aislamiento táctil y visual de cada cría y entre las crías. Las cámaras de separación se mantuvieron calientes a una temperatura aproximada de 32 °C a través de un cojín térmico.

Las crías fueron separadas de la madres y del resto de la camada por dos horas diarias a la misma hora de las 07:00 horas a las 09:00 horas del DPN 1 al DPN 14 siempre por el mismo experimentador. Las crías se colocaron individualmente en una

cámara de separación con una cama de aserrín limpia (**Figura 7**). La incubadora y la caja de la madre se colocaron en la misma habitación, para generar una privación olfativa, táctil y visual de la madre. Después del periodo de separación las crías se regresaron a la jaula de alojamiento y se les cubrieron con una delgada capa de aserrín para disminuir el rechazo por parte de la madre, las crías permanecieron con la madre hasta las 7:00 horas. del día siguiente.

Todas las crías fueron separadas durante los 14 días del período de separación sin importar su sexo para que las madres siempre estuvieran completamente solas en la jaula de alojamiento durante el período de separación (**Figura 7**). A partir del DPN 15 se dejaron a las crías con su madre sin ninguna manipulación hasta el DPN 22, destete y sacrificio.

Se realizó limpieza de las camas sólo una vez durante todo el procedimiento experimental, al DPN 15, para minimizar los posibles efectos de manipulación.



**Figura 7. | Línea de tiempo de SM a partir del DPN 0 al DPN 22.** A) Día de nacimiento DPN 0, las crías permanecen con su madre durante el DPN 0; b) Grupo de SM; primer día de separación DPN 1, se colocaron individualmente a cada cría en una incubadora separada en compartimientos individuales para generar una privación táctil y visual del resto de la camada y una privación táctil, visual y auditiva de la madre; c) Último día de separación. DPN 14; d) día de destete, sacrificio DPN 22

## Grupo Control

Se mantuvieron a las crías con su madre sin ninguna manipulación hasta el día del destete, del DPN 1 al DPN 22. Se realizó limpieza de las camas sólo una vez durante todo el procedimiento experimental, al DPN 15, para minimizar los posibles efectos de manipulación por parte del experimentador. No hay manipulación de la temperatura que la madre mantiene de forma natural en 32°C.

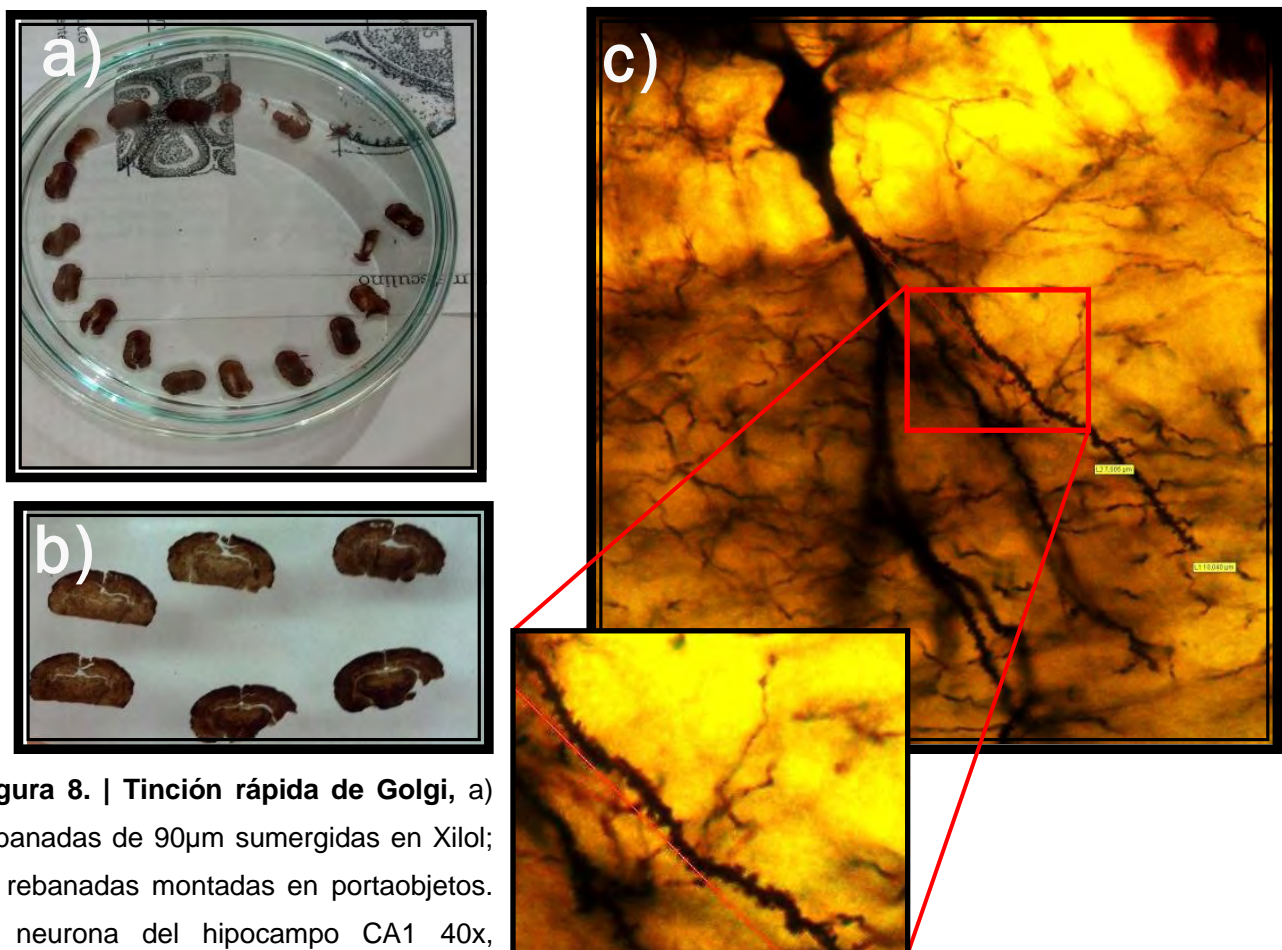
### **6.4. Análisis histológico**

#### **6.4.1. Tinción de Golgi**

El marcaje de espinas dendríticas se realizó a través de la tinción rápida de Golgi (Colín-Barenque et al., 1999). Después del periodo experimental, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico para inducir una anestesia profunda. Posteriormente se realizó una perfusión intracardiaca con una solución salina (9%) para drenar la sangre de los tejidos seguido por una solución con (2%) de paraformaldehído (PFA), en buffer fosfato 0.1 M. Los cerebros fueron extraídos y fijados por dos horas más con PFA y procesados de acuerdo al método rápido de Golgi. Los cerebros se colocaron en solución de osmio por una semana, al término de este periodo, los cerebros se retiraron de la solución de osmio y se realizaron tres lavados con agua destilada, seguido por un lavado con solución de nitrato de plata y se dejaron sumergidos en ésta solución por 24 horas. Los cerebros permanecieron en



frascos cubiertos para evitar la entrada de luz. Al término de este periodo los cerebros fueron cortados en rebanadas de 90 $\mu$ m (**Figura 8a**). Las rebanadas fueron colocadas en una caja de Petri y deshidratadas con alcohol al 96° seguidos por dos lavados alcohol absoluto. Los cortes deshidratados fueron sumergidos en esencia de clavo puro para diafanizar el tejido por diez minutos. Finalmente, cada uno de los cortes tuvo una deshidratación final con Xilol absoluto por 10 minutos (**Figura 8a**), los cortes fueron montados en un portaobjetos, cubriéndolos con entellan y con un cubreobjetos (**Figura 8b**). Las preparaciones se dejaron a temperatura ambiente por un periodo de dos semanas, al término del cual se procedió a su análisis (**Figura 8c**).

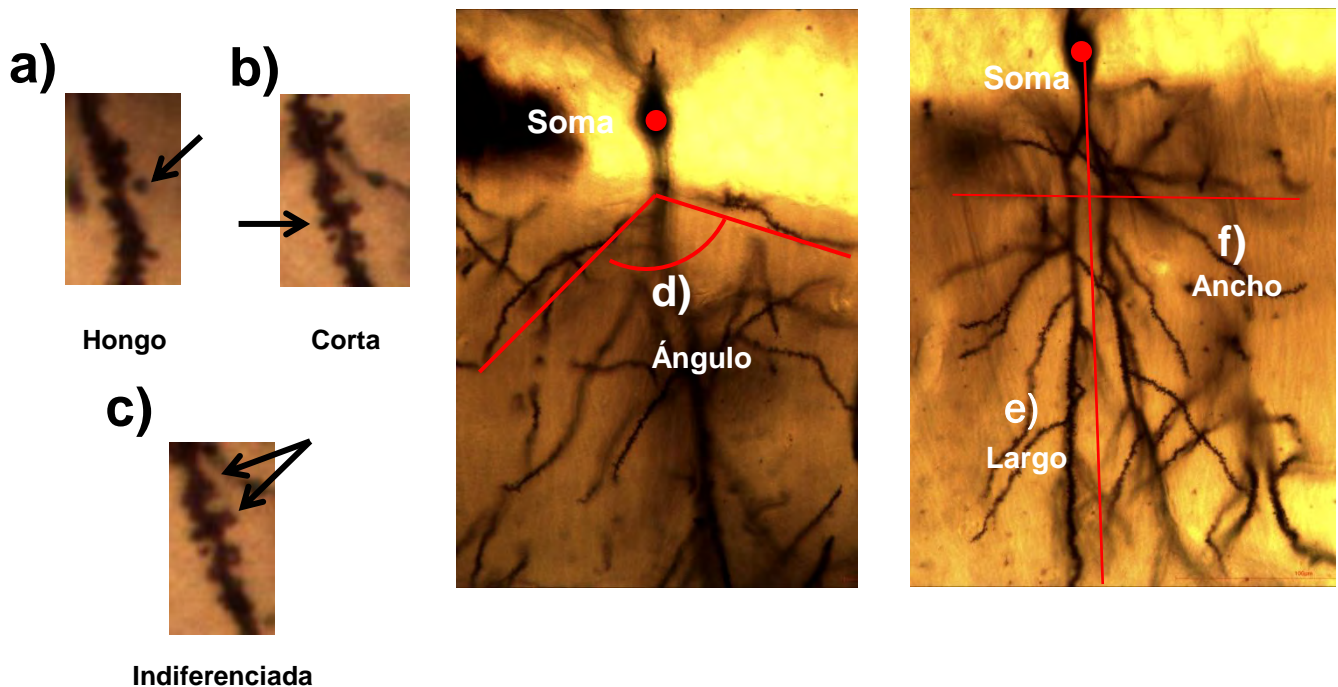


**Figura 8. | Tinción rápida de Golgi, a)** rebanadas de 90 $\mu$ m sumergidas en Xilol; **b)** rebanadas montadas en portaobjetos. **c)** neurona del hipocampo CA1 40x, dendrita maximizada de neurona del hipocampo CA1 40x

#### 6.4.2. Análisis de espinas

Para un análisis cuantitativo de las espinas se capturaron al menos 8 neuronas por sujeto con un microscopio óptico (US Microscopio Óptico Solution, Holanda) conectado a una cámara de 5 megapíxeles. Solamente las neuronas que mostraron una impresión completa del árbol dendrítico y estuvieran relativamente aisladas de las neuronas vecinas fueron seleccionadas para el análisis. El número de espinas de cada neurona fue cuantificado con un software Image Focus (Euromex) y normalizado en segmentos de 10  $\mu\text{m}$  (**Figura 8c**). El análisis morfológico de las espinas siguió la clasificación propuesta por Rochefort y Konnerth (2012), que permite identificar espinas hongo (**Figura 9a**) y cortas (**Figura 9b**). Las espinas que no se pudieron diferenciar como espinas hongo o cortas se clasificaron como espinas indiferenciadas (**Figura 9c**).

El ángulo de arborización se midió a partir de las primeras dos ramificaciones proximales al soma (**Figura 9d**); hasta la dendrita más larga de la neurona procurando seguir una línea recta (**Figura 9e**). El ancho de arborización se midió tomando los extremos de las dendritas más distales a la línea media (largo de arborización; **Figura 9f**). El área de arborización se obtuvo de la multiplicación de el largo por el ancho de la arborización (Kawaguchi, Karube, & Kubota, 2006)



**Figura 9. | Foto de una dendrita de una neurona del hipocampo a 40  $\mu\text{m}$ .** Espinas dendríticas (izquierda) a) tipo hongo; b) tipo corta; c) tipo indiferenciada. Neurona del hipocampo tomada a 10  $\mu\text{m}$ . medición del d) ángulo; e) largo, f) ancho.

#### 6.4.3. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en este estudio se analizaron con una prueba *t* para grupos independientes, se compararon los resultados del grupo control contra el grupo experimental, con una  $p \leq 0.05$  y se analizó con el paquete estadístico SPSS.

Para conocer si la SM afecta la morfología de las espinas dendríticas de neuronas hipocampales, se comparó el número de espinas dendritas tipo hongo, cortas e indiferenciadas de dendritas de área CA1 del hipocampo del grupo control contra el grupo experimental.

Para conocer si la SM disminuye la densidad de las espinas dendríticas de neuronas hipocampales se comparó el número total de espinas dendríticas en dendritas de neuronas del área CA1 del hipocampo del grupo control contra el grupo experimental.

Para conocer si la SM afecta la arborización dendrítica de neuronas hipocampales se comparó el ángulo, el largo, el ancho y el área de arborización de neuronas del área CA1 del hipocampo del grupo control contra el grupo experimental.

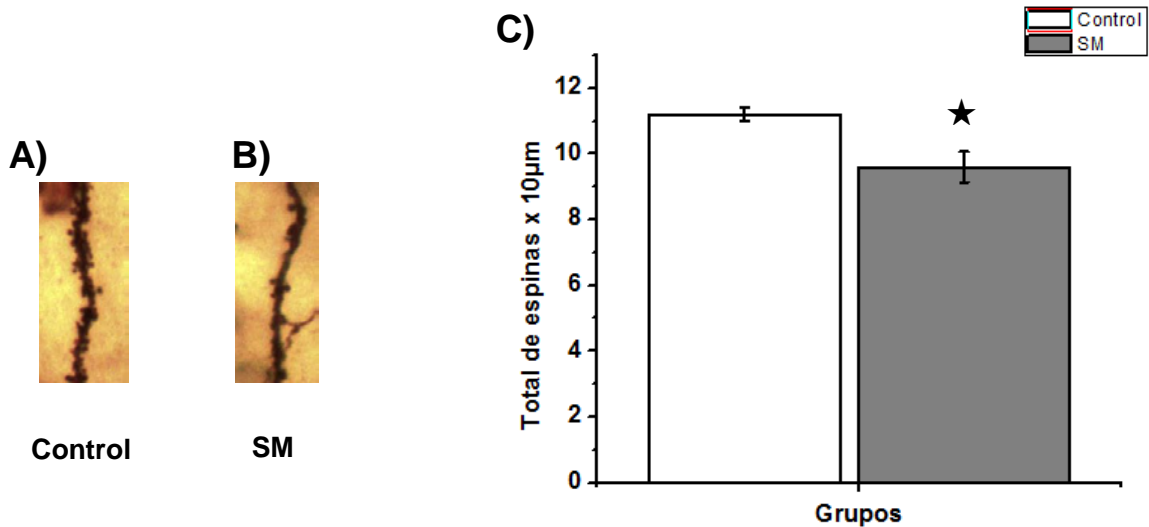
## 7. RESULTADOS

### 7.1. La SM produce una disminución del número total de espinas dendríticas en el hipocampo.

Los resultados obtenidos en este estudio se obtuvieron de un total de 288 dendritas de 144 neuronas del área CA1 del hipocampo, obtenidas de 18 ratones macho de 22 DPN.

Después de los 22 DPN los cerebros de los grupos control y SM fueron procesados por medio de una tinción rápida de Golgi para marcar las neuronas. Bajo estas condiciones se observó que las dendritas del grupo control mostraron una alta densidad de espinas dendríticas, mientras que las dendritas del grupo de SM presentaron una disminución evidente en el número de espinas (**Figura 10 A, B**). Un análisis cuantitativo demostró que los grupos de SM mostró una reducción del 14.29%, pero significativa en el número de espinas dendríticas con respecto al control  $p < .016$  (Control =  $11.20 \pm ES = 0.21$ ; SM =  $9.60 \pm ES = 0.47$ ) (**Figura 10C**).

### Total de espinas dendríticas

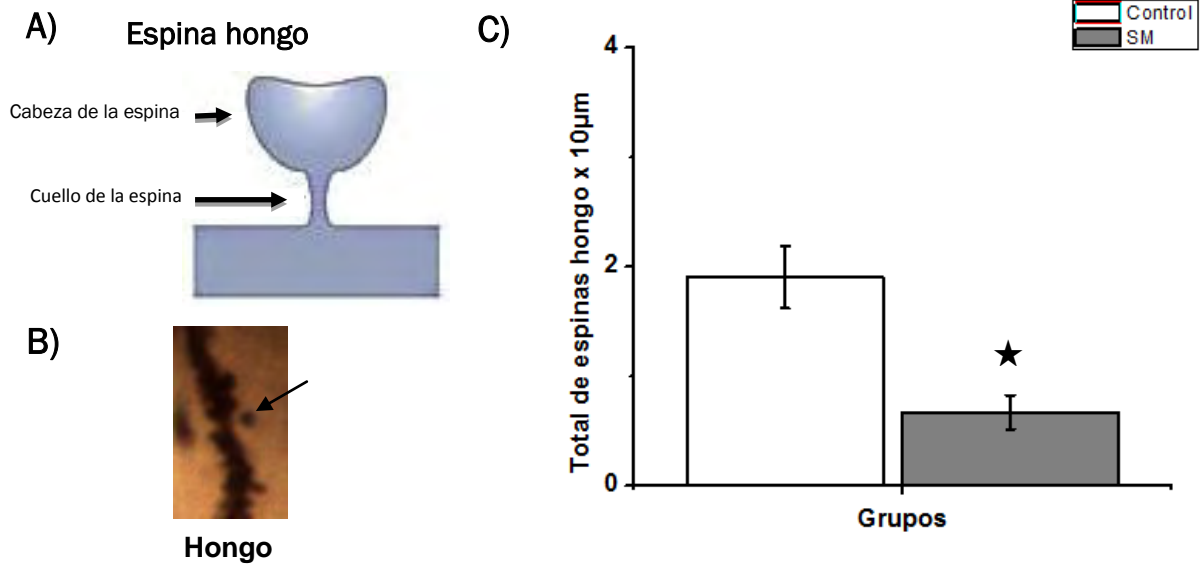


**Figura 10. | La SM reduce el número de espinas dendríticas en hipocampo. Total de espinas dendríticas.** La densidad de espinas se obtuvo a partir de segmentos de 10µm de la dendrita, las fotografías muestran las espinas observadas en los grupos control **(A)** y separación materna **(B)**. **(C)** La gráfica representa el promedio del número de espinas del grupo control (barra blanca) comparado con el grupo de SM (barra gris) ± error estándar (ES) normalizado a 10µm de largo y comparados con una *t* de student para grupos independientes.

### 7.1.1. La SM induce una disminución selectiva del total de espinas tipo hongo

Con el fin de determinar si la disminución en la densidad de espinas inducida por la SM tenía un efecto sobre un tipo particular de espinas, se procedió a analizar la morfología típica de las espinas. Se observaron tres grupos de espinas: 1) espinas en forma de hongo, presentan un cuello que emerge directamente de la dendrita y poseen una cabeza en forma de un medio círculo simulando un hongo (**Figura 11A,B**); 2) espinas cortas, estas espinas se caracterizan por no tener un cuello, son protuberancias anchas desde el nacimiento directamente de la dendrita hasta el final de la espina, sin poderse distinguir una cabeza; y 3) espinas indiferenciadas, que fueron consideradas como aquellas protuberancias que emergen de la dendrita, que presentan un cuello grueso pero cuya cabeza no estaba definida. La cuantificación mostró una disminución del 64.73% de las espinas hongo en el grupo de la SM. La disminución de las espinas dendríticas hongo fue significativa  $p < .006$  (Control =  $1.90 \pm ES = 0.28$ ; SM =  $0.67 \pm ES = 0.16$ ) (**Figura 11C**).

## Total de espinas hongo

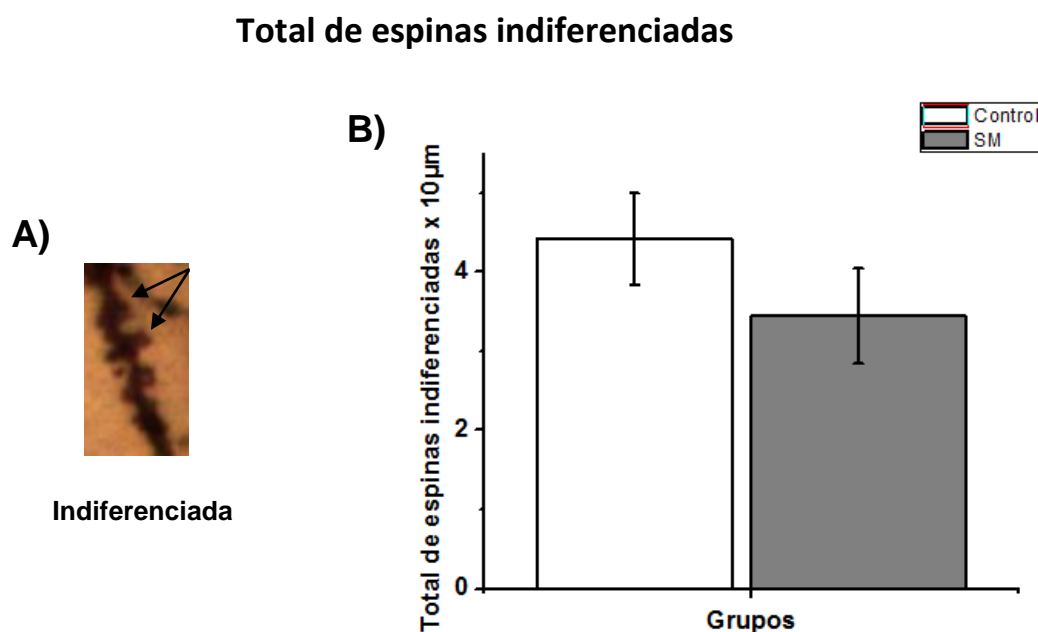


**Figura 11. | La SM reduce el número de espinas dendríticas tipo hongo en hipocampo. Total de espinas dendríticas tipo hongo.** El esquema representa una espina dendrítica tipo hongo (A), la fotografía muestra una espina dendrítica hongo (B). (C) La gráfica representa el promedio del número de espinas hongo del grupo control (barra blanca) comparado con el grupo de SM (barra gris)  $\pm$  error estándar (ES) normalizado a 10µm de largo y comparados con una *t* de student para grupos independientes.



### 7.1.2. La SM produce una disminución de espinas indiferenciadas

Para comprobar si las espinas de cuello grueso con cabeza no bien definida agrupadas como espinas indiferenciadas (**Figura 12A**), mostraron diferencias entre los grupos una prueba *t* de student para grupos independientes fue utilizada para comparar el promedio del total de espinas dendríticas indiferenciadas entre el grupo control y el grupo de SM. Las espinas indiferenciadas mostraron una reducción no significativa del 22.17% en el grupo de SM,  $p < .254$  (Control =  $4.42 \pm ES = 0.58$ ; SM =  $3.44 \pm ES = 0.60$ ). (**Figura 12B**).

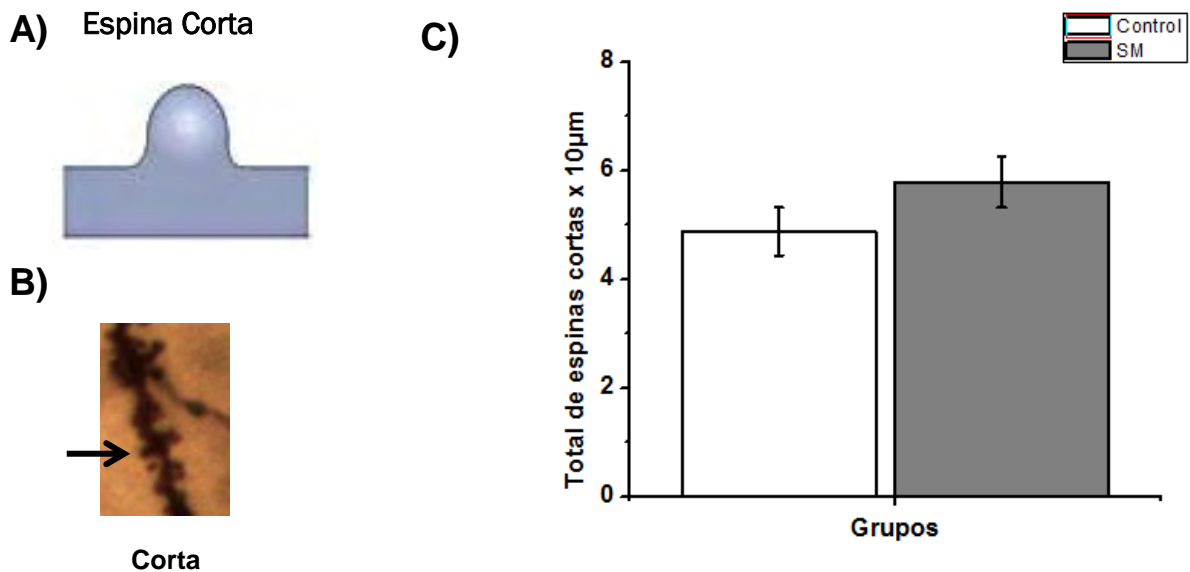


**Figura 12. | La SM reduce parcialmente el número de espinas indiferenciadas en hipocampo. (A)** fotografía muestra espinas dendríticas indiferenciadas. **(B)** La gráfica representa el promedio del número de espinas indiferenciadas  $\pm$  error estándar (ES) normalizado a 10  $\mu$ m de largo. La diferencia en el número total de espinas dendríticas indiferenciadas entre el grupo control y el grupo de SM no resultó significativa.

### 7.1.3. La SM produce un incremento de la formación de espinas dendríticas cortas

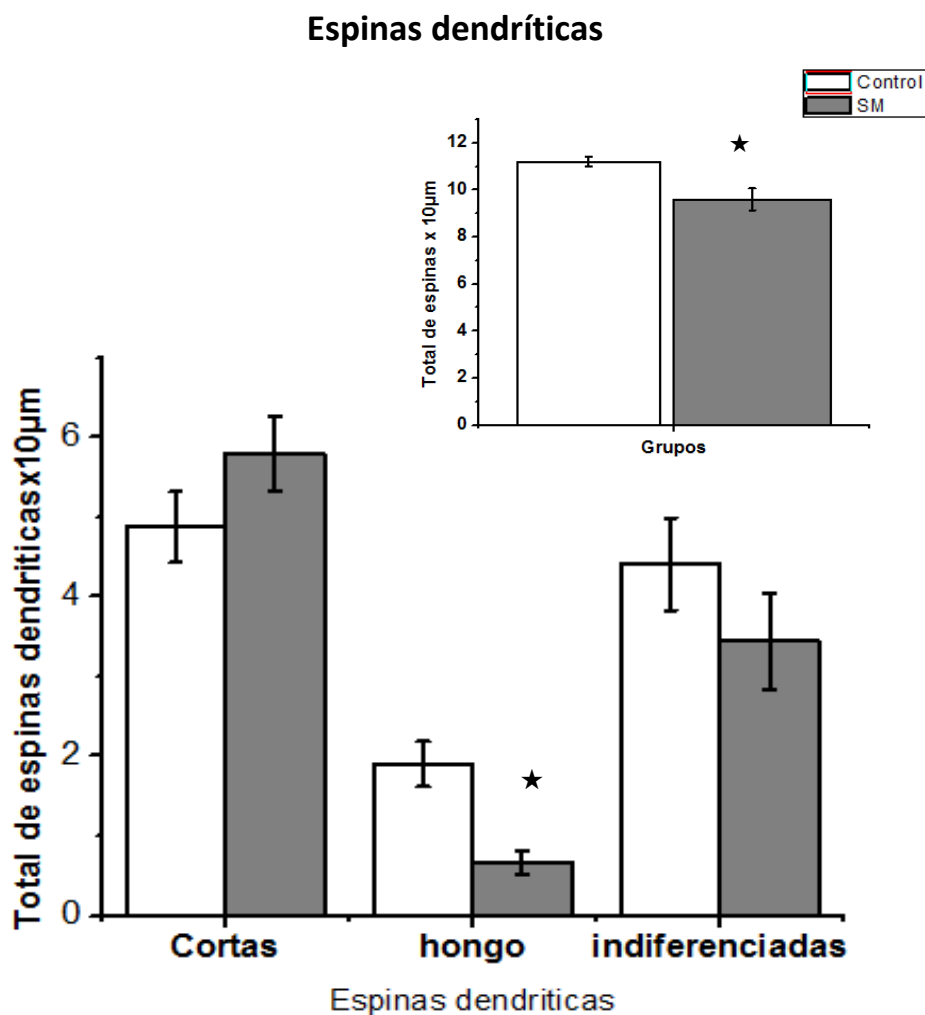
Las espinas cortas (**Figura 13A,B**) son consideradas espinas que pueden estar involucradas en principalmente en procesos de aprendizaje (Kasai, et al., 2003; Lamprecht & LeDoux, 2004; Yang, Pan & Gan, 2009). Nosotros observamos que la SM produce un incremento de espinas cortas (**Figura 13C**). El análisis cuantitativo muestra un aumento del 18.40% de las espinas cortas en el grupo de la SM con respecto al grupo control  $p < .152$  (Control =  $4.89 \pm ES = 0.44$ ; SM =  $5.79 \pm ES = 0.47$ ) (**Figura 13C**). Se realizó una prueba *t* de student para muestras independientes para comparar el promedio del total de espinas dendríticas cortas entre el grupo control y el grupo de SM. El aumento de las espinas dendriticas cortas no resultó significativa.

## Total de espinas cortas



**Figura 13. | La SM aumenta el número de espinas cortas en hipocampo. Total de espinas dendríticas cortas.** La densidad de espinas se obtuvo a partir de segmentos de 10µm de la dendrita. El esquema representa una espina dendrítica corta **(A)**, la fotografía muestra una espina dendrítica corta **(B)**. **(C)** La gráfica representa el promedio del número de espinas cortas  $\pm$  error estándar (ES) normalizado a 10µm de largo. La diferencia en el número total de espinas dendríticas indiferenciadas entre el grupo control y el grupo de SM no resultó significativa.

Estos resultados sugieren que la SM materna tiene un efecto importante en el desarrollo de las espinas dendríticas en neuronas hipocampales, ya que aunque algunos resultados no fueron significativos, podemos observar cambios asociados a la SM de forma cualitativa. Particularmente produce una disminución de espinas hongo e indiferenciadas y un incremento aunque no significativo de las espinas cortas. Los resultados de éste proyecto se resumen en la gráfica 14.



**Figura 14. | Total de espinias dendríticas.** Se resumen los resultados de los promedios del número de espinias dendríticas totales por grupo  $\pm$  (ES), solamente fueron significativas  $p \leq .05$ , las diferencias en el número total de espinas y espinas tipo hongo. En la parte superior se grafica el número total de espinias dendríticas totales por grupo  $\pm$  (ES).

## **7.2. La separación materna induce alteraciones en la arborización dendrítica**

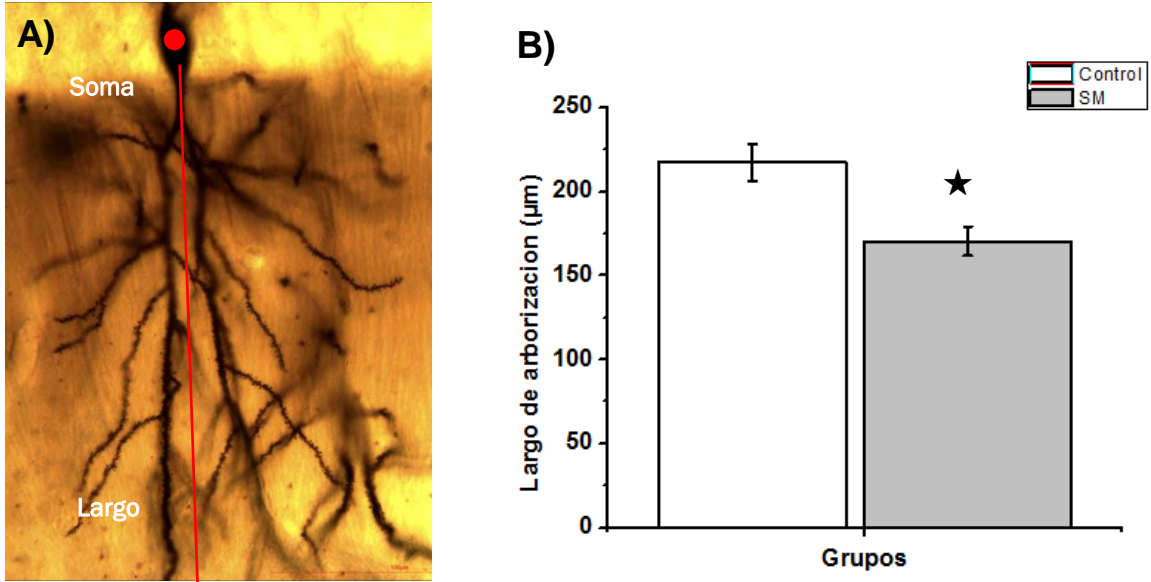
La arborización dendrítica es una estructura muy importante para la formación de circuitos neuronales. Debe existir un equilibrio entre el costo metabólico de la elaboración de la dendrita y el área que cubre para formar la red neuronal que determina el tamaño y la forma de dendrita (Wen & Chklovskii, 2008). Las dendritas deben cumplir los siguientes requisitos fisiológicos para asegurar una función neuronal adecuada. En primer lugar, las dendritas de una neurona deben cubrir el área que abarcan las entradas sensoriales y sinápticas (Shepherd, et al., 2005). En segundo lugar, el patrón de ramificación de las dendritas y la densidad deben ser adecuados para la recepción y el procesamiento de las señales que convergen en el campo dendrítico (Losonczy, Makara & Magee, 2008; MacNeil & Masland, 1998). Y tercero, las dendritas necesitan tener flexibilidad para adaptarse durante el desarrollo y en respuesta a la experiencia (Spruston, 2008). Nuestros resultados sugieren que la SM puede influir en la arborización dendrítica.

Con el fin de determinar si la SM además de afectar el desarrollo de las espinas dendríticas, altera la arborización dendrítica, se midió el largo, ancho, ángulo y área de la arborización, y se realizó una comparación entre el grupo control y el grupo d SM.

### 7.2.1. La SM produce una disminución del largo de arborización

Para determinar si la SM produce un efecto sobre la longitud de la arborización dendrítica, se midió el largo de la arborización y se compararon las medias del grupo control y el grupo de SM (**Figura 16A**). Nuestros resultados mostraron que las neuronas de la región CA1 presentaron una arborización cuya longitud promedio fue de 218  $\mu\text{m}$  de largo sin embargo, el largo de arborización disminuyó en el grupo de SM. Un análisis cuantitativo mostró una disminución del 21.58% del largo de arborización en el grupo de la SM. Una prueba *t* de student para grupos independientes demostró que esta disminución del largo de arborización fue estadísticamente significativa,  $p < .004$  (Control =  $217.34 \pm \text{ES} = 11.01$ ; SM =  $170.42 \pm \text{ES} = 8.68$ ). (**Figura 16B**).

## Largo de arborización

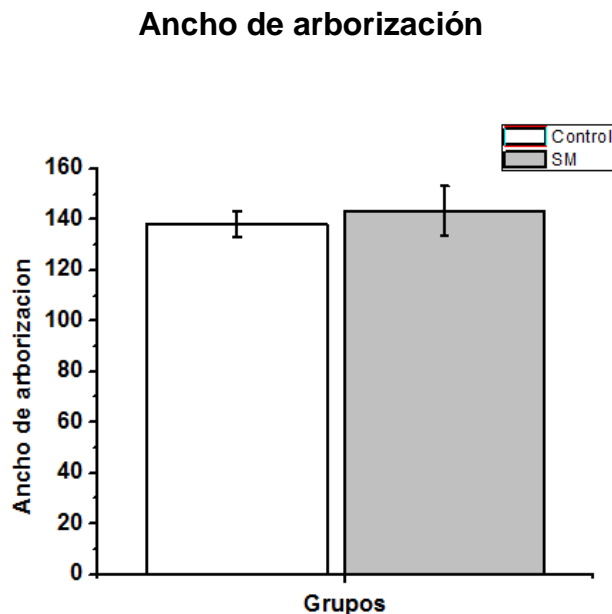


**Figura 16. | La SM reduce el largo de arborización dendrítica en neuronas del hipocampo.** El largo de arborización se obtuvo a partir de neuronas completas. **(A)** La fotografía muestra la medición del largo de arborización de una neurona representado por una línea vertical color rojo que parte del soma de la neurona marcado con un punto color rojo. **(B)** La gráfica representa el promedio del largo de arborización  $\pm$  error estándar (ES) comparados con una *t* de student para grupos independientes,

## 7.2.2. La SM no produce cambios en el ancho de arborización dendrítica.

Algunos trabajos sugieren que el ancho de la arborización dendrítica puede estar asociado al mantenimiento de los potenciales sinápticos excitatorios (Gulledge, Carnevale, Stuart, 2012).

Con el fin de determinar si la SM produce diferencias en el ancho de arborización dendrítica, se realizó una cuantificación del ancho de arborización entre los grupos. El ancho promedio de la arborización del grupo control es de 138  $\mu\text{m}$ , mientras que el grupo expuesto a la SM mostró un ancho de arborización de 143  $\mu\text{m}$ . Pero la comparación estadística con una prueba *t* de student para grupos independientes mostró que no existen diferencias significativas,  $p < .641$  (Control =  $138.24 \pm \text{ES} = 4.98$ ; SM =  $143.49 \pm \text{ES} = 9.77$ ) (**Figura 17**).

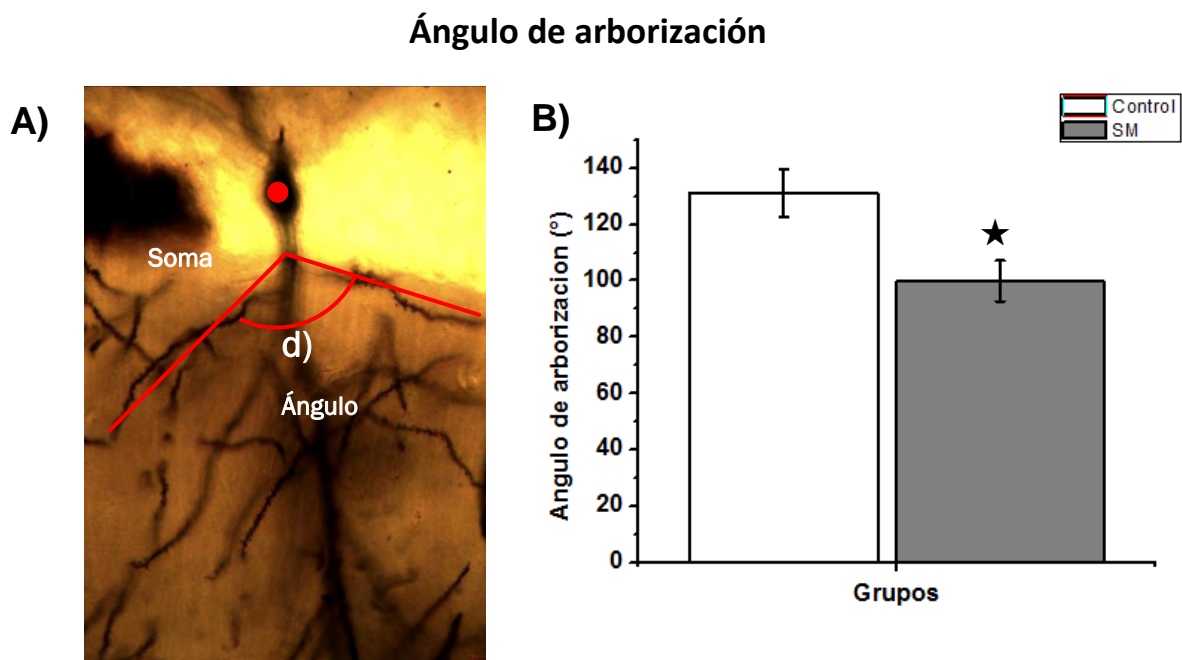


**Figura 17. | La SM afecta el ancho arborización no significativo.** La gráfica representa el promedio del ancho de arborización. No existe una diferencia significativa en el ancho de arborización dendrítica entre el grupo control y el grupo de SM.



### 7.2.3. La SM produce una disminución significativa del ángulo de arborización

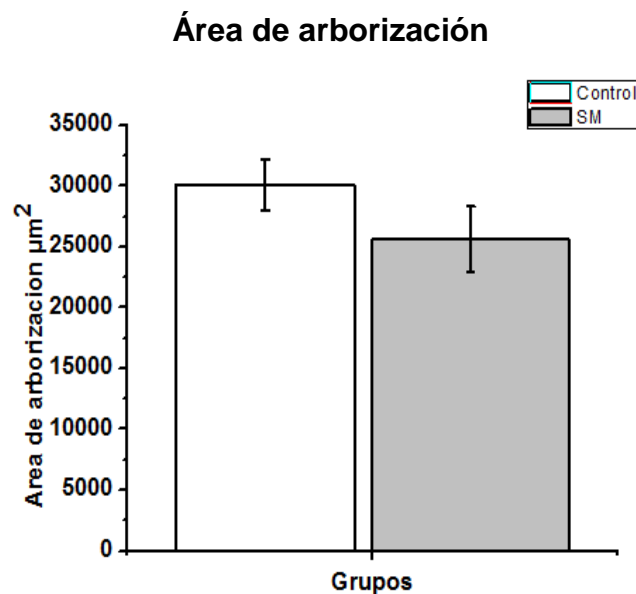
El grupo de SM mostró un ángulo de arborización promedio de 131 grados, mientras que los grupos con SM tuvieron un ángulo de arborización promedio de 99 grados. La SM provoca una disminución del 23.87% del ángulo de arborización con respecto al grupo control (**Figura 15A**). Una prueba *t* de student para grupos independientes demuestra que esta disminución es significativa,  $p < .012$  (Control =  $131.25 \pm ES = 8.44$ ; SM =  $99.92 \pm ES = 7.16$ ) (Grafica 15B)



**Figura 15. | La SM reduce el ángulo de arborización en neuronas del hipocampo. Ángulo de arborización por grupo.** El ángulo de arborización se obtuvo a partir de neuronas completas. **(A)** la fotografía muestra la medición del ángulo de arborización de una neurona representado por dos líneas vertical color rojo, el soma de la neurona marcado con un punto color rojo. **(B)** La gráfica representa el promedio del ángulo de arborización  $\pm$  error estándar (ES) comparados con una *t* de student.

#### 7.2.4. SM produce una disminución del área de arborización

Debido a las diferencias obtenidas en el análisis de la arborización, se calculó el área de arborización multiplicando el largo por el ancho de arborización. Nuestros resultados muestran que la SM produce una disminución de un 8.52%. Sin embargo, esta disminución no resultó estadísticamente significativa,  $p < .207$  (Control =  $30113.64 \pm ES = 2069.28$ ; SM =  $25653.66 \pm ES = 2690.45$ ) (**Figura 18**).



**Figura 18. | La SM afecta el área de arborización.** El área de arborización se obtuvo a partir de neuronas completas. La gráfica representa el promedio del área de arborización  $\pm$  error estándar (ES) comparados con una *T* de student para grupos independientes,  $p = 0.207$ . No existe una diferencia significativa en el área de arborización dendrítica entre el grupo control y el grupo de SM.

## 8. DISCUSIÓN

Las experiencias adversas en etapas tempranas de desarrollo se han correlacionado con psicopatologías como el trastorno depresivo mayor, ansiedad, pobre desenvolvimiento en ámbitos conductuales, cognitivos, sociales, y respuesta exacerbada a acontecimientos novedosos y estresantes y trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia (Franklin, Saab & Mansuy, 2012). En la edad adulta, se han relacionado con problemas de aprendizaje y predisposición al abuso de drogas (Lupien et al 2009). La mayoría de los trabajos sugieren que la alteración en experiencias tempranas activan el eje HHA, elevando el nivel de glucocorticoides y alterando los niveles hormonales lo que afecta a estructuras como la amígdala, la corteza cerebral e hipocampo (Lupien et al 2009). Sin embargo, las alteraciones en la anatomía de la neurona han recibido poca atención. Las neuronas forman las estructuras cerebrales que se han visto afectadas y la importancia de su estudio reside en que un desarrollo anormal de su estructura afecta las funciones cognitivas y conductuales.

Por otro lado, el comportamiento materno activo como lamer, asear y mantener calientes a las crías tienen efectos benéficos a lo largo de la vida y en la edad adulta. Bajas tasas de estas conductas maternas puede conducir a trastornos depresivos, ansiedad y comportamientos sociales y cognitivos alterados (Myers-Schulz & Koenigs 2011). A pesar de esto, los mecanismos implicados en este proceso no se conocen completamente.

Dado que las experiencias adversas en etapas tempranas de la vida se correlacionan con distintos trastornos y modificaciones a nivel neuronal y hormonal, es importante conocer cuáles son los mecanismos que se encuentran detrás de las

alteraciones asociadas a la SM como modelo de experiencias tempranas adversas, como los cambios presentados en este trabajo. Este estudio presenta por primera vez en ratón las modificaciones en la morfología de las espinas dendríticas y la arborización del hipocampo.

Se utilizó un modelo de SM como una analogía a una experiencia adversa. Nuestros resultados demuestran que la SM afecta la morfología de la neurona disminuyendo la densidad dendrítica, particularmente en espinas tipo hongo, así como el largo y el ángulo de la arborización neuronal.

La disminución en el número total de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo debido a la SM encontrada en este estudio, podría estar relacionada con los problemas de aprendizaje y de memoria en la adultez. Estudios morfológicos cuantitativos en diferentes especies de roedores revelan densidades de las espinas dendríticas significativamente alterados en las áreas límbicas del cerebro involucradas en el proceso emocional, incluyendo la corteza cingulada anterior relacionada con las funciones ejecutivas relativas al control emocional de la respuesta visceral y endocrina, el hipocampo y la amígdala involucrada en procesos afectivos y condicionamiento al miedo, en respuesta a la separación de la madre o los padres (Helmeke; Ovtscharoff & Braun, 2001; Poeggel et al., 2003; Bock et al., 2005).

Encontramos un decremento importante debido a la SM en las espinas dendríticas hongo, las cuales se han relacionado con procesos de memoria, principalmente. Las espinas cortas asociadas al aprendizaje, no tuvieron ningún cambio asociado con la SM (Kasai, et al., 2003; Lamprecht & LeDoux, 2004; Yang, Pan & Gan, 2009). En concordancia con nuestros datos, se ha reportado en ratones adultos un

decremento en la estabilidad de las espinas hongo en corteza cerebral debido a la SM (Takatsuru, et al., 2009) sugiriendo que los efectos relacionados al presente estudio producidos por la SM permanecen hasta la edad adulta afectando procesos de memoria pero no de aprendizaje. Adicionalmente, se ha reportado detrimento en la neurogénesis del hipocampo en condiciones neuropsiquiátricas como la depresión mayor, trastornos neurodegenerativos (Kempermann et al., 2008; Pittenger & Duman, 2008; Decarolis & Eisch, 2010), esquizofrenia, entre otros (Kaufman et al., 2000), sugiriendo que el hipocampo es una estructura sensible a cambios durante el desarrollo.

Los cambios morfológicos observados en las espinas de neuronas del hipocampo pueden afectar el número de sinapsis afectando la conectividad y el desarrollo cognitivo, un menor número de sinapsis puede significar un deterioro en la actividad cognitiva. Estudios futuros deben de ser encaminados a conocer de la SM sobre la sinapsis.

La SM es considerada como uno de los más potentes estresores naturales durante el desarrollo, lo que resulta en alteraciones a largo plazo en la sensibilidad del eje HHA, la secreción de medulo-adrenal y las respuestas de comportamiento al estrés (Wigger & Neumann, 1999). Estas alteraciones a largo plazo del eje HHA puede estar afectando la espinogénesis, pudiendo permanecer hasta la edad adulta.

Se ha relacionado una disminución del árbol dendrítico bajo condiciones de estrés crónico con el detrimento de procesos atencionales que podrían contribuir en trastornos de ansiedad y depresión presentes en la edad adulta (Liston et al., 2006). La SM durante las primeras etapas del desarrollo podría resultar un efecto estresante que altera la arborización dendrítica afectando las posibles conexiones neurales. Nuestros

resultados concuerdan con este estudio, encontramos una reducción del largo de arborización en comparación con los controles.

Este trabajo puede servir como base para futuros estudios de los efectos de la SM o pobres cuidados parentales en el desarrollo del individuo. Si bien, algunos estudios mencionan que existe deterioro en el aprendizaje y la memoria, sería importante correlacionar si la disminución en las espinas dendríticas se mantiene hasta la edad adulta. Sólo hay un estudio sobre como afecta la SM a la densidad dendrítica y los resultados son contradictorios (Poeggel et al., 2003). El estudio fue realizado en el ratón biparental *Octodon degus*, se encontró un aumento en la densidad de las espinas dendríticas, sugiriendo que el efecto de la SM tiene un impacto distinto para cada especie.

Estudios de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la trombospondina (TSP-1) una proteína sintetizada y liberada por los astrocitos, tiene una actividad espinogénica y sinaptogénica en neuronas hipocampales. *In vivo*, la pérdida de TSP 1 afecto la densidad dendrítica de espinas en las mismas regiones, por lo que determinar si los niveles de TSP-1, se afectan durante la SM y esto influye sobre la alteración de las espinas podrían contribuir a entender los mecanismos celulares involucrados en la SM.

## 9. LIMITACIONES

La SM en este estudio se utilizó como modelo de experiencias adversas tempranas, se encontraron cambios en la arborización de la neurona y en la densidad dendrítica, sin embargo no todos estos cambios resultaron significativos, creemos que con un mayor número de sujetos se puede comprobar si estos cambios si son significativos.

## 10. CONCLUSIONES

- En este estudio se demostró que la SM tiene un impacto en la densidad de espinas dendríticas y en la arborización dendrítica.
- La SM produce una disminución del número total de espinas dendríticas en el hipocampo.
- La SM produce una disminución significativa del total de espinas hongo
- La SM produce una disminución no significativa de espinas indiferenciadas
- La SM produce un aumento no significativo de espinas dendríticas cortas
- La SM muestra alteraciones en la arborización dendrítica
- La SM produce una disminución significativa del largo de arborización
- La SM no tiene ningún efecto sobre el ancho de arborización
- La SM produce una disminución significativa en área de arborización



## REFERENCIAS

- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J. & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256-266.
- Anand, K. J. S. & Scalzo, F. M. (2000). Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Neonatology*, 77(2), 69-82.
- Arborelius, L. & Eklund, M. B. (2007). Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neuroscience*, 145(2), 738-750.
- Biagini, G., Pich, E. M., Carani, C., Marrama, P., & Agnati, L. F. (1998). Postnatal maternal separation during the stress hyporesponsive period enhances the adrenocortical response to novelty in adult rats by affecting feedback regulation in the CA1 hippocampal field. *International journal of developmental neuroscience*, 16(3), 187-197.
- Boccia, M. L. & Pedersen, C. A. (2001). Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology*, 26(7), 657-672.
- Bock, J., & Braun, K. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptor activation suppresses learning-induced synaptic elimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 2485-2490.
- Bock, J., Gruss, M., Becker, S. & Braun, K. (2005). Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. *Cerebral Cortex*, 15(6), 802-808.

- Calverley, R. K. S. & Jones, D. G. (1990). Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain research reviews*, 15(3), 215-249.
- Chang, F. L. & Greenough, W. T. (1984). Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain research*, 309(1), 35.
- Chicurel, M. E. & Harris, K. M. (2004). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology*, 325(2), 169-182.
- Colín-Barenque, L., Avila-Costa, M. R., Fortoul, T., Rugerio-Vargas, C., Machado-Salas, J. P., Espinosa-Villanueva, J. & Rivas-Arancibia, S. (1999). Morphologic alteration of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats. *Neuroscience letters*, 274(1), 1-4.
- Conger, R. D., Ge, X., Elder Jr, G. H., Lorenz, F. O. & Simons, R. L. (1994). Economic stress, coercive family process, and developmental problems of adolescents. *Child development*, 65(2), 541-561.
- Cirulli, F., Berry, A., & Alleva, E. (2003). Early disruption of the mother–infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1), 73-82.
- Daskalakis, N. P., Oitzl, M. S., Schächinger, H., Champagne, D. L. & Ronald de Kloet, E. (2012). Testing the cumulative stress and mismatch hypotheses of

psychopathology in a rat model of early-life adversity. *Physiology & behavior*. 106. 707–721 .

DeCarolis, N. A., & Eisch, A. J. (2010). Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: a critical evaluation. *Neuropharmacology*, 58(6), 884-893.

De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine reviews*, 19(3), 269-301.

Dietz, D. M. & Nestler, E. J. (2012). From Father to Offspring: Paternal Transmission of Depressive-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 311-312.

Eisenberg L. & Earls FJ. 1975. Poverty, social depreciation and child development. In American Handbook of Psychiatry, ed. DA Hamburg, 6:275–91. New York: Basic Books

Fleming, A. S., O'Day, D. H. & Kraemer, G. W. (1999). Neurobiology of mother–infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23(5), 673-685.

Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron*, 75(5), 747-761.

Fox, W. M. (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Animal Behaviour*, 13(2), 234-IN5.

Grace, L., Heschem, S., Kellaway, L. A., Bugarith, K. & Russell, V. A. (2009). Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. *Metabolic brain disease*, 24(4), 643-657.

- Goldin, M., Segal, M., & Avignone, E. (2001). Functional plasticity triggers formation and pruning of dendritic spines in cultured hippocampal networks. *The Journal of Neuroscience*, 21(1), 186-193.
- Gulledge, A. T., Carnevale, N. T., & Stuart, G. J. (2012). Electrical Advantages of Dendritic Spines. *PLoS ONE*, 7(4), e36007.
- Harris, K. M. & Kater, S. B. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 341–371
- Harris, K. M., Jensen, F. E. & Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 12(7), 2685-705.
- Heinze, G. (2001). Mente-cerebro: sus señales y su repercusión en el sistema inmunológico. *Salud Mental*, 24(1), 3.
- Hering, H. & Sheng, M. (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews*, 2, 880-888
- Herman, J. P., & Cullinan, W. E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends in neurosciences*, 20(2), 78-84.
- Helmeke, C., Poeggel, G., & Braun, K. (2001). Differential emotional experience induces elevated spine densities on basal dendrites of pyramidal neurons in the anterior cingulate cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience*, 104(4), 927-931.

- Hulme, P. A. (2011). Childhood Sexual Abuse, HPA Axis Regulation, and Mental Health An Integrative Review. *Western journal of nursing research*, 33(8), 1069-1097.
- Huot R. L., Thirivikraman K. V., Meaney M. J. & Plotsky P. M. (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 158:366–373
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences*, 26(7), 360-368.
- Kaufman, J., Plotsky, P. M., Nemeroff, C. B., & Charney, D. S. (2000). Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biological psychiatry*, 48(8), 778-790.
- Kawaguchi, Y., Karube, F., & Kubota, Y. (2006). Dendritic branch typing and spine expression patterns in cortical nonpyramidal cells. *Cerebral Cortex*, 16(5), 696-711.
- Kempermann, G. (2008). The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for?. *Trends in neurosciences*, 31(4), 163-169.
- Kolb, B., Forgie, M., Gibb, R., Gorny, G. & Rowntree, S. (1998). Age, experience and the changing brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(2), 143-159.
- Kuhn, C. M. & Schanberg, S. M. (1998). Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3), 261-270.

- Kvetňanský, R., Pacák, K., Fukuhara, K., Viskupič, E., Hiremagalur, B., Nankova, B., ... & Kopin, I. J. (1995). Sympathoadrenal system in stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 771(1), 131-158.
- Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1), 45-54.
- Leslie, A. T., Akers, K. G., Krakowski, A. D., Stone, S. S. D., Sakaguchi, M., Arruda-Carvalho, M. & Frankland, P. W. (2011). Impact of early adverse experience on complexity of adult-generated neurons. *Translational Psychiatry*, 1(8), e35.
- Lieshoff, C., & Bischof, H. J. (2003). The dynamics of spine density changes. *Behavioural brain research*, 140(1), 87-95.
- Liston, C., Miller, M. M., Goldwater, D. S., Radley, J. J., Rocher, A. B., Hof, P. R., ... & McEwen, B. S. (2006). Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *The Journal of Neuroscience*, 26(30), 7870-7874.
- Losonczy, A., Makara, J. K., & Magee, J. C. (2008). Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature*, 452(7186), 436-441.
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434-445.
- MacNeil, M. A., & Masland, R. H. (1998). Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron*, 20(5), 971-982.

- Makinodan, M., Rosen, K. M., Ito, S. & Corfas, G. (2012). A Critical Period for Social Experience–Dependent Oligodendrocyte Maturation and Myelination. *Science*, 337(6100), 1357-1360.
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Neuroscience*, 24, 1161–1192.
- Medvedev, N. I., Popov, V. I., Rodriguez Arellano, J. J., Dallérac, G., Davies, H. A., Gabbott, P. L., Laroche, S., Kraev, I. V., Doyère, V. & Stewart, M. G. (2010). The N-methyl-d-aspartate receptor antagonist CPP alters synapse and spine structure and impairs long-term potentiation and long-term depression induced morphological plasticity in dentate gyrus of the awake rat. *Neuroscience*, 165(4), 1170-1181.
- Miller, L., Kramer, R., Warner, V., Wickramaratne, P. & Weissman, M. (1997). Intergenerational transmission of parental bonding among women. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 36(8), 1134-1135.
- Monroy, E., Hernández-Torres, E., & Flores, G. (2010). Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *Journal of chemical neuroanatomy*, 40(2), 93-101.
- Muhammad, A., & Kolb, B. (2011). Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. *Behavioural brain research*, 223(1), 7-16.

- Murakoshi, H., & Yasuda, R. (2012). Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. *Trends in neurosciences*, 35(2), 135-143.
- Myers-Schulz, B., & Koenigs, M. (2011). Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. *Molecular psychiatry*, 17(2), 132-141.
- Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 863-876.
- Núñez, J. F., Ferré, P., Escorihuela, R. M., Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (1997). Effects of postnatal handling of rats on emotional, HPA-axis, and prolactin reactivity to novelty and conflict. *Physiology & behavior*, 60(5), 1355-1359.
- Ovtscharoff Jr, W., Helmeke, C., & Braun, K. (2006). Lack of paternal care affects synaptic development in the anterior cingulate cortex. *Brain research*, 1116(1), 58-63.
- Parnass, Z., Tashiro, A. & Yuste, R. (2000). Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*, 10(5), 561-568.
- Pascual-Castroviejo, I. (1996). Plasticidad cerebral. *Revista de neurología*, 24(135), 1361-1366.
- Peñalva, R. G., Flachskamm, C., Zimmermann, S., Wurst, W., Holsboer, F., Reul, J. M. H. M., & Linthorst, A. C. E. (2002). Corticotropin-releasing hormone receptor type 1-deficiency enhances hippocampal serotonergic neurotransmission: an *in vivo* microdialysis study in mutant mice. *Neuroscience*, 109(2), 253-266.



- Pittenger, C., & Duman, R. S. (2007). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 88-109.
- Ploj, K., Roman, E., & Nylander, I. (2003). Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience*, 121(3), 787-799.
- Plotsky, P. M. & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, 18(3), 195-200.
- Poeggel, G., Helmeke, C., Abraham, A., Schwabe, T., Friedrich, P., & Braun, K. (2003). Juvenile emotional experience alters synaptic composition in the rodent cortex, hippocampus, and lateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 16137-16142.
- Pryce, C. R. & Feldon, J. (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1), 57-71.
- Rochefort, N. L. & Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO reports*, 13(8), 699-708.
- Romeo, R. D., Mueller, A., Sisti, H. M., Ogawa, S., McEwen, B. S., & Brake, W. G. (2003). Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Hormones and behavior*, 43(5), 561-567.
- Segal, M. (2002). Dendritic spines: elementary structural units of neuronal plasticity. *Progress in Brain Research*, 138, 53-59.

- Shepherd, G. M., Stepanyants, A., Bureau, I., Chklovskii, D., & Svoboda, K. (2005). Geometric and functional organization of cortical circuits. *Nature neuroscience*, 8(6), 782-790.
- Soderholm, J. D., Yates, D. A., Gareau, M. G., Yang, P. C., MacQueen, G. M., & Perdue, M. H. (2002). Neonatal Maternal Separation Predisposes Adult Rats to Colonic Barrier Dysfunction in Response to Mild Stress. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*.
- Sorra, K. E. & Harris, K. M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10(5), 501-511.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(3), 206-221.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological review*, 99(2), 195.
- Takatsuru, Y., Yoshitomo, M., Nemoto, T., Eto, K. & Nabekura, J. (2009). Maternal separation decreases the stability of mushroom spines in adult mice somatosensory cortex. *Brain research*, 1294, 45-51
- Tata, D. A. (2012). Maternal separation as a model of early stress: effects on aspects of emotional behavior and neuroendocrine function. *Hellenic Journal of Psychology*, 9, 84-10.
- Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Oliet, S. H., Gage, F. H. & Abrous, D. N. (2010). Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 7963-7968.

- Yang, G., Pan, F., & Gan, W. B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*, 462(7275), 920-924.
- Wang, L., Jiao, J. & Dulawa, S. C. (2011). Infant maternal separation impairs adult cognitive performance in BALB/cJ mice. *Psychopharmacology*, 216(2), 207-218.
- Weinberg, J., Smotherman, W. P., & Levine, S. (1978). Early handling effects on neophobia and conditioned taste aversion. *Physiology & Behavior*, 20(5), 589-596.
- Wen, Q., & Chklovskii, D. B. (2008). A cost–benefit analysis of neuronal morphology. *Journal of Neurophysiology*, 99(5), 2320-2328.
- Wigger, A., & Neumann, I. D. (1999). Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiology & behavior*, 66(2), 293-302.
- Wilber, A. A., Southwood, C. J. & Wellman, C. L. (2009). Brief neonatal maternal separation alters extinction of conditioned fear and corticolimbic glucocorticoid and NMDA receptor expression in adult rats. *Developmental neurobiology*, 69(2-3), 73-87.

