



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**EL PAPEL DE LA TROMBOSPONDINA-1 (TSP-1) EN LA FORMACIÓN DE  
ESPINAS DENDRÍTICAS EN RATONES EXPUESTOS A AMBIENTES  
ENRIQUECIDOS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA EN PSICOLOGÍA  
PRESENTA:

**JESSICA NAYELI ROMERO OJEDA**

Director de tesis: DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

Revisora de tesis: DRA. ALEJANDRA EVELYN RUIZ CONTRERAS

Sinodo:

DR. ÓSCAR VLADIMIR ORDUÑA TRUIJILLO

DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO

LIC. KATIA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F. 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 fue desarrollado en el Laboratorio de Neurobiología del Síndrome de Down de la Facultad de Psicología, UNAM.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo y una beca de 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; a la Bióloga Ivonne Sánchez Cervantes y a la Bióloga Irma López Martínez de la Facultad de Medicina, UNAM; por su orientación y sugerencias en la Técnica de Golgi.

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, el haberme educado para ser buen humano en tiempos de crisis y por darme la oportunidad de formarme profesionalmente en la mejor Facultad de Psicología de América Latina.*

*Al Dr. Octavio García, por confiar en mí para desarrollar tan importante e interesante proyecto. Al laboratorio de Neurobiología del Síndrome de Down, por ser ese pequeño espacio que me enseñó a ver de otra forma la vida. A mis compañeros, por los gratos momentos y las enseñanzas que dejaron en mí; y en especial a ti “Janita”, por apoyarme y enseñarme cuando lo requerí, y por tu divertida compañía que hizo ameno todo trayecto, experimento, aprendizaje y comida.*

*Gracias Dr. Vladimir Orduña, Lic. Katia Rodríguez, Dr. César Casasola y Dra. Alejandra Ruiz, por las correcciones y sugerencias que ayudaron a mejorar este escrito.*

*Agradezco su amor, apoyo y paciencia incondicional a mi mamá, a mi papá, a mi pequeño y enorme hermano, y por supuesto, a ti mi compañero y amigo inseparable.*

## DEDICATORIAS

*Con amor y admiración...*

*A ti mamá, porque mis logros han sido fruto de tu carácter y exigencia que resaltan lo mejor de mí. A ti papá, por enseñarme que todo trabajo bien hecho tiene una grata recompensa.*

*A ti Jonathan, porque todos los días me muestras el lado noble y divertido de la vida. Además, porque haces brotar de mí las carcajadas más placenteras*

*A ti Xavier, por ser mi "koza" incondicional, por soportar cualquier faceta de mi personalidad y por recordarme quien soy y quien quiero ser.*

*A mis hermosos cáucacos, Nanuq y Balam, por ser ejemplo de ternura y fortaleza, y por comprometerme más con la vida.*

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
Lista de Abreviaturas	I
Resumen	II
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
1. Trombospondinas	3
1.1 Clasificación de las trombospondinas	3
1.2 La trombospondina-1	4
1.3 Funciones de la trombospondina-1	7
1.4 La trombospondina-1 en el Sistema Nervioso Central	8
2. Espinas dendríticas	11
2.1 Clasificación de las espinas dendríticas	12
2.2 Formación de las espinas dendríticas	13
2.3 Función de las espinas dendríticas	14
2.4 Plasticidad de las espinas dendríticas	15
3. Ambientes Enriquecidos	17
3.1 Efectos de los ambientes enriquecidos en el Sistema Nervioso Central	18
3.2 Efectos específicos de los ambientes enriquecidos en las espinas dendríticas	19
3.3 Efecto terapéutico de los ambientes enriquecidos	20
3.4 Aplicación de los ambientes enriquecidos en el ser humano	22
III. Justificación	25
IV. Pregunta de investigación	26
V. Hipótesis	26

VI. Objetivos	26
VII. Metodología	27
1. Sujetos	27
2. Condiciones experimentales	27
3. Tinción de Golgi	30
3.1 Perfusión	30
3.2 Método rápido de Golgi	31
3.3 Análisis de espinas dendríticas	31
4. Análisis estadístico	32
VIII. Resultados	33
1. Exposición de ratones a ambientes no enriquecidos y a ambientes enriquecidos	33
2. La ausencia de trombospondina-1 produce alteraciones en la morfología de las espinas dendríticas	33
2.1 El número de espinas dendríticas es afectado en ratones KO TSP-1 <sup>-/-</sup> .	34
2.2 Los ambientes enriquecidos incrementan el número de espinas dendríticas en ratones KO TSP-1 <sup>-/-</sup>	35
2.3 Las espinas dendríticas tipo hongo disminuyen en ratones KO TSP-1 <sup>-/-</sup>	37
2.4 Los ambientes enriquecidos incrementan el número de espinas en forma de hongo en ratones KO TSP-1 <sup>-/-</sup>	38
IX. Discusión	41
X. Conclusiones	47
XI. Referencias	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AE</b>	Ambientes Enriquecidos
<b>ANE</b>	Ambientes No Enriquecidos
<b>BDNF</b>	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
<b>ED</b>	Espina Dendrítica
<b>EDd</b>	Espina Dendrítica delgada
<b>EDh</b>	Espina Dendrítica hongo
<b>EDr</b>	Espina Dendrítica regordeta
<b>EDs</b>	Espinas Dendríticas
<b>GDNF</b>	Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales
<b>KO TSP-1<sup>-/-</sup></b>	Ratones carentes de TSP-1
<b>NFG</b>	Factor de Crecimiento Nervioso
<b>NPCS</b>	Neuronas Piramidales de Corteza Somatosensorial
<b>PBS</b>	Salina con Buffer de Fosfato
<b>PFA</b>	Paraformaldheído
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TSP-1</b>	Trombospondina-1
<b>TSP-2</b>	Trombospondina-2
<b>TSP-3</b>	Trombospondina-3
<b>TSP-4</b>	Trombospondina-4
<b>TSP-5</b>	Trombospondina-5
<b>TSPs</b>	Trombospondinas
<b>WT</b>	Ratones Tipo Silvestre



## RESUMEN

La Trombospondina 1 (TSP-1), es una glicoproteína de matriz extracelular involucrada en procesos indispensables del desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC), como la neurogénesis, espinogénesis y sinaptogénesis. La ausencia de TSP-1 afecta la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas (EDs). Las EDs son pequeñas protuberancias que emergen de las dendritas neuronales y se consideran el principal sitio de sinapsis excitadora en el SNC. Las EDs son estructuras móviles y heterogéneas cuya morfología y desarrollo son influenciados por la propia actividad cerebral y la estimulación ambiental, lo que las hace estructuras importantes en la plasticidad sináptica. Los Ambientes Enriquecidos (AE), son un modelo conductual que favorecen la formación de EDs, sin embargo, los mecanismos involucrados en este proceso no se conocen completamente. El objetivo de este trabajo fue conocer la participación de la TSP-1 en la formación de EDs en ratones expuestos a AE. Ratones tipo silvestre (WT) y ratones sin TSP-1 (KO TSP-1<sup>-/-</sup>), fueron expuestos a ANE y a AE durante cinco semanas; después de ese periodo los ratones fueron sacrificados y los cerebros procesados para el método rápido de Golgi. Nuestros resultados muestran que en los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> hay una disminución significativa en el número de EDs respecto a los ratones WT. Sin embargo, los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE aumentaron el número de EDs, pero en menor cantidad a la observada en los ratones WT expuestos a AE. Estos resultados sugieren que la TSP-1 tiene un papel importante pero no exclusivo en la formación de EDs en modelos dependientes de experiencia, como los AE.

## I. INTRODUCCIÓN

Las trombospondinas (TSPs) son una familia de proteínas multifuncionales que se clasifican en dos subgrupos: el subgrupo A formado por la TSP-1 y la TSP-2; y el subgrupo B, que incluye la TSP-3, la TSP-4 y la TSP-5 (Chen et al., 2000).

La trombospondina-1 (TSP-1), es una glicoproteína oligomérica de la matriz extracelular con una estructura trimérica compuesta por diferentes dominios que determinan su multifuncionalidad. La TSP-1 esta formada por un dominio Amino-Terminal (NH<sub>2</sub>), un sitio de unión a procolágeno, una secuencia repetida de tres sitios de unión a properdina, tres sitios de unión a Factor de Crecimiento Epideral (EGF), un sitio de unión a calcio, y un dominio globular Carboxilo-Terminal (COOH) (Chen et al., 2000; Lawler, 2000).

En el Sistema Nervioso Central (SNC), la TSP-1 es sintetizada y secretada por astrocitos (Asch et al., 1986; Christopherson et al., 2005) y es altamente expresada durante las primeras etapas del desarrollo (Christopherson et al., 2005). La TSP-1 está involucrada en la neurogénesis (Lu y Kipnis, 2010), crecimiento de neuritas (Osterhout et al., 1992), crecimiento axonal, arborización dendrítica (O'shea et al., 1991), sinaptogénesis (Christopherson et al., 2005; Hughes et al., 2010; Adams y Lawler, 2011; Risher y Eroglu, 2012) y plasticidad sináptica (Cáceres et al., 2007; Risher y Eroglu, 2012), entre otros procesos. Además, en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> se observa una recuperación deficiente del funcionamiento motor después de una isquemia cerebral, en comparación con los ratones WT (Liau et al., 2008) y una reducción en la proliferación y diferenciación de progenitores neuronales (Lu y Kipnis, 2010). Lo anterior sugiere que la TSP-1 podría tener un papel preponderante en los procesos de desarrollo y plasticidad neuronal. La TSP-1 participa en la formación y maduración de sinapsis (Christopherson et al., 2005; Hughes et al., 2010; Risher y Eroglu, 2012).

Los Ambientes Enriquecidos (AE), son un paradigma conductual que promueven la plasticidad neuronal. Los AE se definen como “una combinación de estímulos inanimados complejos y sociales” (Van Praag et al., 2000; Laviola et al., 2008)

que, con una ambientación compleja y novedosa (Nithianantharajah y Hannan, 2006), inducen el ejercicio voluntario (Faherty et al., 2003) y producen cambios en el SNC (Nithianantharajah y Hannan, 2006).

Particularmente, se ha descrito que la exposición de roedores a AE induce la formación de espinas dendríticas (EDs) y la sinpatogénesis (Van Praag et al., 2000; Faherty et al., 2003; Nithianantharajah et al., 2004). Sin embargo, los mecanismos celulares que subyacen a este proceso no se conocen completamente. Es probable que la TSP-1 participe en la formación de EDs inducidas por la exposición a AE. El objetivo de esta tesis fue mostrar si la formación de EDs en ratones expuestos a AE puede ser modulada por la TSP-1.

## II. ANTECEDENTES

### 1. TROMBOSPONDINAS

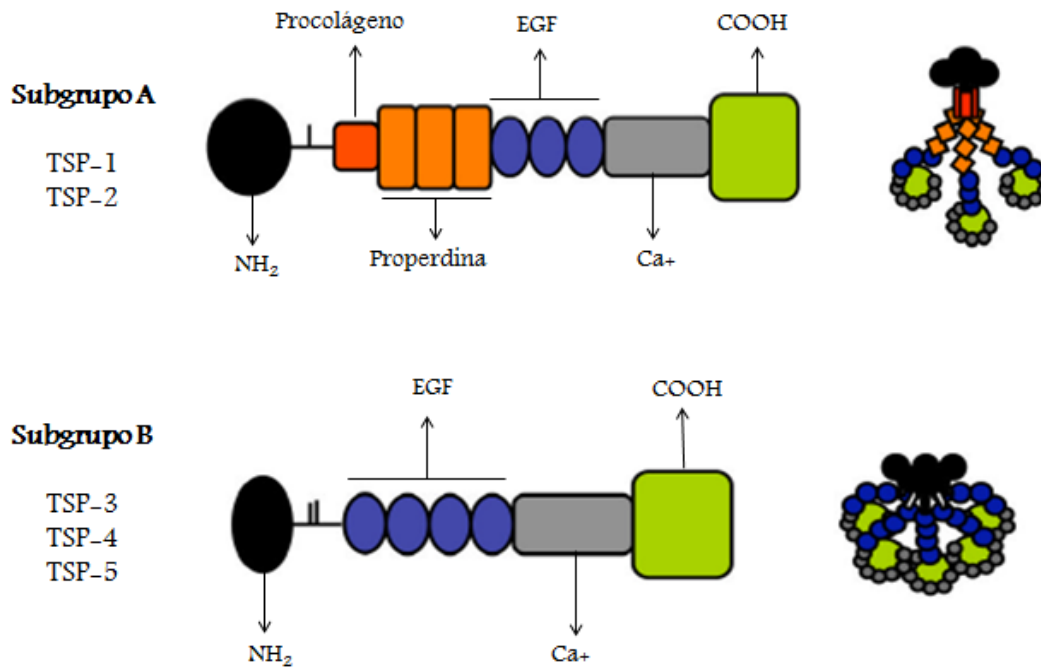
Las trombospondinas (TSPs) son una gran familia de glicoproteínas oligoméricas secretadas por plaquetas o trombocitos en respuesta a la activación de trombina (una enzima que participa en procesos de coagulación) (Raugi et al., 1982; Wight et al., 1985). Las TSPs tienen múltiples sitios de acción que participan en varias funciones biológicas como parte de la matriz extracelular (Bornstein, 2009; Adams y Lawler, 2011; Risher y Eroglu, 2012). Las TSPs median las interacciones célula-célula y célula-matriz (Lawler, 1986; Adams y Lawler, 2011; Risher y Eroglu, 2012), lo que permite su participación en diversos procesos como angiogénesis (Chen et al., 2000; Lu y Kipnis, 2010; Adams y Lawler, 2011; Risher y Eroglu, 2012), organización del citoesqueleto (Chen et al., 2000; Cáceres et al., 2007; Risher y Eroglu, 2012), neurogénesis (Lu y Kipnis, 2010), proliferación celular (O'shea et al., 1991; Chen et al., 2000; Lu y Kipnis, 2010; Risher y Eroglu, 2012), migración celular (O'shea et al., 1991; Osterhout et al., 1992; Chen et al., 2000; Risher y Eroglu, 2012), diferenciación celular (Lu y Kipnis, 2010), crecimiento de neuritas (Osterhout et al., 1992), crecimiento axonal y de la arborización dendrítica (O'shea et al., 1991), adhesión celular (O'shea et al., 1991; Cáceres et al., 2007; Lu y Kipnis, 2010; Adams y Lawler, 2011; Risher y Eroglu, 2012), sinaptogénesis (Christopherson et al., 2005; Hughes et al., 2010; Lu y Kipnis, 2010; Adams y Lawler, 2011; Risher y Eroglu, 2012), plasticidad sináptica (Cáceres et al., 2007), y apoptosis (Chen et al., 2000; Lu y Kipnis, 2010; Adams y Lawler, 2011; Risher y Eroglu, 2012).

#### 1.1 Clasificación de las trombospondinas

Con base a su arquitectura molecular, la familia de las TSPs se divide en dos subgrupos. El subgrupo A, al cual pertenecen la trombospondina-1 (TSP-1) y la trombospondina-2 (TSP-2), ambas proteínas triméricas (Chen et al., 2000; Lawler, 2000); y el subgrupo B, al cual pertenecen la trombospondina-3 (TSP-3), la

trombospondina-4 (TSP-4) y la trombospondina-5 (TSP-5), todas proteínas pentaméricas (Adams y Lawler, 2011).

La TSP-1 y la TSP-2 tienen el mismo conjunto de dominios estructurales. Por el contrario, la TSP-3, la TSP-4 y la TSP-5 carecen del sitio de unión a procolágeno y la repetición de sitios de unión a properina, pero contienen una repetición adicional del sitio de unión a EGF (Chen et al., 2000) (**Figura 1**).

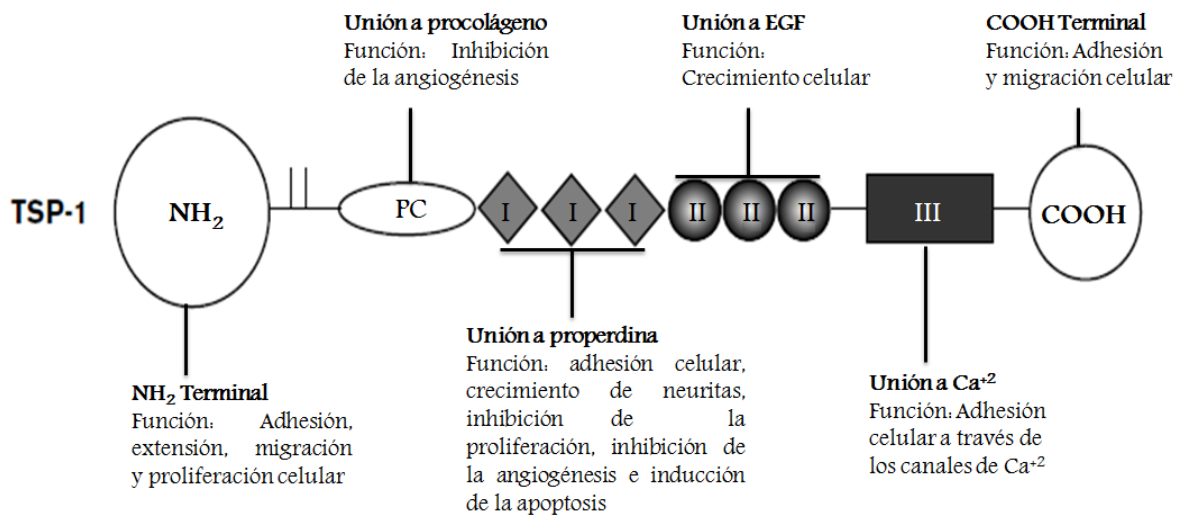


**Figura 1. Estructura molecular de los subgrupos de trombospondinas.** La figura muestra los componentes moleculares de cada grupo de TSPs. El subgrupo A muestra una conformación trimérica, trombospondina-1 (TSP-1) y trombospondina-2 (TSP-2); y el subgrupo B una conformación pentamérica, trombospondina-3 (TSP-3), trombospondina-4 (TSP-4) y trombospondina-5 (TSP-5). Las figuras muestran los principales dominios estructurales identificados en cada subgrupo (Modificado de Eroglu et al., 2009).

## 1.2 La trombospondina-1

La TSP-1 es codificada por el gen *THBS1* (Adams y Lawler, 2011); fue el primer integrante de la familia de las TSPs identificado. La TSP-1 es el mayor componente de las plaquetas en sangre humana (Lawler, 2000) y fue la primera TSP aislada de las plaquetas estimuladas previamente con trombina.

La TSP-1 esta formada por **1)** un dominio Amino-Terminal (NH<sub>2</sub>), el cual participa en la adhesión, extensión, proliferación y migración celular; **2)** un sitio de unión a procolágeno que funciona como subunidad de ensamble para la inhibición de angiogénesis; **3)** una secuencia repetida de tres sitios de unión a properdina (sitio de repetición tipo I), que facilita la adhesión celular, el crecimiento de neuritas, inhibe la proliferación y angiogenesis, y favorece la apoptosis; **4)** una secuencia repetida de tres sitios de unión a Factores de Crecimiento Epideral (EGF) (sitio de repetición tipo II), que favorecen el crecimiento celular; **5)** un sitio de unión a calcio (sitio de repetición tipo III), que favorece la unión celular por medio de los canales de Ca<sup>2+</sup>; y **6)** un dominio globular Carboxilo-Terminal (COOH), que participa en la migración y adhesión celular (Chen et al., 2000; Lawler, 2000) (**Figura 2**).



**Figura 2. Estructura y dominios de la trombospodina-1.** La figura muestra los dominios de la TSP-1, cada dominio tiene una función celular diferente que depende del receptor al que se une (Modificado de Lawler, 2000).

La multifuncionalidad biológica de la TSP-1 está asociada a cada uno de sus dominios que se unen a diversos tipos de receptores (**Tabla 1**). Entre los receptores identificados para la TSP-1 se encuentran: **1)** receptores a integrinas, involucradas en la proliferación, migración y adhesión celular, así como en la función y arquitectura sináptica; **2)** proteínas asociadas a integrinas (IAP) o receptor CD47 (del inglés *Cluster of Differentiation 47*), involucrado en el desarrollo de neuritas, adhesión y migración celular y apoptosis; **3)** receptor CD36 (del inglés *Cluster of Differentiation 36*), involucrado en la apoptosis; **4)** receptor a

lipoproteína de baja densidad (LRP), la cual media el catabolismo de la TSP-1; **5)** proteína Neuroligina que favorece la sinaptogénesis y **6)** proteína Heparina que interviene en el reconocimiento y adhesión celular (Chen et al., 2000; Lawler, 2000; Xu et al., 2010; Risher y Eroglu, 2012) (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Principales receptores de la trombospondina-1.** (Modificado de Risher y Eroglu, 2012).

Dominio de la TSP-1	Receptor	Función
NH <sub>2</sub>	Integrina	Proliferación, migración y adhesión celular, función y arquitectura sináptica
	Neuroligina	Sinaptogénesis
	Heparina	Reconocimiento y adhesión celular
	Lipoproteína de baja densidad (LRP)	Desconocida
Repetición Tipo I	CD36	Apoptosis
Repetición Tipo II	α2δ-1	Sinaptogénesis
Repetición Tipo III	Integrina	Proliferación, migración y adhesión celular, función y arquitectura sináptica
COOH	Proteínas asociadas a integrinas (IAP) o CD47	Crecimiento de neuritas, apoptosis, adhesión y migración celular

La TSP-1 se encuentra presente en todo el cuerpo humano y, del mismo modo, sus receptores. Por ejemplo: la migración de células del músculo liso está mediada a través del receptor CD47 y, por esta misma vía es inhibida (Lawler, 2000). Se ha corroborado que la TSP-1 activa el Factor de Crecimiento Transformante-β (TGFβ), producido por macrófagos alveolares de rata en

respuesta a una lesión producida, formando el complejo TSP-1-TGF $\beta$ , a través del receptor CD36 (Lawler, 2000). El TGF $\beta$  es activado por la TSP-1 y participa en la estabilidad del citoesqueleto (Lawler, 2000) y la movilización de la maquinaria sináptica (Risher y Eroglu, 2012).

Los receptores de TSP-1 más sobresalientes son las integrinas. La integrina  $\alpha_v\beta_3$  es expresada en diferentes tipos de células, media la adhesión celular de la TSP-1 y diversas vías de señalización (DeFreitas et al., 1995), la integrina  $\alpha_3\beta_1$  media el crecimiento de neuritas (DeFreitas et al., 1995) y participa en la respuesta inflamatoria (Chen et al., 2000).

La influencia de los dominios de la TSP-1 sobre la transducción de señales depende del nivel y patrón de expresión del receptor, del estado activo de los receptores y de la respuesta intracelular asociada a cada receptor. A través de estas interacciones, se desencadenan diversas respuestas celulares (Okabe, 2009).

### **1.3 Funciones de la trombospondina-1**

Como mencionamos anteriormente la TSP-1 tiene diversas funciones debido a sus diferentes dominios que permiten su unión a diversos tipos de receptores.

Una de las funciones más sobresalientes la TSP-1 es su participación como inhibidor de la angiogénesis, inhibiendo los procesos de inflamación celular (López-Dee et al., 2011; López-Dee et al., 2012), reduciendo el crecimiento de tumores cancerígenos y evitando la metástasis (Tucker, 2004). En modelos de cáncer de piel, la administración de TSP-1 inhibe el crecimiento de carcinomas y muestra mayor eficacia que la radioterapia (Lawler, 2000).

En ratones carentes de TSP-1 (KO TSP-1<sup>-/-</sup>), se observan enfermedades inflamatorias como neumanía aguda, pancreatitis y complicaciones de colitis aguda (hemorragias) cuando ésta es inducida (López-Dee et al., 2011). La presencia de TSP-1 disminuye los síntomas clínicos de la colitis a través de los tres dominios de unión a properdina (López-Dee et al., 2012). La TSP-1 ha sido



participe en procesos de señalización al disminuir la inflamación celular después de una lesión en el tejido. Por otro lado, la TSP-1 influye en el funcionamiento cardiovascular controlando la presión sanguínea y el pulso sanguíneo a través de la síntesis de Oxído Nítrico (NO), por medio de receptores CD47 y CD36 (Roberts et al., 2012).

En un modelo de osteoartritis en ratones, se demostró el efecto terapéutico de la TSP-1 al disminuir la inflamación celular, disminuir la densidad de las células vasculares e inhibir la filtración de macrófagos reduciendo la severidad de la osteoartritis (Jeng-Long et al., 2010).

En relación con las células endoteliales, la TSP-1 es activadora de la apoptosis y promueve la angiogenesis (Adams y Lawler, 2011; López-Dee et al., 2012). También promueve la adhesión, proliferación y migración de las células de músculo liso y osteoblastos (Adams y Lawler, 2011). Además, se ha observado que la TSP-1 se encuentra involucrada en procesos de organización del citoesqueleto en mioblastos (Chen et al., 2000) y puede regular las vías de señalización dependientes de NO (Adams y Lawler, 2011).

#### **1.4 La trombospondina-1 en el Sistema Nervioso Central**

La TSP-1 es expresada por una amplia variedad de células, sin embargo, en el SNC la TSP-1 es sintetizada y secretada exclusivamente por los astrocitos (Asch et al., 1986; Christopherson et al., 2005).

La síntesis y secreción de TSP-1 se da principalmente durante las primeras etapas del desarrollo, favoreciendo la formación de conexiones neuronales a través del crecimiento axonal y dendrítico (O'shea et al., 1991), así como la formación de sinapsis (Eroglu et al., 2009). Barker y colaboradores (2008), demostraron que en cultivos con astrocitos la actividad sinaptogénica es espontánea en neuronas de rata de edades muy tempranas (5 días postnatales).

Por otro lado, Cawford y colaboradores (2012), demostraron la necesaria participación de la TSP-1 como moduladora pre-sináptica de neuronas

hipocampales. Otro estudio demostró que en corteza cerebral y colículos superiores se observó un incremento de TSP-1 durante el periodo de intensa sinaptogénesis en etapas postnatales en ratas (Yu et al., 2008; Christopherson et al., 2005).

Hughes y colaboradores (2010) demostraron que la incubación de TSP-1 en neuronas hipocampales producen un incremento en la sinaptogénesis glutamatérgica, además de una mejoría en la arborización y alargamiento axonal de neuronas, mientras que los cultivos sin TSP-1 presentaron un incremento en la sinaptogénesis GABAérgica que se adjudica a otros mecanismos; sugiriendo la presencia de la TSP-1 en la formación y mantenimiento de sinapsis excitadoras.

Eroglu y colaboradores (2009) demostraron la participación de la TSP-1 en la formación de sinapsis a través de las interacciones entre los dominios de unión a EGF y el receptor  $\alpha 2\delta$ -1, un receptor a gabapentina. Esta interacción inicia y mantiene la sinaptogénesis en el SNC (Eroglu et al., 2009). Además, altos niveles de gabapentina, que funciona como un antagonista de la TSP, disminuye significativamente la formación de sinapsis en ratones tipo silvestre (WT) y afecta severamente la plasticidad de corteza somatosensorial y la ejecución de pruebas dependientes de experiencia (Eroglu et al., 2009). La participación del dominio EGF-like de la TSP-1 había sido previamente sugerida por Oyasu y colaboradores (2000), quienes refieren la participación de la TSP-1, a través de la proteína NELL2 (que contiene EGF), en el crecimiento axonal y dendrítico en neuronas hipocampales y de la corteza cerebral en ratas. En cerebros maduros, la TSP-1 participa en la proliferación y diferenciación de Células Progenitoras Neurales (CPNs) (Lu y Kipnis, 2010), así como en el mantenimiento de las sinapsis (Pfrieger, 2002; Barker et al., 2008). Tales resultados sugieren que existe una correlación positiva entre la TSP-1 y sus efectos dependientes de plasticidad.

Por otro lado, se ha demostrado que las células gliales regulan el desarrollo de la sinapsis a través del soporte estructural y el cambio de señales (Pfrieger, 2002; Eroglu, 2009). La formación de sinapsis requiere la reorganización de la

membrana y del citoesqueleto de la célula, procesos en los que participa la TSP-1 (Chen et al., 2000; Lawler, 2000; Eroglu, 2009).

Yu y colaboradores (2008), demostraron, en co-cultivos de Células Ganglionales de la Retina (RGCs) con Células Estromales de Médula Ósea (BMSCs), que la expresión de TSP-1 produce el crecimiento de neuritas y aumenta la expresión de sinaptofisina, CD36, MAP-2 y TGF- $\beta$  en oposición a los cultivos carentes de BMSCs. Además corroboraron que el silenciamiento de la TSP-1 inhibe el crecimiento de neuritas de RGCs y disminuye la expresión de sinaptofisina y receptores a TSP-1.

Existen estudios que demuestran que la TSP-1 se expresa en el cerebro de ratones adultos en respuesta a las lesiones cerebrales. La deficiencia de TSP-1 genera déficit en la recuperación del funcionamiento motor después de una isquemia cerebral (Liauw et al., 2008), reduce la proliferación y diferenciación de progenitores neuronales (Lu y Kipnis, 2010) y afecta la morfología y densidad de EDs y sinapsis (García et al., 2010).

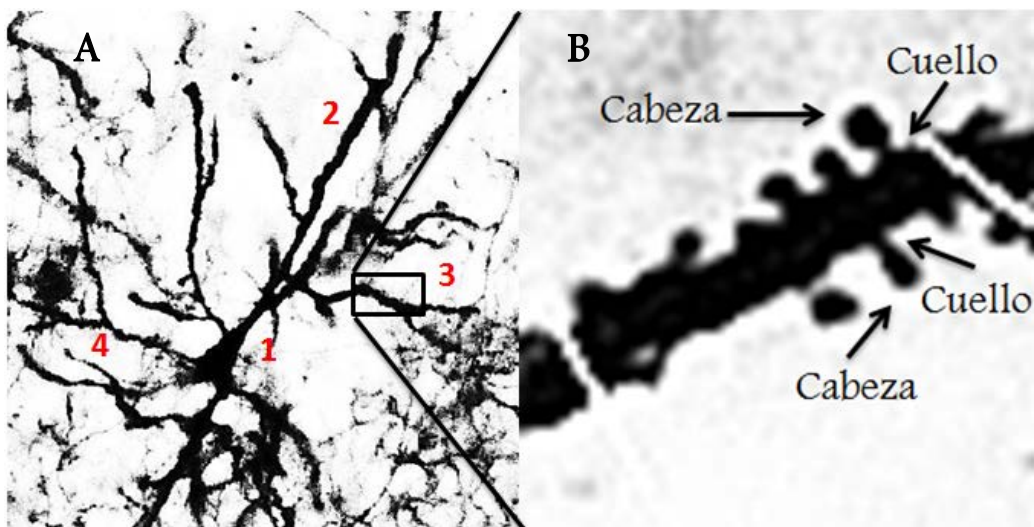
En el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer se observa una reducción significativa de la expresión TSP-1 y una severa pérdida sináptica que se correlacionan con el deterioro cognitivo de los pacientes (Risher y Eroglu, 2012). En el caso de la epilepsia, una desorganización sináptica se asocia con la actividad convulsiva. El efecto de la TSP-1 en los receptores  $\alpha 2\delta$ -1 de gabapentina puede tener implicaciones directas sobre el mecanismo de acción de esta proteína en la actividad epiléptica, lo que sugiere el papel de la TSP-1 en la remodelación sináptica aberrante y un potencial uso terapéutico (Risher y Eroglu, 2012).

La diversidad de estudios referidos demuestra la participación de la TSP-1 en procesos fisiológicos y que la modificación de su expresión se asocia con procesos patológicos del SNC; además sugieren la participación de la TSP-1 en la plasticidad sináptica y en el desarrollo del SNC.

## 2. ESPINAS DENDRÍTICAS

Las espinas dendríticas (EDs) son pequeñas protuberancias que emergen de las dendritas neuronales y se consideran el sitio primario de sinapsis excitadora (**Figura 3**). Santiago Ramón y Cajal fue el primero en describir las EDs y sugirió que eran un elemento clave para formar y mantener las conexiones neuronales (Ballesteros-Yañez et al., 2006; García-López et al., 2007; Soria y Pérez, 2011; Levenga y Willemsen, 2012).

Las EDs se caracterizan por la presencia de una cabeza y un cuello anclado a la dendrita (Hering y Sheng, 2001; Soria y Pérez, 2011; Levenga y Willemsen, 2012) (**Figura 3B**). El cuerpo de las EDs está compuesto principalmente de actina, proteína que forma los microfilamentos del citoesqueleto de la ED (Okabe, 2009; Soria y Pérez, 2011).



**Figura 3. Espinas dendríticas de dendritas apicales de Neuronas Piramidales de la Corteza Somatosensorial (NPCS).** A) Las NPCS se compone por 1) un soma triangular y 2) una dendrita apical principal, ambos característicos de este tipo de neuronas, 3) dendritas apicales, que emergen de la dendrita apical principal y 4) dendritas basales, que emergen del soma y son vecinas del axón de la neurona. El axón de las neuronas piramidales es muy delgado y emerge del soma en posición contraria a la posición de la dendrita apical principal. B) La imagen nos muestra una amplificación de un segmento de dendrita apical de NPCS con diversas EDs. Anatómicamente la ED está constituida por una cabeza y un cuello anclado a la dendrita de la neurona.

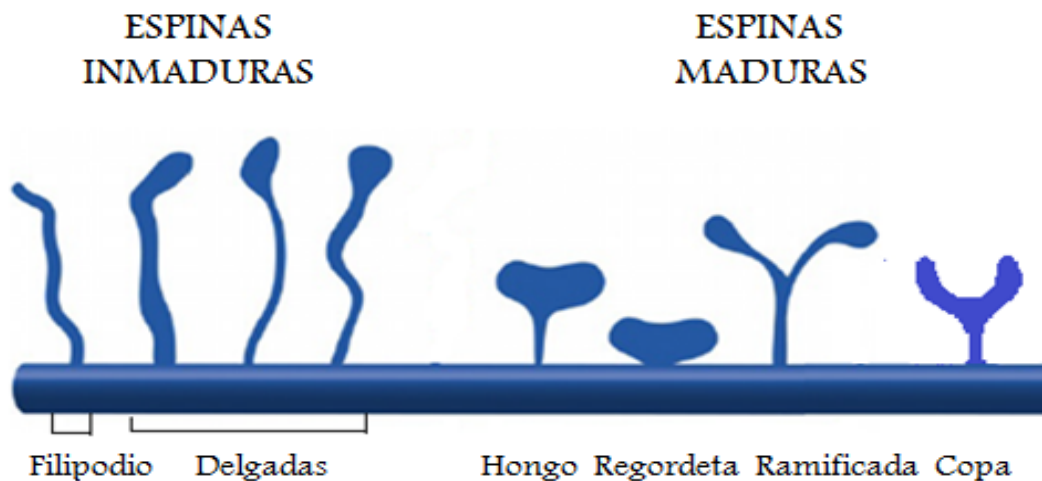
Una ED tiene una longitud entre  $0.2 \mu\text{m}$  y  $2 \mu\text{m}$ , un volumen entre  $0.001 \mu\text{m}^3$  y  $1 \mu\text{m}^3$  y se encuentran de 1 a 10 EDs por  $\mu\text{m}$  de dendrita (Hering y Sheng, 2001;

Soria y Pérez, 2011); su tamaño y forma determinan sus propiedades fisiológicas y afectan directamente las conexiones neuronales (Ballesteros-Yañez et al., 2006).

## 2.1 Clasificación de las espinas dendríticas

Las EDs se han clasificado de acuerdo a su morfología en EDs inmaduras y EDs maduras (Levenga y Willemsen, 2012). Su morfología está determinada por la composición de su citoesqueleto de actina (Hering y Sheng, 2001; Levenga y Willemsen, 2012).

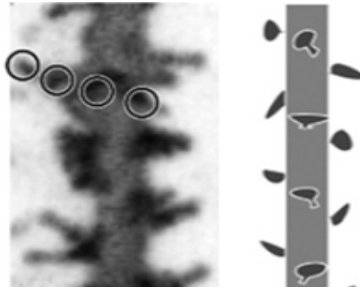
Dentro de las EDs inmaduras se encuentran los *filopodios*, estructuras alargadas y delgadas sin cabeza; y las EDs *delgadas* (EDd), que también son estructuras largas y delgadas pero con una pequeña cabeza. Mientras que en las EDs maduras se encuentran las EDs *regordetas* (EDr), estructuras cortas sin cuello; las EDs *hongo* (EDh), por la forma que le da el cuello y la cabeza; las EDs *copa* (EDc) con cuello y cabeza bifurcada; y las EDs *ramificadas* (EDr) que nacen del mismo cuello pero se separan (Hering y Sheng, 2001; Levenga y Willemsen, 2012) (Figura 4).



**Figura 4. Tipos de espinas dendríticas.** Las EDs se clasifican en espinas inmaduras y espinas maduras de acuerdo a su morfología. Las EDs inmaduras incluyen espinas tipo filipodeos y delgadas, las EDs maduras agrupan EDs con forma de hongo, regordeta, ramificada y copa (Modificado de Levenga y Willemsen, 2012).

Las EDs muestran una distribución en forma helicoidal para evitar que las EDs de una misma dendrita, hagan sinapsis con una única dendrita o un mismo axón

(Yuste, 2011), garantizando el número de conexiones con diferentes neuronas **(Figura 5)**.



**Figura 5. Distribución de las espinas dendríticas.** La distribución helicoidal de las EDs favorece las múltiples conexiones neuronales. Del lado izquierdo se observa una matriz lineal de EDs (círculos) en una dendrita neuronal. Del lado derecho se observa la representación de un patrón helicoidal de EDs a lo largo de una dendrita (Modificado de Yuste, 2011).

## 2.2 Formación de las espinas dendríticas

El desarrollo de las EDs es un proceso secuencial en el que la generación, mantenimiento y retracción de las EDs son el resultado de las interacciones intrínsecas entre los programas genéticos y moduladores externos como neurotransmisores, factores tróficos, receptores glutamatérgicos, etc. (Hering y Sheng, 2001).

La formación de las EDs depende de diferentes mecanismos, por ejemplo: **1)** a través de los receptores N-methyl-D-aspartato (NMDA), las corrientes de  $Ca^{2+}$  activan proteínas que participan en el control del citoesqueleto (Chen et al., 2011), como la debrina A, CaMKII $\beta$  ( $Ca^{2+}$ /Calmodulina Proteína Kinasa II  $\beta$ ) y actina (Okabe, 2009; Soria y Pérez, 2011); **2)** por medio de integrinas, proteínas de matriz extra-celular que funcionan como receptores mediadores en la formación de nuevos filipodios y el crecimiento de la ED a través de la reorganización de actina dependiente de receptores NMDA (Shi y Ethell, 2006); **3)** por medio del receptor EphB a ephrina que participa principalmente en la formación de la cabeza de la ED; **4)** a través de las GTPasas como RhoA, Cdc42, Rac y Rnd1, enzimas que regulan y organizan el citoesqueleto de actina (Okabe, 2009; Soria y Pérez, 2011); y **5)** por medio de astrocitos, que pueden contribuir a la formación, estabilización y

maduración de las EDs, a través del contacto físico con las neuronas (Haber et al., 2006; Nishida y Okabe, 2007).

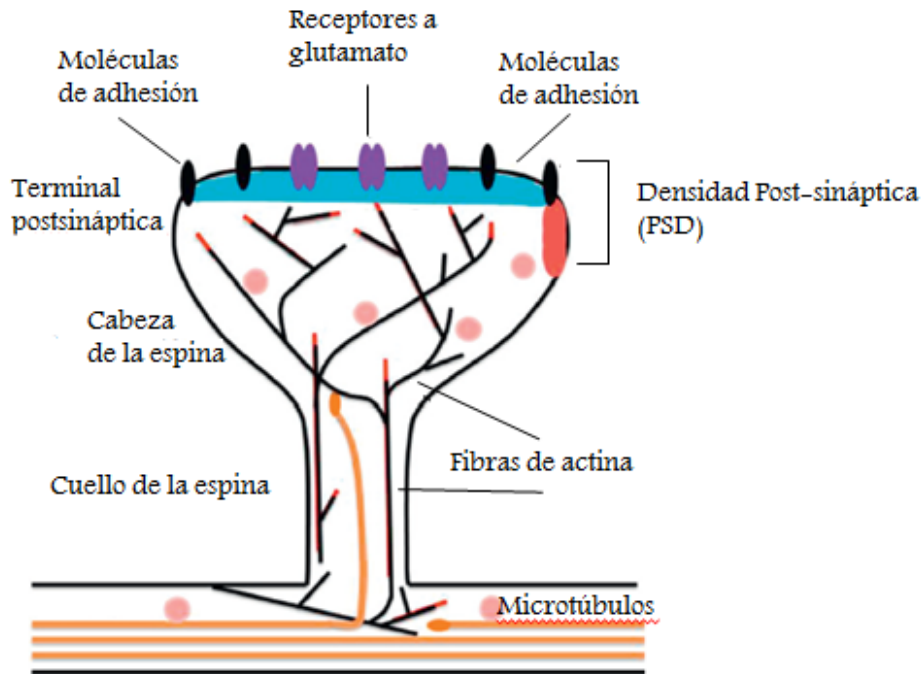
Recientemente se ha demostrado que la TSP-1 sintetizada y secretada por los astrocitos es capaz de modular el desarrollo y el mantenimiento de las EDs (García et al., 2010). La TSP-1 puede alterar la organización del citoesqueleto a través de la muskelina, una proteína intracelular que favorece la movilidad del citoesqueleto de actina (Risher y Eroglu, 2012).

La formación de EDs es un proceso temporal de maduración (García-López et al., 2007), se ha demostrado que los *filipodios* son precursores de las EDs maduras, funcionan como sustitutos temporales para establecer contacto sináptico con el axón mientras maduran y en su lugar aparecen EDs maduras (Ziv y Smith, 1996) donde podrían estar involucrados todos los eventos mencionados.

### **2.3 Función de las espinas dendríticas**

Las EDs son ideales para establecer y regular la fuerza sináptica, transmitir mensajes electrobioquímicos y mejorar la plasticidad de circuitos neuronales a través de los cuales integran información (Yuste, 2011).

Los componentes que poseen las EDs permiten la transmisión del impulso nervioso, incluyen el citoesqueleto de actina y proteínas de densidad post-sináptica (PSD) como el PSD-95, la neuroligina y la SynGap (Proteína de activación sináptica Ras-GTPasa), las cuales se encuentra en la parte superior de la cabeza de la ED frente a la zona presináptica y funcionan como una estructura organizadora, moléculas de adhesión, canales iónicos y diferentes grupos de receptores, como receptores NMDA, receptores AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores EphB (Soria y Pérez, 2011) (**Figura 6**).



**Figura 6. Componentes estructurales de las espinas dendríticas.** El cuello y la cabeza de las EDs están compuestos por filamentos de actina; diversos receptores glutamatérgicos y proteínas de densidad post-sináptica se encuentran concentrados en la parte superior de la cabeza de la ED. (Modificado de Fregozo y Pérez, 2011).

Las neuronas multimodales presentan una densidad de EDs mayor a la de las neuronas unimodales; esta diferencia se atribuye al funcionamiento de cada tipo de neurona: entrada e integración de la información (Clemo y Alex-Meredith, 2012).

La densidad de EDs disminuye conforme madura el cerebro del sujeto, una vez formados y estabilizados los circuitos neuronales, las EDs no funcionales para el organismo desaparecen (Petanjek et al., 2011). Sin embargo, la estimulación constante puede incrementar el número de EDs (Jung y Herms, 2012).

## 2.4 Plasticidad de las espinas dendríticas

El término “plasticidad neuronal” hace referencia a la capacidad que tiene el sistema nervioso para organizar y reestructurar sus funciones. La plasticidad neuronal ha sido atribuida a diferentes mecanismos entre los que destacan la sinaptogénesis, el crecimiento axonal, la arborización dendrítica y el incremento en la producción de factores de crecimiento (Liauw et al., 2008). La composición



estructural de las EDs, permite modificar su morfología y en consecuencia la actividad sináptica, de la misma manera que la actividad sináptica y la morfología de las EDs pueden modificar las estructuras que las componen (Yuste, 2011).

La plasticidad de las EDs es constante durante etapas tempranas del desarrollo (He y Portera-Cailliau, 2012) y disminuye conforme avanza la edad del sujeto (Hering y Sheng, 2001), sin embargo, no se pierde. La morfología de las EDs influye en su función. Se ha postulado que las EDs maduras se encuentran involucradas en procesos de memoria debido a su estabilidad mientras que la plasticidad de las EDs inmaduras favorece el aprendizaje (García-López et al., 2007; Bourne y Harris, 2007).

Estudios de microscopia en tiempo real han demostrado cambios de tamaño y forma de las EDs en el transcurso del tiempo. Bajo los efectos de la Potenciación a Largo Plazo (LTP, del inglés *long-term potentiation*) y la Depresión a Largo Plazo (LTD, del inglés *long-term depression*), las EDs modifican su morfología y densidad (Nägerl et al., 2004). La inducción de la LTP incrementa significativamente la densidad de EDs y modifica su morfología, además de generar un fortalecimiento sináptico después de una larga exposición a LTP (Engert y Bonhoeffer, 1999; Nägerl et al., 2004); mientras que la LTD produce la retracción de las EDs y los filipodios, y reduce su tamaño (Nimchinsky et al., 2002).

La plasticidad de las EDs puede verse modulada por factores y condiciones ambientales como los Ambientes Enriquecidos (AE), en donde ratones expuestos a este tipo de situaciones muestran un incremento en la densidad de EDs y sinapsis (Landers et al., 2011), así como cambios morfológicos (Jung y Herms, 2012), sin importar la edad de los organismos (Bock et al., 2013). Esto sugiere que la estimulación constante favorece el crecimiento de nuevas EDs y la estabilidad de las EDs ya formadas (Fu et al., 2012).

### 3. AMBIENTES ENRIQUECIDOS

Los ambientes enriquecidos (AE) se definen generalmente como “una combinación de estímulos inanimados complejos y sociales” (Van Praag et al., 2000; Laviola et al., 2008). El primero en utilizar el término “Ambientes Enriquecidos”, fue Donal O. Hebb en 1949 (Rosenzweig y Bennett, 1996; Nithianantharajah y Hannan, 2006; Landers et al., 2011), como término experimental. Tiempo después Rosenzweig y colaboradores establecieron el término AE como un concepto científico (Van Praag et al., 2000).

Los AE son un modelo y/o paradigma conductual formado por una ambientación compleja y novedosa (Nithianantharajah y Hannan, 2006), que permite el ejercicio voluntario (Faherty et al., 2003). Generalmente el modelo de AE es para roedores; se conforma por una caja o jaula de exploración de gran tamaño considerando el número de roedores que serán expuestos (depende del objetivo del investigador) (Nithianantharajah y Hannan, 2006; Olsson y Dahlborn, 2002), el número de roedores que se exponen a los AE funciona como enriquecimiento social al inducir la interacción entre iguales (Nithianantharajah y Hannan, 2006), e incluye estímulos físicos y sociales (Goshen et al., 2009), con el objetivo de facilitar la estimulación motora, sensorial y cognitiva (Sztainberg y Chen, 2010; Jung y Herms, 2012).

Los AE incluyen ruedas para correr, tubos de plástico que simulan túneles (Sztainberg y Chen, 2010) y diversos juguetes que difieren en forma, tamaño, textura y color, un compartimento para el alimento y agua y material para construcción de un nido (Nithianantharajah y Hannan, 2006) (**Figura 7**).



**Figura 7. Modelo de ambientes enriquecidos.** Los AE se componen por una caja de exploración con diversos objetos que incluye ruedas para correr, túneles y juguetes que difieren en forma, tamaño, textura y color. (Facultad de Psicología, UNAM, 2013).

Los cambios generados después de la exposición a los AE son considerados “dependientes de experiencia” refiriendo que son el resultado de la interacción activa entre los sujetos y el ambiente (Reynold et al., 2010).

Sin importar el tiempo de exposición, los AE generan efectos a nivel conductual, celular y molecular (Van Praag et al., 2000; Amaral et al., 2008), sin importar edad y condición del sujeto (Goshen et al., 2009), sin embargo, entre más joven sea el sujeto mayores serán los efectos que pueden producir los AE (Rosenzweig y Bennett, 1996).

### **3.1 Efectos de los ambientes enriquecidos en el Sistema Nervioso Central**

Los efectos de los AE pueden variar dependiendo del tipo de enriquecimiento y el tiempo de exposición a AE, ya sea enriquecimiento ambiental o enriquecimiento social (Greenough y Volkmar, 1973a; Greenough et al., 1973b; Turner y Greenough, 1985).

A nivel celular se ha comprobado que los AE incrementan la proliferación de células progenitoras (Sztainberg y Chen, 2010), la neurogénesis y la gliogénesis

(Kempermann et al., 1997). A nivel molecular los AE favorecen el incremento de factores de crecimiento como el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF), Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) y el Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales (GDNF) (Van Praag et al., 2000; Nithianantharajah y Hannan, 2006) e incrementan la expresión de genes relacionados a la función, señalización y plasticidad sináptica, la expresión de proteínas pre y postsinápticas como la sinaptofisina, el PSD-95 y la expresión de receptores sinápticos NMDA y AMPA (Nithianantharajah et al., 2004; Nithianantharajah y Hannan, 2006). También los AE pueden incrementar los niveles de neurotransmisores como la acetilcolina (Ach) (Rosenzweig y Bennett, 1996), la serotonina (5-HT) (Laviola et al., 2008), la noradrenalina (NA) y los opioides (Van Praag et al., 2000), incrementando el fortalecimiento sináptico (Jung y Herms, 2012).

Los AE actúan principalmente en la estimulación sensorial, cognitiva y motora favoreciendo la memoria, el aprendizaje y la ejecución motora (Van Praag et al., 2000). Se ha visto que el desempeño de los roedores en el laberinto de agua y laberinto en "T" es más eficiente cuando son expuestos previamente a AE, que cuando no, y que el uso de la rueda para correr favorece el aprendizaje espacial (Van Praag et al., 2000).

### **3.2 Efectos específicos de los ambientes enriquecidos en las espinas dendríticas**

El crecimiento de EDs en ratones jóvenes y adultos, así como la formación y eliminación de EDs dependiente de experiencia ha sido confirmada recientemente *in vivo* e *in situ* (Jung y Herms, 2012); se ha demostrado que los AE influyen de manera sobresaliente en la densidad y morfología de las EDs. Particularmente, se ha observado que los AE inducen un aumento en la longitud de los árboles dendríticos (Faherty et al., 2003) y las ramificaciones dendríticas (Greenough y Volkmar, 1973a; Greenough et al., 1973b; Faherty et al., 2003), así como el incremento en el número de EDs (Jung y Herms, 2012) y sinapsis (Turner y Greenough, 1985). Resultados similares se han reportado en un modelo de AE

construido en el hábitat natural de los roedores. Esto sugiere un efecto benéfico de las condiciones naturales (Landers et al., 2011).

### **3.3 Efecto terapéutico de los ambientes enriquecidos**

Los AE contribuyen en la reorganización de los circuitos cerebrales (Van Praag et al., 2000), a través del incremento de las EDs. El uso de AE puede ser una estrategia terapéutica y preventiva para disminuir el efecto de un daño cerebral (Laviola et al., 2008).

Los AE han sido utilizados para revertir las lesiones neuroanatómicas que se observan en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas (Van Praag et al., 2000). Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington, sometidos a AE, muestran preservación de la memoria espacial y de trabajo, aprendizaje espacial y reconocimiento de objetos novedosos (Nithianantharajah y Hannan, 2006; Laviola et al., 2008). En estos modelos, también se ha observado que los AE mejoran la actividad motora, incrementan la proliferación y maduración neuronal (Laviola et al., 2008), aumentan los niveles de NFG y sinaptofisina (Nithianantharajah y Hannan, 2006) y promueven la formación de nuevas sinapsis (Rosenzweig y Bennett, 1996).

En modelos de la enfermedad de Parkinson, los roedores sometidos a AE muestran una reducción del temblor, una mejora en la ejecución motora y una reducción de la pérdida de células dopaminérgicas (Laviola et al., 2008; Nithianantharajah y Hannan, 2006). En modelos de epilepsia los AE reducen la apoptosis e incrementan la expresión del GDNF y del BDNF (Nithianantharajah y Hannan, 2006).

Los efectos de los AE en desórdenes del neurodesarrollo no son la excepción. En ratones usados como modelo de síndrome de X frágil se observó un incremento en la arborización dendrítica, en la densidad de EDs (Nithianantharajah y Hannan, 2006), una reducción de conductas estereotipas y un incremento en la conducta exploratoria (Reynold et al., 2010); en modelos de síndrome de Down los AE inducen un incremento en la arborización dendrítica y la densidad de EDs

(Dierssen et al., 2003), además de una mejora en las tareas de memoria y aprendizaje espacial (Reynold et al., 2010), mientras que en modelos del síndrome de Rett se observa una mejora en el desempeño motor (Reynold et al., 2010).

En modelos de autismo con ratas expuestas a ácido valproico (VPA, por sus siglas en inglés), que fueron sometidas a AE, se observó una significativa reducción en hipersensibilidad, locomoción, conductas estereotipadas, latencia de exploración, ansiedad y socialización (Reynolds et al., 2010).

Por otro lado, en ratas sometidas a estrés y posteriormente expuestas a AE se observó un incremento el número de receptores a glucocorticoides en hipocampo, reduciendo los niveles de estrés en comparación con ratas control (Rosenzweig y Bennett, 1996).

El estrés producido por separación materna es utilizado como modelo de depresión, en este modelo, los AE reducen los signos de depresión incrementando los niveles de serotonina y sus receptores (Laviola et al., 2008).

Dentro de los diversos beneficios de los AE esta su papel protector al reducir la apoptosis, facilitar la recuperación cerebral después de una lesión y reducir la probabilidad de morir después de sufrir algún trauma o enfermedad cerebrovascular entre un 10% y 55% (Van Praag et al., 2000). En roedores a los que se les produce daño cerebro-vascular o un traumatismo craneoencefálico, los AE favorecen la proliferación neuronal, el incremento del BDNF y NFG (Nithianantharajah y Hannan, 2006), un incremento en la arborización dendrítica y la recuperación funcional (Petrosini et al., 2009).

Estos estudios sugieren que los AE tienen un papel importante en procesos asociados a la plasticidad neuronal en condiciones fisiológicas y patológicas. Además su uso proporciona la creación y desarrollo de nuevas soluciones farmacológicas y no farmacológicas para lograr sanar estos padecimientos (Laviola et al., 2008).

### 3.4 Aplicación de los ambientes enriquecidos en el ser humano

La estimulación sensorial, motora y cognitiva de humanos se ha usado como técnica terapéutica para mejorar el desarrollo cognitivo y psicomotor de las personas. También es usada como método de rehabilitación para personas con alguna deficiencia cognitiva y/o física adquiridas durante etapas tempranas o tardías del desarrollo (García-Navarro, 2000; Prats-Viñas, 2007), incluso debido a traumatismos (Jones et al., 2009).

El modelo de AE ha servido como sustento científico y experimental para la creación de la llamada “estimulación temprana” (Prats-Viñas, 2007), intervenciones neuropsicológicas (Santos y Bausela, 2005) y el “tratamiento de integración sensorial” (Reynolds et al., 2010). Estos tres métodos buscan estimular al cerebro y mejorar el desempeño cognitivo y conductual del ser humano (**Figura 8**).



**Figura 8. Ambientes enriquecidos para humanos.** La estimulación temprana se basa en el modelo de ambientes enriquecidos. En la figura A) se observa el modelo original de AE para roedores, en la figura B) se observa la adaptación a la estimulación temprana.

La estimulación temprana consiste en un conjunto de técnicas con el objetivo de estimular el neurodesarrollo y potencializar las habilidades físicas y cognitivas (Prats-Viñas, 2007), así como corregir anomalías o retrasos en el desarrollo por ejemplo la parálisis cerebral (García-Navarro et al., 2000). La estimulación temprana es idónea para niños de edades entre 0 y 5 años (Prats-Viñas, 2007).

La intervención neuropsicológica busca mejorar, incrementar o recuperar las habilidades cognitivas, físicas y conductuales de aquellos sujetos que hayan sufrido una lesión cerebral, o simplemente puede ser utilizada para potencializar el funcionamiento de los individuos en la vida cotidiana (Santos y Bausela, 2005).

Con el tratamiento de integración sensorial, el sujeto tiene la oportunidad de interactuar con un ambiente complejo y novedoso que permite la estimulación sensorial y motora guiada por un terapeuta (Reynolds et al., 2010) **(Tabla 2)**.

Es importante conocer de qué manera la estimulación ambiental influye en procesos intrínsecos del SNC, así como descifrar los componentes celulares y moleculares que regulan la actividad cerebral. Además de proveer conocimiento necesario para desarrollar nuevas soluciones que permitan mejorar la calidad de vida de quienes lo requieran.



**Tabla 2. Comparación entre características de los ambientes enriquecidos y el tratamiento de integración sensorial** (Modificado y traducido de Reynolds et al., 2010).

<b>Características</b>	<b>Ambientes enriquecidos</b>	<b>Tratamiento de integración sensorial</b>
Estructura	Espacio adecuado equipado con objetos multisensoriales	Espacio adecuado equipado con elementos multisensoriales y la guía de un terapeuta profesionalmente preparado.
Experiencias sensoriales	Una caja grande equipada con una rueda para correr, túneles, rampas, pelotas.	Lugar espacioso equipado con columpios, rampas, túneles, pelotas
Novedades	Cambios de lugar y posición controlados por el investigador.	Disponibilidad de diferentes materiales, creatividad del terapeuta, y adaptación del espacio dependiendo de la necesidad del sujeto.
Cambios	La complejidad del ambiente favorece la integración sensorial.	El terapeuta debe dirigir al sujeto y aumentar la complejidad de la estimulación.
Actividad	Los animales deben interactuar activamente con los objetos del ambiente.	El sujeto y el terapeuta trabajan en conjunto en la planificación y ejecución de las actividades.
Socialización	Para favorecer la interacción social deben ser expuestos varios animales al mismo tiempo en el mismo ambiente.	La única interacción social necesaria es entre el sujeto y el terapeuta, aunque puede haber más sujetos pero no es necesario.

### III. JUSTIFICACIÓN

Dentro de la Psicología existen diferentes alternativas para intervenir en las alteraciones del sistema nervioso, sobre todo en trastornos del neurodesarrollo, o simplemente para potencializar capacidades. Comúnmente se recurre a aproximaciones neuropsicológicas, terapias conductuales y ocupacionales que buscan mejorar el desempeño cognitivo y conductual, así como mejorías en el ámbito personal y social.

El uso de AE en roedores nos permite establecer una analogía del trabajo que se realiza con humanos cuando son sometidos a procesos como la estimulación temprana o tratamiento de integración sensorial.

La estimulación ambiental favorece el desempeño motor y cognitivo en humanos y roedores, sin embargo, los mecanismos celulares por los cuales se produce este efecto no se conocen totalmente.

Aunque la formación de EDs podría explicar la mejoría de estos procesos, las señales y mecanismos celulares involucrados son desconocidas, por lo que el objetivo de este trabajo es conocer si el desarrollo de las EDs que se observa cuando los ratones son expuestos a los AE es dependiente de TSP-1, proteína involucrada en la sinaptogénesis y espinogénesis.

#### **IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué papel desempeña la TSP-1 en la formación de espinas dendríticas en función de la exposición a AE?

#### **V. HIPÓTESIS**

La ausencia de TSP-1 ocasiona alteraciones en el número y morfología de las espinas dendríticas que pueden revertirse por la exposición a Ambientes Enriquecidos.

#### **VI. OBJETIVO**

##### **Objetivo general**

Conocer la participación de la TSP-1 en la formación de espinas dendríticas de ratones adultos en función de la exposición previa a ambientes enriquecidos.

##### **Objetivos específicos**

- 1) Determinar si la ausencia de TSP-1 produce alteraciones en el número y la morfología de las espinas dendríticas de neuronas piramidales de la corteza somatosensorial.
- 2) Determinar, a partir de su morfología, el tipo de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la corteza somatosensorial que presenta mayores cambios en los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>.
- 3) Determinar si la exposición a ambientes enriquecidos revierte los cambios en el número y la morfología de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la corteza somatosensorial en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>.

## VII. METODOLOGÍA

### 1. Sujetos

Durante este trabajo se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6J, tipo silvestre (WT) y ratones carentes de TSP-1 (KO TSP-1<sup>-/-</sup>). Los ratones fueron separados al destete para mantenerlos en fase de “adecuación ambiental”. Durante una semana todos los ratones se mantuvieron en cajas de acrílico transparente de 30cm x 19cm x 12.5cm, sobre una capa de aserrín, con alimento en pellets y agua *ad libitum*. Durante todo el desarrollo experimental se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2 °C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (7:00 am – 7:00 pm).

El mantenimiento, cuidado y manejo de los ratones siguió los protocolos aprobados por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-200-1999.

### 2. Condiciones experimentales

De manera aleatoria se formaron cuatro grupos experimentales:

- 1) Ratones WT ( $n=4$ ) expuestos a Ambientes No Enriquecidos (ANE)
- 2) Ratones WT ( $n=4$ ) expuestos a Ambientes Enriquecidos (AE)
- 3) Ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> ( $n=4$ ) expuestos a Ambientes No Enriquecidos (ANE)
- 4) Ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> ( $n=4$ ) expuestos a Ambientes Enriquecidos (AE)

El tamaño de la muestra ( $n=4$ ) fue pequeño debido a las características propias de la cepa transgénica KO TSP-1<sup>-/-</sup> con la que se trabajó, es decir, el precio de los ratones, los costos y el tiempo de envío de los ratones, su difícil reproducción, el tamaño de las camadas y el número de crías que sobrevivían dificultaron la posibilidad de contar con un muestreo de mayor tamaño. Lo anterior fue compensado incrementando el número de mediciones por sujeto (108, ver análisis estadístico).

Todas las condiciones experimentales se mantuvieron por 5 semanas a partir del día postnatal 28 y hasta el día 62. Los grupos de ANE se formaron por 2 parejas

de ratones WT y 2 parejas ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>, las cuales fueron colocadas en cajas de acrílico transparente de 30cm x 19cm x 12.5cm sobre una capa de aserrín (**Figura 9A**).

Los grupos en AE se formaron de 4 ratones WT y 4 ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>. Ambos grupos fueron hospedados en cajas de acrílico transparente de 55cm x 25cm x 15cm. Las cajas incluían una capa de aserrín y fueron equipadas con una rueda para correr de hierro de color verde; un tubo de PVC largo simulando un túnel, otro de tamaño mediano y otro más pequeño con solo una entrada, todos de color blanco; pelotas pequeñas de plástico de diferentes colores y algunas con un cascabel; figuras armadas con piezas de madera de diferentes colores pintadas con pintura vegetal; un tobogán de plástico de color amarillo y un “juguete” de plástico de dos colores (amarillo y azul) fueron incluidos dentro de las cajas (**Figura 9B**). Este modelo de AE en ratones ha sido validado previamente (Sztainberg y Chen, 2010).



**Figura 9. Condiciones experimentales para los ratones WT y KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ambientes no enriquecidos y ambientes enriquecidos. A) Exposición a ANE. Cada pareja de**

ratones WT y KO TSP-1<sup>-/-</sup> permaneció en una pequeña caja de acrílico con alimento en pellets y agua *ad libitum*. B) Exposición a AE. Los ratones WT y KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE fueron colocados en una caja de acrílico adecuada con los elementos necesarios para enriquecer el ambiente de los roedores: 1) una rueda para correr, 2) túneles, 3) pelotas y 4) diversas figuras de colores diferentes armadas con piezas de madera.

Los ratones permanecieron en AE durante 5 semanas. Durante este periodo los AE fueron modificados cada tercer día: lunes, miércoles y viernes. Los cambios realizados fueron más complejos conforme el paso del tiempo. La primera semana se usaron algunas piezas de madera, pelotas, un túnel y una rueda para correr, se cambió la posición del túnel y las figura de madera (**Figura 10A**). La segunda semana se incorporaron nuevos objetos, otras piezas de madera y otros túneles, se modificó su posición y ubicación (**Figura 10B**). Para la tercera y cuarta semana se modificó completamente la composición de los AE, durante la tercera semana en la caja 1 de AE se introdujeron pelotas, un tobogan, un juguete, una rueda para correr y túneles de diferentes tamaños fueron colocados en diversas posiciones y ubicaciones (**Figura 10C**); mientras la caja 2 de AE se conformó de pelotas, una rueda para correr y diversas figuras de madera (**Figura 10D**). Esta composición de AE se aplicó de manera invertida durante la cuarta semana; la composición de AE de la quinta semana fue más enmarañada a través de la complejidad de las figuras de madera, el tamaño y posición de los túneles, el uso de pelotas, tobogan, juguete y rueda para correr (**Figura 10E**).

Al término del periodo experimental, los ratones de todos los grupos fueron sacrificados y los cerebros fueron extraídos y procesados por el método rápido de Golgi.



**Figura 10. Exposición a ambientes enriquecidos.** Modificación a lo largo de 5 semanas de exposición a AE. La figura A) ilustra la primera semana de AE, la figura B) ilustra la segunda semana de AE, las figuras C) ilustra la tercera semana de AE, la figura D) ilustra la cuarta semana de AE y la figura E) ilustra la quinta semana de AE.

### 3. Tinción de Golgi

El análisis de las EDs en los cerebros de ratón se realizó a través del método rápido de Golgi (Valverde, 1970; Ávila-Costa et al., 1999), bajo el siguiente protocolo.

#### 3.1 Perfusiones

Después de que los ratones permanecieron 5 semanas en condiciones experimentales, los animales fueron anestesiados con una sobredosis (>80 mg/kg, i.p.) de pentobarbital sódico (Pet's Pharma, USA); posteriormente fueron perfundidos vía cardíaca con solución salina 0.9% y fijados con PFA/PBS 4%

(Paraformaldehído 4% con un Buffer de Fosfato 0.1M, (pH 7.4) (Sigma). Los cerebros fueron removidos y fijados nuevamente con PFA/PBS 4% por 12 horas para ser procesados por el método rápido de Golgi.

### **3.2 Método rápido de Golgi**

Después de la fijación en PFA/PBS 4% los cerebros fueron cortados para trabajar con corteza somatosensorial (1.70 mm anterior a -2.0 mm posterior, área de Bregma) (Paxinos, 2004). Cada trozo de cerebro fue procesado con el método rápido de Golgi (Valverde, 1970; Ávila-Costa et al., 1999), de los cuales se obtuvieron rebanadas coronales de 90  $\mu$ m. El método rápido de Golgi se realizó de la siguiente manera:

De acuerdo a su condición experimental los tejidos fueron puestos en solución de Osmio (Tetraóxido de Osmio 0.3% y Dicromato de Potasio 3%) (Electron Microscopy Sciences) durante 6 días, seguidos de una inmersión en Nitrato de Plata 0.75% (Electron Microscopy Sciences) por 24 horas. Después de este periodo, rebanadas coronales de 90  $\mu$ m fueron procesadas para ser reveladas de la tinción, sumergidas en alcohol absoluto (J. T. Baker, México) por 10 minutos (2 veces), seguido de esencia de clavo (Cosmopolitan, México), durante 10 minutos y posteriormente en Xilol (Hycel, México) por 10 minutos. Después de este proceso los cortes fueron montados en portaobjetos (aproximadamente 9 cortes por portaobjeto) y cubiertos con Entellan (Merck Millipore, USA) se fijó el cubreobjetos. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente aproximadamente durante 5 días.

### **3.3 Análisis de espinas dendríticas**

El análisis cuantitativo y morfológico de las EDs se realizó a través de diversas imágenes de cerebros teñidos con tinción de Golgi que fueron capturadas con una cámara digital (Euromex microscopes, Holanda) y un microscopio óptico (US MICROS IV, Holanda). Las imágenes capturadas fueron procesadas en el programa ImagenFocus v3.0, se analizaron 4 cerebros de ratón por grupo y 27 neuronas por cerebro; solamente las neuronas que mostraron una impregnación



completa del árbol dendrítico y que estuvieron relativamente aisladas de neuronas vecinas fueron seleccionadas para el análisis cuantitativo.

El análisis de las EDs se realizó en la dendrita apical secundaria y terciaria de neuronas piramidales de la capa III y V de la corteza somatosensorial. El número de EDs fue cuantificado manualmente y el análisis morfológico se basó en la clasificación propuesta por Hering y Sheng (2001). Los datos fueron normalizados en segmentos de 10  $\mu\text{m}$  de largo de dendrita.

#### **4. Análisis estadístico**

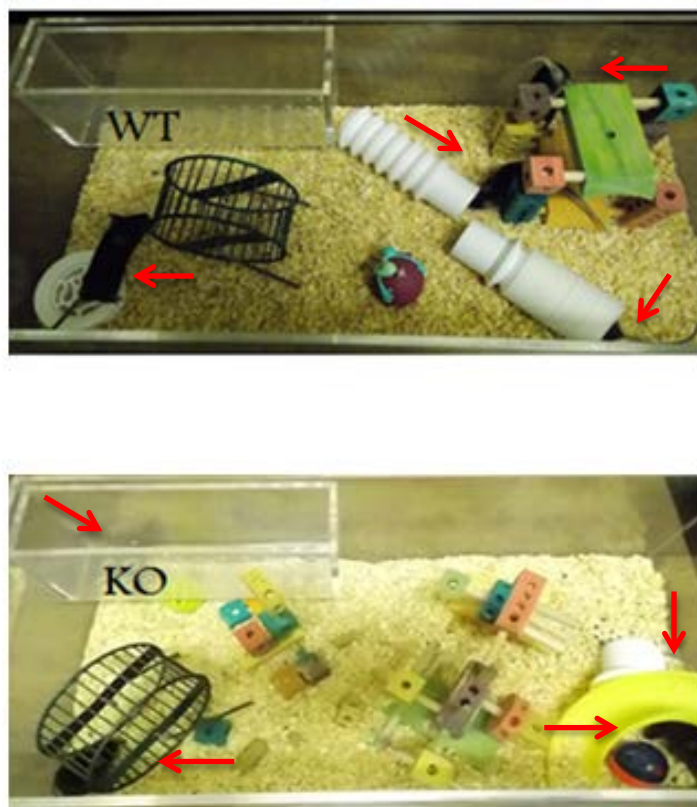
Ratones WT y ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> fueron expuestos a ANE y a AE. Se formaron 4 grupos experimentales, cada grupo experimental fue constituido por 4 ratones. Se seleccionaron 9 cortes de cerebro por ratón, y se analizaron 3 neuronas piramidales de corteza somatosensorial (capas III y V) por corte. Ciento ochenta neuronas piramidales de la corteza somatosensorial conformaron la *n* de cada grupo experimental para el análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el Software IBM SPSS Statistics 20 y STATISTICA 12. Se realizaron ANOVAs de dos vías con el objetivo de comparar entre los cuatro grupos el número total de EDs y el número de EDs por tipo de morfología. Los análisis Post Hoc se realizaron con la prueba de Tukey HSD. El software G\*POWER 3.0.1.0 demostró que la prueba estadística elegida tuvo poder estadístico significativo (0.95). La distribución normal de los datos se corroboró con la prueba de Kolmogorov-Smirnov (0.12) y la prueba de Levene aseguró la homogeneidad de varianza (0.67). Los resultados fueron expresados en media  $\pm$  error estándar, y la significancia se aseguró con  $p < 0.05$ .

## VIII. RESULTADOS

### 1. Exposición a ambientes no enriquecidos y a ambientes enriquecidos

Observaciones no cuantificadas permitieron identificar que los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> muestran menos actividad cuando son expuestos a AE en comparación con los ratones WT. Diferencias que no son perceptibles cuando ambos ratones son expuestos a ANE.

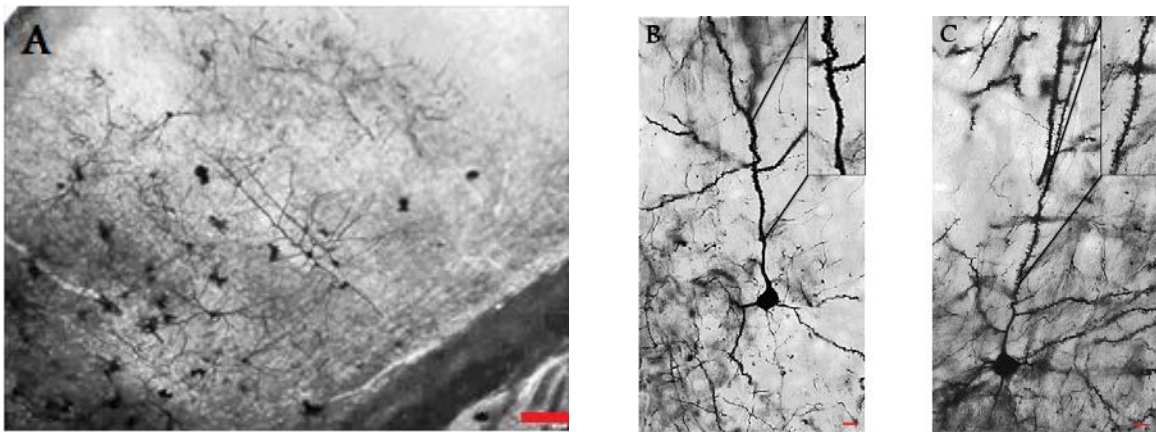


**Figura 11. Ratones WT y ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ambientes enriquecidos.** En la figura se puede observar las diferencias entre ambos grupos de roedores, todos los ratones tienen la misma edad y llevan 2 semanas de exposición a AE. Los ratones WT se muestran más activos después de haber modificado los AE, por el contrario, los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> no muestran actividad y se refugian en las esquinas de la caja de AE. Las flechas indican la posición de los ratones.

### 2. La ausencia de trombospondina-1 produce alteraciones en la morfología de las espinas dendríticas

Un análisis cualitativo de la impregnación argéntica en cerebros de ratones WT y KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ANE fue realizado previamente. Los resultados muestran

una excelente impregnación en los cuerpos y procesos celulares, incluyendo las EDs (**Figura 12A**). Como se muestra en la **figura 12B** el cuerpo celular de las Neuronas Piramidales de la Corteza Somatosensorial (NPCSs), de ratones WT mostró un soma triangular bien definido, así como las dendritas basales y apicales cubiertas por EDs. Las NPCSs de los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> también muestran un soma triangular bien preservado, sin embargo, las dendritas tienden a ser más delgadas que las de los ratones WT (**Figura 12C**). Una magnificación de las dendritas muestra menor número de EDs en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>. Estos resultados muestran que la ausencia de TSP-1 altera la morfología de las neuronas y EDs.



**Figura 12. Neuronas Piramidales de la Corteza Somatosensorial teñidas por el método rápido de Golgi.** A) Fotografía representativa de corteza somatosensorial a 10X. Escala de la barra 100 µm. B) Las NPCSs de ratones WT muestran un axón característico en la parte inferior del soma de la neurona, dendritas basales aledañas al axón que emergen del soma y dendrita apicales que brotan de la dendrita apical principal. Imagen 40X. Escala de la barra 10 µm C) En las NPCSs de ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> se observan los mismos elemento. Imagen 40X. Escala de la barra 10 µm.

## 2.1 El número de espinas dendríticas es afectado en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>

Dado que la morfología general de la neurona se ve afectada en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ANE, en este trabajo investigamos con mayor detalle el grado de alteración que se observa en las EDs. Nuestros resultados muestran una disminución en el número de EDs en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> comparado con los ratones WT (**Figura 13**).

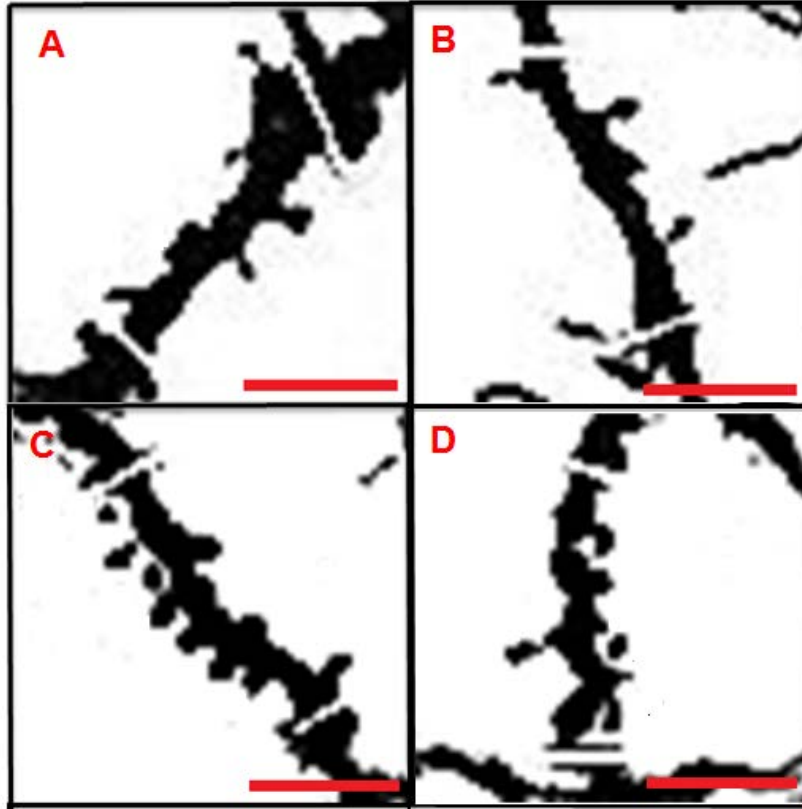
El ANOVA de dos vías demostró que tanto el tipo de ratón ( $F_{(1,428)}=223.07$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=680.01$ ,  $P=1.00$ ) como el tipo de ambiente ( $F_{(1,428)}=393.65$ ,

**p=0.0001**, MS=1200.00, P=1.00) producen un efecto significativo sobre el número total de EDs, así como la interacción entre ambos factores ( $F_{(3,428)}=8.53$ , **p=0.0001**, MS=26.01, P=1.00).

El análisis estadístico demostró que los ratones WT expuestos a ANE tienen en promedio  $6.21 \pm 0.16$  EDs; mientras que los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ANE muestran un promedio de  $4.19 \pm 0.16$  EDs. El análisis estadístico muestra que esta diferencia es estadísticamente significativa ( $F_{(3,428)}=208.42$ , **p=0.0001**, MS=635.34, **HDS=0.000008**, P=1.00) (**Figura 14**).

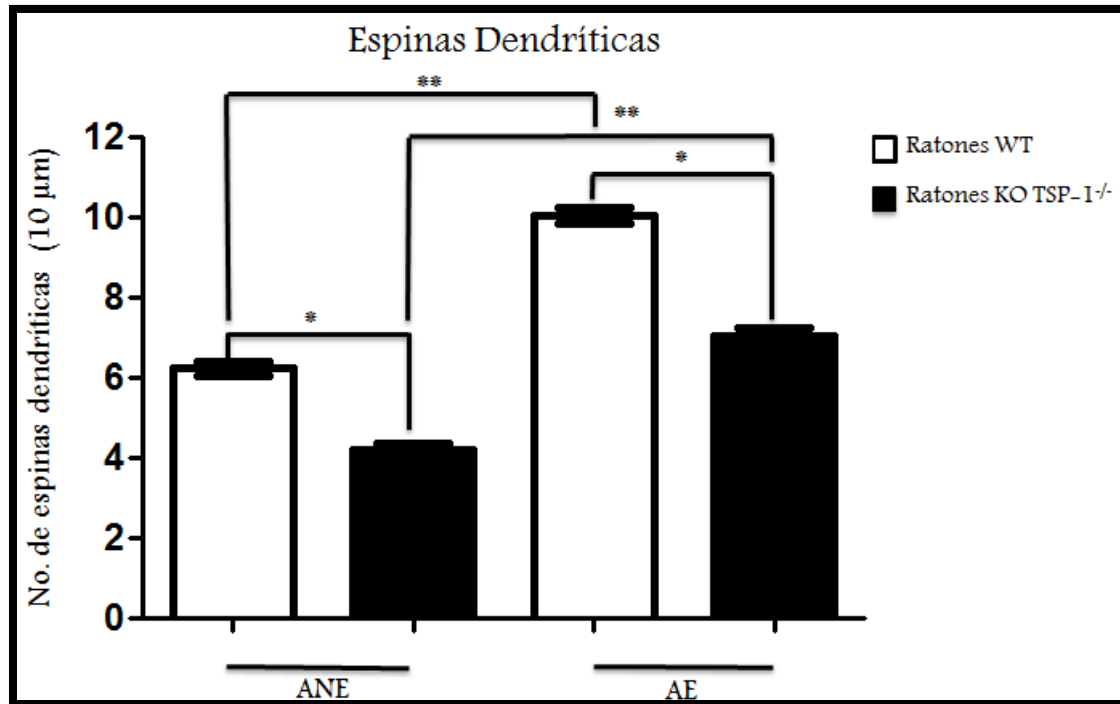
## **2.2 Los ambientes enriquecidos incrementan el número de espinas dendríticas en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>**

La densidad y morfología de las EDs se ven modificada por la exposición a los AE (Landers et al., 2011). Nosotros expusimos ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> a AE con el fin de determinar si el déficit de EDs observados en estos ratones es revertido. Nuestros resultados muestran que el número de EDs de ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE ( $7.04 \pm 0.16$ ) es significativamente inferior ( $F_{(3,428)}=208.42$ , **p=0.0001**, MS=635.34, **HDS=0.000008**, P=1.00) al número de EDs observado en ratones WT expuestos a las mismas condiciones ( $10.04 \pm 0.16$ ) (**Figura 13**). Sin embargo, tanto los ratones WT como los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE, mostraron un incremento estadísticamente significativo en el número de EDs con respecto a los ratones expuestos a ANE ( $F_{(3,428)}=208.42$ , **p=0.0001**, MS=635.34, P=1.00) (**Figura14**).



**Figura 13. Densidad y morfología de las espinas dendríticas de ratones WT y KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ambientes no enriquecidos y a ambientes enriquecidos.** La imagen muestra un segmento representativo de 10 μm de dendrita neuronal correspondientes a A) Ratones WT expuestos a ANE, B) Ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ANE, C) Ratones WT expuestos a AE, D) Ratones expuestos a Ambientes Enriquecidos. Imagen 40X. Escala de barra 5μm.

El análisis estadístico demostró que existen diferencias significativas ( $F_{(3/428)}=208.42$ ;  $p=0.0001$ ;  $MS=635.34$ , **HDS=0.002953**,  $P=1.00$ ) entre el número de EDs de los ratones WT expuestos a ANE ( $6.21 \pm 0.16$ ) y el número de EDs de los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE ( $7.04 \pm 0.16$ ) (**Figura 14**). El número de EDs de los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE ( $7.04 \pm 0.16$ ), incrementó un 68% con respecto a los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ANE ( $4.19 \pm 0.16$ ) ( $F_{(3,428)}=208.42$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=635.34$ , **HDS=0.000008**,  $P=1.00$ ). Sin embargo, este incremento no alcanzó el número de EDs observado en los ratones WT expuestos a AE ( $10.04 \pm 0.16$ ) (**Figura 14**).



**Figura 14. Número total de espinas dendríticas.** Los datos graficados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar, \* $p < 0.05$  relativo al tipo de ratón: WT o KO TSP-1<sup>-/-</sup>, \*\*  $p < 0.05$  relativo al tipo de ambiente: ANE o AE.

### 2.3 Las espinas dendríticas tipo hongo disminuyen en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>

Las EDs pueden ser clasificadas de acuerdo a su morfología en filipodios, delgadas, regordetas, hongo, copa y ramificada (Hering y Shen, 2001; Levenga y Willemsen, 2012).

Nosotros previamente observamos que los principales tipos de EDs localizados en ratones WT y ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> fueron ED regordetas (EDr), ED delgadas (EDd) y ED en forma de hongo (EDh) (**Figura 15**). Debido a que la morfología y el número de las EDs cambia con el ambiente y la actividad sináptica, se realizó un análisis detallado de la morfología de las EDs de ratones WT y ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ANE.



**Figura 15. Morfología de las espinas dendríticas.** La imagen representa un segmento de dendrita de un ratón WT, en ella se puede observar la morfología de EDs que se observa en ratones WT y ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> **1)** ED delgadas (EDd) **2)** ED hongo (EDh) **3)** ED regordetas (EDr). Imagen a 40X. Escala de barra 5  $\mu$ m.

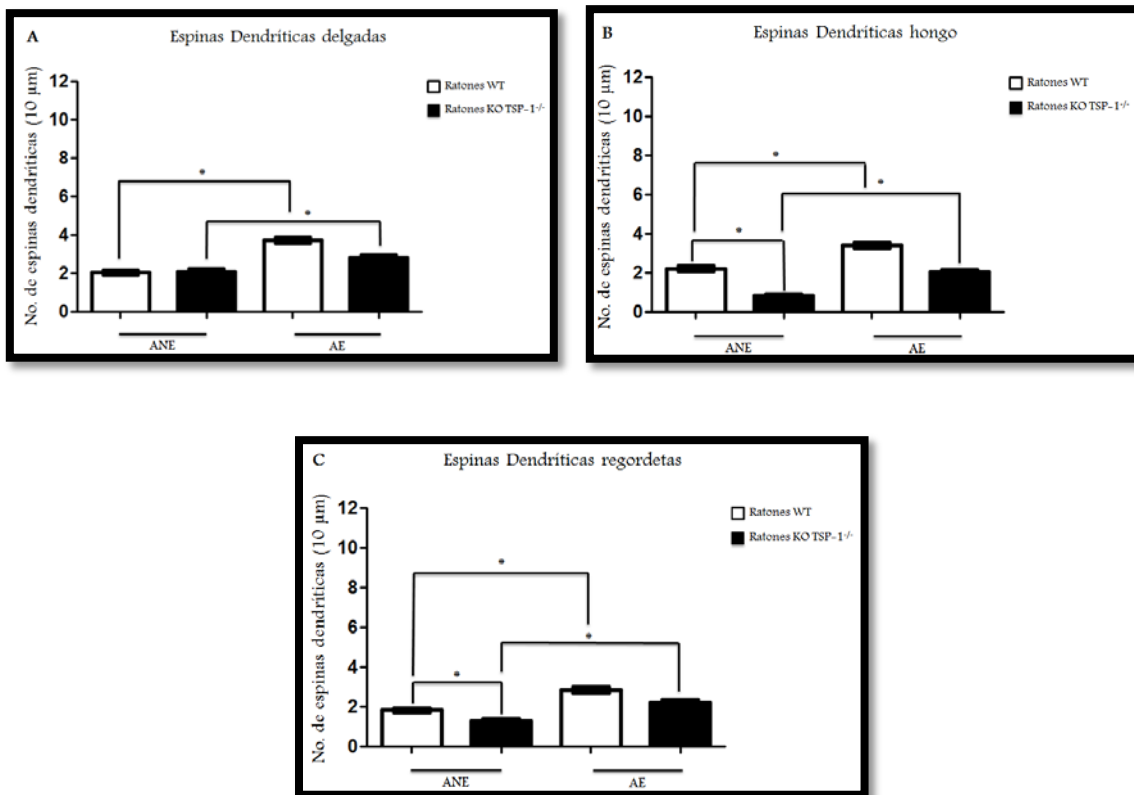
En este trabajo se observó que en condiciones de exposición a ANE no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de EDd entre los ratones WT ( $2.03 \pm 0.15$ ) y los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> ( $2.08 \pm 0.15$ ) ( $F_{(3/428)}=27.60$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=66.06$ , **HDS=0.993572**,  $P=1.00$ ). Y si en el número de EDr (WT  $1.81 \pm 0.14$ ; KO TSP-1<sup>-/-</sup>  $1.28 \pm 0.14$ ) ( $F_{(3/428)}=22.53$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=46.35$ , **HDS=0.030246**,  $P=1.00$ ). Sin embargo, los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> tienen una disminución, aún más significativa, de EDh respecto a los ratones WT (WT  $2.20 \pm 0.13$ ; KO TSP-1<sup>-/-</sup>  $0.82 \pm 0.13$ ) ( $F_{(3/428)}=67.66$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=119.82$ , **HDS=0.000008**,  $P=1.00$ ) (**Figura 16**).

#### **2.4 Los ambientes enriquecidos incrementan las espinas dendríticas en forma de hongo en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>**

Los ratones WT expuestos a AE presentaron diferencias significativas en el número de EDd ( $F_{(3/428)}=27.60$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=66.06$ , **HDS=0.000008**,  $P=1.00$ ), EDr ( $F_{(3/428)}=22.53$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=46.35$ , **HDS=0.000009**,  $P=1.00$ ) y EDh ( $F_{(3/428)}=67.66$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=119.82$ , **HDS=0.000008**,  $P=1.00$ ) con respecto a los ratones WT expuestos a ANE (EDd, ANE  $2.03 \pm 0.15$ , AE  $3.70 \pm 0.15$ ; EDr, ANE  $1.81 \pm 0.14$ , AE  $2.83 \pm 0.14$ ; EDh, ANE  $2.20 \pm 0.13$ , AE  $3.40 \pm 0.13$ ).

Al igual que los ratones WT, los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE tuvieron un incremento en el número de EDd (ANE  $2.08 \pm 0.15$ , AE  $2.78 \pm 0.15$ )

estadísticamente significativo ( $F_{(3/428)}=27.60$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=66.06$ , **HDS=0.005377**,  $P=1.00$ ) (**Figura 16A**); así como en el número de EDr (ANE  $1.28 \pm 0.14$ , AE  $2.20 \pm 0.14$ ) ( $F_{(3/428)}=22.53$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=46.35$ , **HDS=0.000019**,  $P=1.00$ ) (**Figura 16C**). De manera interesante el número de EDh que se observó en los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ANE casi se triplicó cuando los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> fueron expuestos a AE (ANE  $0.82 \pm 0.13$ , AE  $2.03 \pm 0.13$ ), las diferencias observadas son estadísticamente significativas ( $F_{(3/428)}=67.66$ ,  $p=0.0001$ ,  $MS=119.82$ , **HDS=0.000008**,  $P=1.00$ ) (**Figura 16B**).



**Figura 16. Número de espinas dendríticas clasificadas de acuerdo a su morfología.** Las gráficas muestran el número de A)EDd, B)EDh y C)EDr, de ratones WT y ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>, en condiciones de ANE y AE. Los animales expuestos a AE muestran un incremento significativo en el número de los tres tipos de EDs. Los valores de las gráficas representan el número promedio de EDs  $\pm$  error estándar en un segmento de 10  $\mu$ m de dendrita neuronal, \*  $p < 0.05$  relativo al tipo de ratón WT o KO TSP-1<sup>-/-</sup>.

El análisis estadístico demostró que el tipo de ratón (EDd  $F_{(1/428)}=8.55$ ,  **$p=0.004$** ,  $MS=20.45$ ,  $P=0.83$ ; EDr  $F_{(1/428)}=17.86$ ,  **$p=0.0001$** ,  $MS=36.75$ ,  $P=0.99$ ; EDh  $F_{(1/428)}=115.30$ ,  **$p=0.0001$** ,  $MS=204.19$ ,  $P=1.00$ ) y el tipo de ambiente (EDd



$F_{(1/428)}=63.39$ ,  **$p=0.0001$** ,  $MS=151.70$ ,  $P=1.00$ ; EDr  $F_{(1/428)}=49.62$ ,  **$p=0.0001$** ,  $MS=102.08$ ,  $P=1.00$ ; EDh  $F_{(1/428)}=87.68$ ,  **$p=0.0001$** ,  $MS=158.28$ ,  $P=1.00$ ) produjeron efectos significativos sobre el número de los tres tipos de EDs. Sin embargo, la interacción entre ambos factores no tuvo efecto significativo sobre el número de EDr ( $F_{(1/428)}=0.11$ ,  **$p=0.74$** ,  $MS=0.23$ ,  $P=0.06$ ) y el número de EDh ( $F_{(1/428)}=0.001$ ,  **$p=0.97$** ,  $MS=0.002$ ,  $P=0.05$ ). Por el contrario, la interacción entre el factor ratón y el factor ambiente sí tuvo efecto significativo sobre el número de EDd ( $F_{(1/428)}=10.87$ ,  **$p=0.001$** ,  $MS=26.01$ ,  $P=0.99$ ).

## IX. DISCUSIÓN

La TPS-1 es una glicoproteína de matriz extracelular que participa en el desarrollo del SNC (Risher y Eroglu, 2012) y en procesos de plasticidad neuronal (Liau et al., 2008); además, está involucrada en la formación y mantenimiento de las EDs y las sinapsis (Christopherson et al., 2005; Hughes et al., 2010). Los AE contribuyen a la formación y reorganización de los circuitos neuronales con el incremento de las EDs (Jung y Herms, 2012). Sin embargo, la relación entre TSP-1 y la formación de EDs dependiente de experiencia, no se ha establecido.

Las observaciones no cuantificadas durante la exposición de ratones WT y ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> a AE, mostraron que los ratones WT tienen más conducta activa a diferencia de nuestro ratón modelo, que se mostró menos activo. A pesar de que los AE favorecieron la formación de EDs en ambos tipos de ratón, los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> exploraron únicamente durante los primeros minutos que fueron expuestos a los AE y por periodos cortos, después permanecieron ocultos dentro de los túneles o en las esquinas de la caja.

Debido al objetivo de este trabajo y a la no cuantificación de los datos observados, nosotros no profundizamos en el análisis conductual. Sin embargo, cambios en la morfología neuronal, producidas por el ambiente sin tener un efecto conductual han sido reportados previamente (Pascual y Bustamante, 2013; Aumann et al., 2013). Sugiriendo que no necesariamente los AE mejoran el desempeño conductual de los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>.

La manipulación farmacológica con agonistas colinérgicos en ratones puede alterar la actividad exploratoria e inducir conductas relacionadas con la ansiedad (Mesa-Gresa et al., 2014). Los agonistas colinérgicos, como el carbacol producen cambios en la secreción de TSP-1 (Moore et al., 2009). Los ratones deficientes de TSP-1 tienen una alta sensibilidad al carbacol, que influye directamente en la expresión de diversos receptores a citocinas (Contreras-Ruiz et al., 2013). Se ha demostrado que cambios en los niveles de citocinas pueden reducir o incrementar conductas asociadas a la ansiedad a través de cambios en los sistemas de

neurotransmisión (Acharjee et al., 2013; Miller et al., 2013; Lima et al., 2014). Las conductas asociadas a ansiedad en los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> podrían estar vinculadas con cambios en el sistema colinérgico. Nuevas investigaciones podrían ser desarrolladas para conocer si niveles de citocinas en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> así como cambios en la actividad colinérgica están relacionados con las observaciones conductuales en este trabajo.

En este trabajo comprobamos que los AE favorecen la formación de EDs como uno de los eventos involucrados en la plasticidad neuronal (Nithianantharajah y Hannan, 2006). Demostramos que los AE incrementan el número de EDs en ratones WT y en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>. En los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>, el aumento en el número de EDs debido a los AE lleva a un número similar de EDs observado en ratones WT expuestos a ANE; sugiriendo un papel importante pero no determinante de la TSP-1 en la formación de EDs. Estos datos son concordantes a los registrados por Dierssen y colaboradores (2013), donde han encontrado que los AE tienen poco efecto en las neuronas piramidales neocorticales de un modelo de síndrome de Down, posiblemente por alteraciones en genes involucrados en la espinogénesis y control dendrítico como los genes *DSCAM*, *TIAM1*, *APP* y *TTC3* (Haas et al., 2013). Estas alteraciones también se han visto en modelos de síndrome de X frágil, donde la ausencia del gen *Fmr1* altera la densidad de EDs (Levenga y Willemsen, 2012).

En este trabajo nosotros observamos que la falta del gen de la TSP-1 (*THBS1*), afecta el número y morfología de las EDs, aunque los mecanismos involucrados en su plasticidad no se encuentran alterados. La estimulación de los AE promueve el aumento de EDs, sugiriendo que el gen *THBS1* puede tener un papel muy importante durante el desarrollo de la espinogénesis pero no exclusivo, otros genes y otras proteínas pueden compensar la ausencia de TSP-1. Factores de crecimiento tales como el NFG, GDNF y BDNF cuya participación en el desarrollo del SNC y en la formación de EDs y en modelos de AE (Nithianantharajah y Hanna, 2006), podrían estar involucrados en la formación de EDs de ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>.

Adicionalmente, otras proteínas de la familia de las TSPs podrían tener una participación en la espinogénesis (Risher y Eroglu, 2012). Particularmente la TSP-3 y la TSP-4 (Adams y Lawler, 2011) tienen un papel importante en el SNC adulto, por lo que se podría tener un mecanismo de compensación, es decir, durante las primeras etapas del desarrollo la formación de EDs y sinapsis podría ser dependiente de la TSP-1 y en etapas adultas de la TSP-3 y la TSP-4. Las diferencias significativas que se presentan en el número de EDs entre los diferentes grupos experimentales podrían ser resultado de la estimulación en periodos críticos de desarrollo del SNC, ya que los ratones fueron expuestos por primera vez a AE a las 4 semanas de edad. En las primeras etapas del desarrollo, las EDs y las sinapsis son sensibles ante los cambios que se generan en el ambiente externo. El uso de AE favorece el incremento de EDs sin importar etapas del desarrollo (Bock et al., 2013), sin embargo, se sugiere que la formación y eliminación de EDs reorganiza las redes neuronales modulando la formación y eliminación de EDs y sinapsis (Jung y Herms, 2012; Koleske, 2013) mayormente en etapas tempranas del desarrollo como la adolescencia (Bock et al., 2013).

La clasificación sobre la morfología demostró que en ratones WT y en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> prevalecen las EDd, EDh y EDr. Nuestro modelo KO TSP-1<sup>-/-</sup> presenta una disminución en todos los tipos de EDs comparados con los ratones WT. Nuestros resultados demuestran que en los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ANE, las EDd ocupan el 50% del número total de espinas, seguidas por las EDr que abarcan el 30% y son las EDh, las más maduras y estables las que abarcan el 20% del conteo total. Aunque los AE incrementaron la presencia de los tres tipos de EDs en estos ratones, el orden de incidencia no se modifica.

La importancia de las EDd y las EDh radica en su funcionamiento citoarquitectónico. Las EDd se relacionan con procesos de aprendizaje y las EDh con procesos de memoria (Bourne y Harris, 2007).

La morfología de las EDs influye en su función, creemos que durante la fase de exposición a AE el incremento de EDd se debió a un proceso de aprendizaje (Bourne y Harris, 2007; García-López et al., 2007). Durante los procesos de

aprendizaje la actividad neuronal se incrementa, estimulando la formación de nuevas EDs, a partir de espinas inmaduras, como las EDd. Por ejemplo, durante las primeras fases de la LTP se genera espinas delgadas, las cuales logran modificarse y estabilizarse. Se cree que después la formación de contactos sinápticos podrían generar señales que modifiquen la morfología de la ED favoreciendo la formación de espinas maduras (Yuste y Bonhoeffer, 2001).

Es bien sabido que las EDh son las espinas más estables y las únicas capaces de mantener las sinapsis y se han asociado a procesos de memoria. Nuestro trabajo demostró que los AE favorecen la formación de EDh en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>. Sin embargo, desconocemos si el incremento de estas espinas está asociado a un incremento en las sinapsis y si estas sinapsis son funcionales. Experimentos que permitieran conocer cambios en la expresión de proteínas sinápticas podrían ayudarnos a dilucidar este mecanismo. Por otro lado, si se favorecen los procesos de memoria, por el incremento de EDh, los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE podrían tener mejor desempeño en pruebas relacionadas a procesos de memoria y aprendizaje. Experimentos en progreso son encaminados a comprobar esta relación.

Las EDr no son menos importantes y mucho menos carecen de función, algunos autores las consideran un tipo de espina madura por su morfología, mientras que otros las consideran espinas inmaduras por la pequeña área que ocupa el PSD, a la cual se le adjudica poca estabilidad sináptica (Soria y Pérez, 2012). Nosotros observamos un incremento de EDr en ratones WT y KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE.

Se sabe que la exposición a AE incrementa las densidades postsinápticas (PSD). Es probable que en nuestras condiciones experimentales, el incremento en el número de EDs observado en ambos grupos favorezca la formación de PSD y de sinapsis estabilizando a la espina dendrítica (Yuste y Bonhoeffer, 2001).

Sin embargo, aunque los AE estimulan la producción de EDs tanto en ratones WT como en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> el efecto final podría ser diferente. Mientras que en los ratones WT, los AE potencializan el desarrollo de EDs y fortalecen los circuitos

neuronales, en los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>, los AE podrían compensar la carencia de EDs y estimular la formación de circuitos neuronales (Harris et al., 1992).

Se ha demostrado que la estimulación influye de manera sobresaliente en la dinámica de las EDs (Jung y Herms, 2012) modificando la reorganización neuronal (Marín-Padilla, 1972; Palmar, 2013). Particularmente, en neuronas de corteza somatosensorial de rata se observa un aumento en la densidad de procesos dendríticos después de ser estimuladas (Adkins et al., 2008), sugiriendo que la estimulación de la corteza somatosensorial induce cambios benéficos mejorando la organización de los circuitos neuronales y la integración de información (Adkins et al., 2008; Chen et al., 2012; Palmer, 2013). Este mecanismo podría ser utilizado en los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>.

Alteraciones en la morfología y número de EDs pueden afectar la función sináptica y la organización de los circuitos neuronales, esto trae como consecuencia la alteración en el procesamiento de la información (Palmer, 2013). La falta de TSP-1 en los ratones afecta la densidad y función de las EDs y probablemente la formación de circuitos neuronales funcionales impidiendo la correcta ejecución y el desempeño conductual de los roedores. Sin embargo, permanecen las vías de señalización, ya que los AE favorecen la formación de EDs en los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>. Se sugiere que en una condición donde hay una alteración en la densidad y morfología de las EDs como el síndrome de Down (Marín-Padilla, 1972; Benavides-Piccione et al., 2004; Dierssen et al., 2003), el síndrome de Rett (Kaufmann y Moser, 2000), el síndrome de X Frágil (Dierssen y Ramakers, 2006), la Esquizofrenia (Nimchinsky et al., 2002) y el Alzheimer (Fiala et al., 2002), los AE puedan ser una estrategia para tratar de revertir estas alteraciones.

Los AE son un modelo comúnmente utilizado en roedores, sin embargo, este modelo ha sido adaptado para los seres humanos, actualmente mejor conocidos como estimulación temprana (Prats-Viñas, 2007), tratamiento de integración sensorial (Reynolds et al., 2010) e intervención neuropsicológica. La elección del método más adecuado depende de los objetivos deseados. Actualmente, la estimulación temprana es un método aplicado en niños de 0-5 años de edad con

el objetivo de enriquecer su estimulación, potencializar habilidades y en algunos casos revertir daños físicos u orgánicos (Prats-Viñas, 2007). El tratamiento de integración sensorial, generalmente es una forma de fisioterapia donde el objetivo es recuperar funcionalidad fisiológica mientras que la intervención neuropsicológica procura restaurar y/o compensar habilidades cognitivas y conductuales a través de programas estructurados y personalizados (Santos y Bausela, 2005).

El uso de los AE puede favorecer la calidad de vida en cualquier etapa del desarrollo humano y a lo largo de la vida humana siempre y cuando este tipo de estimulación no cese (Rosenzweig y Bennett, 1996). Para el humano, la mejor manera y la más sencilla de crear AE es evitar la rutina y la cotidianidad, leer habitualmente, viajar, asistir a eventos culturales, realizar actividades educativas y deportivas, así como socializar (Rosenzweig y Bennett, 1996). Reinventando los AE para cubrir las necesidades de cada persona es probable que disminuya la complejidad de patologías, se prevengan otras y mejore la calidad de vida de los individuos. La estimulación a través de AE, puede producir efectos benéficos tanto en sujetos de condiciones normales como en aquellos que padecen alguna alteración cerebral.

Este trabajo ha demostrado que el uso de AE favorece el incremento en el número de EDs en neuronas piramidales de la capa III y V de la corteza somatosensorial en ratones WT y ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>. Sugiriendo que la TSP-1 es una proteína importante pero no determinante en la espinogénesis. Adicionalmente nosotros observamos que la estimulación de EDs en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> no necesariamente se presenta junto con cambios conductuales. Por lo que otros mecanismos y circuitos podrían ser los responsables de los cambios en procesos dependientes de experiencia.

## X. CONCLUSIONES

1. Este trabajo confirmó que los AE son un paradigma conductual que favorece la plasticidad neuronal en ratones WT y en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>.
2. Los ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> tienen alteraciones en el número y morfología de EDs, respecto a los ratones WT.
3. El uso de AE incrementa la formación de EDs en ratones WT y en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup>. Sin embargo, el incremento de EDs en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a AE es menor respecto al incremento de EDs en ratones WT.
4. Los ratones WT y ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> expuestos a ANE muestran diferencias significativas en el número de EDr y EDh.
5. En ratones WT expuestos a AE, las EDr son las de menor incidencia. Mientras, que en ratones KO TSP-1<sup>-/-</sup> son las EDh.
6. La TSP-1 juega un papel importante pero no determinante en la formación de EDs.



## XI. REFERENCIAS

- Adams, J. C., Lawler, J. (2011). The thrombospondins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a009712.
- Adkins, D. L., Hsu, J. E., Jones, T. A. (2008). Motor cortical stimulation promotes synaptic plasticity and behavioral improvements following sensorimotor cortex lesions. *Exp. Neurol.* doi:10.1016/j.expneurol.2008.01.031.
- 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 & Behavior*. 93: 388–394.
- Archajee, S., Nayani, N., Tsutsui, M., Hill, M.N., Ousman, S. S., Pittman, Q. J. (2013). Altered cognitive-emotional behavior in early experimental autoimmune encephalitis--cytokine and hormonal correlates. *Brain Behavior Immunity*. 33: 164-172.
- Asch, A. S., Leung, L. L. K., Shapiro, J., Nachman, R. L. (1986). Human brain glial cells synthesize thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2904-2908.
- Aumann, T. D., Tomas, D., Horne, M. K. (2013). Environmental and behavioral modulation of the number of substantia nigra dopamine neurons in adult mice. *Brain and Behavior*. 3(6): 617–625.
- Ávila-Costa, M. A., Colín-Barenque, L., Fortoul, T. I., Machado-Salas, J. P., Espinosa-Villanueva, J., Rugerio-Vargas, C., Rivas-Arancibia, S. (1999). Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1. *Neuroscience Letters*. 270: 107-109.
- Ballesteros-Yáñez, I., Benavides-Piccione, R., Elston, G. N., Yuste, R., De Felipe, J. (2006). Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience*. 138: 403–409.
- Barker, A. J., Koch, S. M., Reed, J., Barres, B. A., Ullian, E. M. (2008). Developmental control of synaptic receptivity. *The Journal of Neuroscience*. 28: 8150–8160.
- Benavides–Piccione, R., Ballesteros-Yáñez, I., Martínez de Lagrán, M., Elston, G., Estivill, X., Fillat, C., DeFelipe, J., Dierssen. M. (2004). On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Progress in Neurobiology*. 74: 111–126.
- Bock, J., Poeggel, G., Gruss, M., Wingenfeld, K., Braun, K. (2013). Infant cognitive training preshapes learning-relevant prefrontal circuits for adult

learning: learning-induced tagging of dendritic spines. *Cerebral Cortex*. doi:10.1093/cercor/bht148.

Bornstein, P. (2009). Matricellular proteins: an overview. *Cell*. 3:163-65.

Bourne, J., Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*. 17:381–386.

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

Chen, C. C., Tam, D., Brumberg, J. C. (2012). Sensory deprivation differentially impacts the dendritic development of pyramidal versus non-pyramidal neurons in layer 6 of mouse barrel cortex. *Brain Struct Funct*. 217:435–446.

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

Chen, X., Leischner, U., Rochefort, N. L., Nelken, I., Konnerth, A. (2011). Functional mapping of single spines in cortical neurons in vivo. *Nature*. 475: 501-505.

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

Clemo, H. R., Alex-Meredith, M. (2012). Dendritic spine density in multisensory versus primary sensory cortex. *Synapse*. 66: 714-724.

Contreras-Ruiz, Ghosh-Mitra, L.A. Shatos, M. A., Dartt, D. A., Masli, S. (2013). Modulation of Conjunctival Goblet Cell Function by Inflammatory Cytokines. *Hindawi Publishing Corporation*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/636812>

Crawford, D. C., Jiang, X., Taylor, A., Mennerick, S. (2012). Astrocyte-derived thrombospondins mediate the development of hippocampal presynaptic plasticity *In Vitro*. *The Journal of Neuroscience*. 32: 13100-13110.

DeFreitas, M. F., Yoshida, C. K., Frazier, W. A., Mendrick, D. L., Kypta, R. M., Reichardt, L. F. (1995). Identification of integrin  $\alpha 3\beta 1$  as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron*. 15: 333–343.

Dierssen, M., Benavides-Piccione, R., Martínez-Cué, C., Estivill, X., Flórez, J., Elston, G. N., DeFelipe, J. (2003). Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cerebral Cortex*. 13: 758–764.

Dierssen, M., Ramakers, G. J. (2006). Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetic to neurobiology. *Genes, Brain and Behavior*. Suppl.2: 48-60.

Engert, F., Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*. 399: 66-70.

Eroglu, C. (2009). The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function. *Cell*. 3:167–176.

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., Garcia, K. C., Smith, S. J., Luo, Z. D., Rosenthal, A., Mosher, D. F., Barres, B. A. (2009). The gabapentin receptor  $\alpha 2\delta$ -1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell*. 139: 380–392.

Faherty, C. J., Kerley, D., Smeyne, R. J. (2003). A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Developmental Brain Research*. 141: 55–61.

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

Fu, M., Yu, X., Lu, J., Zuo, Y. (2012). Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature*. doi:10.1038/nature10844.

Garcia, 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.

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

García-Navarro, M. E., Tacoronte, M., Sarduy, I., Abdo, A., Galvizú, R., Torres, A., Leal, E. (2000). Influencia de la estimulación temprana en la parálisis cerebral. *Revista de Neurología*. 31: 716-719.

Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Licht, T., Segal, M., Yirmiya, R., (2009). Environmental enrichment restores memory functioning in mice with impaired IL-1 signaling via reinstatement of Long-Term Potentiation and spine size enlargement. *The Journal of Neuroscience*. 29: 3395-3403.

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

Greenough, W. T., Volkmar, F. R., Juraska, J. M. (1973b). 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.

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

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. *The Journal of Neuroscience*. 12: 2685-2705.

He, C. X., Portera-Cailliau, C. (2012). The trouble with spines in Fragil X Syndrome: density, maturity and plasticity. *Neuroscience*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.049>

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

Hughes, E. G., Elmariah, S. B., Balice-Gordon, R. J. (2010). Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 43:136–145.

Jeng-Long, H., Po-Chuan, S., Ai-Li, S., I-Ming, J., Che-Hsin, L., Chrong-Reen, W., Min-Li, T., Chao-Liang, W. (2010). Intraarticular gene transfer of Thrombospondin-1 suppresses the disease progression of experimental osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research*. DOI 10.1002/jor.21134.

Jones, T. A., Allred, R. P., Adkins, D. L., Hsu, J. E., O'Bryant, A., Maldonado, M. A., (2009). Remodeling the brain with behavioral experience after stroke. *Stroke*. 40: S136–S138.

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

Kaufmann, W. E., Moser, H. W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cerebral Cortex*. 10: 981- 991.

Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 386: 493-495.

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

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

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

Lawler, J. (1986). The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood*. 67: 1197-1209.

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

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

Liauw, J., Hoang, S., Choi, M., Eroglu, C., Choi, M., Sun, G., Percy, M., Wildman-Tobriner, B., Bliss, T., Guzman, R. G., Barres, B. A., Steinberg, G. K. (2008). Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 28: 1722–732.

Lima, A. P. A. S., Silva, K., Padovan, C. M., Almeida, S. S., Fukuda, M. T. H. (2014). Memory, learning, and participation of the cholinergic system in young rats exposed to environmental enrichment. *Behavioural Brain Research*. 259: 247– 252.

Lopez-Dee, Z. P., Chittur, S. V., Patel, B., Stanton, R., Wakeley, M., Lippert, B., Menaker, A., Eiche, B., Terry, R., Gutierrez, L. S. (2012). Thrombospondin-1 type 1 repeats in a model of inflammatory bowel disease: transcript profile and therapeutic effects. *PLOS ONE*. 7: e34590.

Lopez-Dee, Z. P., Pidcock, K., Gutierrez, L. S. (2011). Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Hindawi Publishing Corporation*. doi:10.1155/2011/296069.

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

Marín-Padilla, M. (1972). Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Research*. 44: 625-629.

Mesa-Gresa, P., Ramos-Campos, M., Redolat, R. (2014). Behavioral effects of different enriched environments in mice treated with the cholinergic agonist PNU-282987. *Behavioural Processes* 103: 117– 124.

Miller, A. H., Haroon, E., Raison, C. L., Felger, J. C. (2013). Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depression and Anxiety*. 30:297–306.

Moore, N. H., Costa, L. G., Shaffer, S. A., Goodlett, D. R., Guizzetti, M. (2009). Shotgun proteomics implicates extracellular matrix proteins and protease systems in neuronal development induced by astrocyte cholinergic stimulation. *J Neurochem*. 108: 891–908.

Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B., Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*. 44: 759-767.

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

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

Nithianantharajah, J., Hannah, L., 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.

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

O'Shea, K.S., Liu, L-H. J., Dixit, V. M. (1991). Thrombospondin and a 140 kd fragment promote adhesion and neurite outgrowth from embryonic central and peripheral neurons and from PC12 cells. *Neuron*. 7:231-237.

Okabe, S. (2009). Dendritic growth. *Encyclopedia of Neuroscience*. 937-942.

Olsson, I. A. S., 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., Higgins, D. (1992). Thrombospondin promotes process outgrowth in neurons from the peripheral and central nervous systems. *Developmental Biology*. 150: 256-265.

Oyasu, M., Kuroda, S., Nakashita, M., Fujimiya, M., Kikkawa, U., Saito, N. (2000). Immunocytochemical localization of a neuron-specific thrombospondin-

1-like protein, NELL2: light and electron microscopic studies in the rat brain. *Molecular Brain Research*. 76: 151–160.

Palmer, L. M. (2013). Dendritic integration in pyramidal neurons during network activity and disease. *Brain Research Bulletin*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.09.010>

Pascual, R., Bustamante, C. (2013). Early postweaning social isolation but not environmental enrichment modifies vermal Purkinje cell dendritic outgrowth in rats. *Acta Neurobiol Exp*. 73: 387–393.

Paxinos, G. (2004). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego California. Compact 2nd ed.

Petanjek, Z., Judaš, M., Šimic´, G., Rašin, M. R., Uylings, H. B. M. Rakic, P., Kostovic´, I. (2011). Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *PNAS*. 108: 13281-13286.

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

Pfriege, F. W. (2002). Role of glia in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology*. 12:486–490.

Prats-Viñas, J. M. (2007). A favor de la detección precoz e intervencionismo moderado: ¿hasta qué punto es efectiva la estimulación temprana? *Revista de Neurología*. 44: S35-S37.

Raugi, G. J., Mumby, S. M., Abbott-Brown, D., Bornstein, P. (1982). Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture. *The Journal of Cell Biology*. 95:351-354.

Reynolds, S., Lane, S. J., Richards, L. (2010). Using animal models of enriched environments inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. *J Neurodevelop Disord*. 2:120–132.

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

Roberts, D. D., Miller, T. W., Rogers, N. M., Yao, M., Isenberg, J. S. (2012). The matricellular protein Thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47. *Matrix Biol*. 3: 162–169. [doi:10.1016/j.matbio.2012.01.005](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.01.005).

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

Santos Cela, J. L., Bausela Herreras, E. (2005). Rehabilitación Neuropsicológica. *Papeles del Psicólogo*. 26: 15-21.

Shi, Y., Ethell, I. M. (2006). Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein Kinase II-mediated actin reorganization. *The Journal of Neuroscience*, 26:1813–1822.

Soria, C. F., Pérez, M. I. V. (2011). Participación de las proteínas de unión a la actina y vías de señalización asociadas a la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas. *Neurología*. 27:421-431.

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

Tucker, R. P. (2004). The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36: 969–974.

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

Valverde, F. (1970). *The Golgi method. A tool for comparative structural analysis* in Nauta, W. J. H. and Ebesson, S. (eds.). *Contemporary research methods in neuroanatomy*. (12-28). Springer, New York.

Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F. H. (2010). Neural consequences of environmental enrichment. *Neuroscience*. 1:191- 198.

Wight, T. N., Raugi, G. J., Mumby, S. M., Bornstein, P. (1985). Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 33:295-302.

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

Yu, K., Ge, J., Summers, J. B., Li, F., Liu, X., Ma, P., Kaminski, J., Zhuang, J. (2008). TSP-1 secreted by bone marrow stromal cells contributes to retinal ganglion cell neurite outgrowth and survival. *PLOS ONE*. 3: e2470.

Yuste, R. (2011). Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron*. 71: 772-781.



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

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