



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

LA FUNCIÓN DE LA TROMBOSPONDINA-1 (TSP-1) EN LA
PLASTICIDAD NEURONAL

PRESENTA:
Jesús Antonio Villegas Piña

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Octavio García González (FP-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Laura Colín Barenque (FESI-UNAM)

Dr. Daniel Reyes Haro (INB-UNAM)

MÉXICO junio 2016



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.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	6
ANTECEDENTES.....	8
Trombospondinas (TSPs).....	8
Trombospondina-1 (TSP-1).....	9
La TSP-1 y sus funciones cerebrales.....	11
Espinas Dendríticas.....	12
Morfología de las espinas.....	13
Ambientes Enriquecidos (AE).....	16
Ambientes Enriquecidos (AE) y la morfología neuronal.....	17
Ambientes Enriquecidos y Enfermedad.....	18
Hipocampo y Ambientes Enriquecidos.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Animales.....	22
Ambientes Enriquecidos.....	22
Impregnación de Golgi.....	23
Análisis de Sholl para la morfología neuronal.....	24
Análisis cuantitativo de espinas dendríticas.....	26

Clasificación de espinas dendríticas.....	28
Determinación de TSP-1.....	29
Análisis estadístico.....	29
RESULTADOS.....	31
Los AE modifican la morfología dendrítica.....	31
Los AE incrementan la densidad de espinas dendríticas.....	35
Los AE producen un incremento en los niveles de TSP-1 en el hipocampo.....	36
La morfología neuronal se modifica en ratones KO TSP-1.....	38
Los AE no incrementan la densidad de espinas dendríticas en ratones KO TSP-1.....	41
La densidad de espinas dendríticas se ve disminuida en ratones carentes de TSP-1 en las porciones distales de la dendrita.....	42
Los AE modifican la morfología de las espinas dendríticas.....	42
DISCUSIONES.....	45
CONCLUSIONES.....	52
REFERENCIAS	54

Lista de Abreviaturas

AE	Ambientes Enriquecidos
ANE	Ambientes No Enriquecidos
CA	Cuerno de Ammon
LTD	Depresión a Largo Plazo
PSD95	Densidad Postsináptica 95
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
bFGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico beta
NGF	Factor de crecimiento Nervioso
PDGF	Factor de Crecimiento Dependiente de Plaquetas
GD	Giro Dentado
LTP	Potenciación a Largo Plazo
KO TSP-1	Ratones deficientes de TSP-1
SNC	Sistema Nervioso Central
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TSPs	Trombospondinas
TSP-1	Trombospondina-1
TSP-2	Trombospondina-2
TSP-3	Trombospondina-3
TSP-4	Trombospondina-4
TSP-5	Trombospondina-5
Wt	Ratones silvestres

RESUMEN

La Trombospondina-1 (TSP-1), es una glicoproteína de matriz extracelular implicada en procesos de cicatrización, migración celular y angiogénesis. En el cerebro la TSP-1 es sintetizada y secretada por los astrocitos y se encuentra involucrada en la sinaptogénesis, neurogénesis, formación de neuritas, migración neuronal, así como el desarrollo y mantenimiento de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas son protuberancias que emanan de las dendritas y se consideran el principal sitio de contacto postsináptico excitatorio. Los ambientes enriquecidos (AE) son utilizados para estudiar la plasticidad cerebral dependiente de la experiencia. Los AE modifican la morfología de la neurona y estimulan la formación de espinas dendríticas; sin embargo, los mecanismos celulares involucrados en este proceso no se conocen completamente. El objetivo de este trabajo fue conocer si la TSP-1 tiene un papel determinante en los cambios neuronales producidos por los AE. Brevemente, ratones silvestres (Wt) y ratones knockout (KO) para TSP-1 se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio (Ambientes No Enriquecidos, ANE) y en AE por cinco semanas, después de este periodo los ratones fueron sacrificados y sus cerebros procesados para la tinción de Golgi. Se utilizó el análisis de Sholl para conocer las alteraciones en la morfología de las neuronas piramidales del hipocampo. Los cambios en la densidad y la morfología de las espinas dendríticas fueron determinados mediante un sistema semiautomatizado estandarizado en este trabajo. Los niveles de TSP-1 fueron determinados en el hipocampo por un inmunoensayo de ELISA. Los resultados mostraron que los ratones Wt sometidos a AE no presentan cambios en el número de arborizaciones nerviosas; sin embargo, se observó disminución en la longitud de las dendritas secundarias y terciarias. Estos cambios fueron asociados con una mayor complejidad de las neuronas, aumento en la densidad de espinas dendríticas e incremento en los niveles de TSP-1. Los ratones KO TSP-1 presentaron alteraciones en la morfología neuronal que incluyen reducción de espinas en las dendritas terminales, una menor complejidad neuronal y disminución en el número de ramificaciones dendríticas; sin embargo, estas ramificaciones presentaron mayor longitud. La morfología de hongo de las espinas

dendríticas disminuye en ratones KO. Los AE no modificaron la morfología neuronal pero sí incrementaron la densidad de espinas dendríticas. Nuestros resultados sugieren que la TSP-1 tiene un papel importante en el mantenimiento de la morfología neuronal y en los procesos de plasticidad cerebral dependientes de la experiencia.

ABSTRACT

Thrombospondin-1 (TSP-1) is an extracellular matrix protein involved in healing processes, cell migration and angiogenesis. Synthesized and released by astrocytes, TSP-1 is involved in the development and maintenance of neurites, dendritic spines and synapses. Dendritic spines are protrusions that emanates from dendrites and are considered as the main postsynaptic site for the excitatory synapses. Enriched Environments (EE) are used to study brain plasticity experience-dependent. EE modify the morphology of the neuron and stimulate the dendritic spines formation. However, the cellular mechanisms involved in this process are not fully understood. The aim of this study was to determine whether TSP-1 is involved in neuronal morphology changes induced by EE. Briefly, wild type mice (Wt) and knockout (KO) to TSP-1 mice were exposed for five weeks to EE, subsequently were sacrificed and their brains processed for Golgi stain. Sholl analysis was performed to know changes in neuronal morphology and density of dendritic spines in hippocampal neurons. TSP-1 levels were determined by immunoassay. We find that Wt mice in EE show changes in number of nerve arborizations, decrease in the length of secondary and tertiary dendrites; enhanced dendritic spine density associated with the increase of TSP-1 levels. TSP-1 KO mice show reduction on number of dendrites, increased length of the dendrites and decreased dendritic spine density in distal dendrite but not in proximal dendrite. The mushroom morphology of dendritic spines decreases in KO mice. Our results suggest that TSP-1 plays an important role in brain plasticity mechanisms experience-dependent.

AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIAS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgado para la realización de mis estudios de Posgrado: Beca número 338087.

Así mismo agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos recibidos.

Agradezco a mi comité tutorial: Dr. Octavio García (tutor principal), Dra. Laura Colín y Dr. Daniel Reyes (cotutores) por la paciencia, dedicación, críticas, asesorías y apoyos proporcionados para la realización del presente trabajo de investigación y Tesis.

Agradezco a la Maestra Leonor Casanova, Guadalupe Amador y Lourdes Lara por su paciencia, asesorías y apoyo en el camino penoso de la burocracia.

Finalmente dedico este trabajo a mi familia, particularmente a mi hijo: Ali Tonatiuh, quien constituye la fuerza de empuje en mi formación; esperando que pronto pueda apropiarse por sí mismo de éstas líneas.

Parte de los resultados de este trabajo fueron premiados con el “Primer Lugar en la Categoría de Investigación Básica” dentro del VI Congreso Internacional de Investigación en Rehabilitación del Instituto Nacional de Rehabilitación.

INTRODUCCIÓN

Las trombospondinas, son una gran familia de glicoproteínas oligoméricas con múltiples dominios que participan en una gran variedad de funciones biológicas como parte de la matriz extracelular. De acuerdo a su estado de oligomerización y dominio estructural, las trombospondinas han sido organizadas en dos subgrupos: el subgrupo A que comprende una estructura trimérica que incluye a la Trombospondina-1 (TSP-1) y Trombospondina-2 (TSP-2); y el subgrupo B con organización pentamérica que incluye a la Trombospondina-3 (TSP-3), Trombospondina-4 (TSP-4) y Trombospondina-5 (TSP-5) (Adams, 2001; Adams y Lawler, 2004; Bornstein, 2009; Adams y Lawler, 2011). La TSP-1 es una glicoproteína liberada de los gránulos alfa de las plaquetas (Blair y Flaumenhaft, 2009), implicada en procesos como cicatrización, apoptosis, inflamación (Lopez-Dee et al., 2011), angiogénesis (Bornstein, 2009), sinaptogénesis (Xu et al., 2010), adhesión y migración celular (Tucker et al., 1999; Adams y Tucker, 2000; Chen et al., 2000; Lawler, 2000). En el Sistema Nervioso Central (SNC), la TSP-1 es ampliamente expresada durante el desarrollo (Risher y Eroglu, 2012) y se encuentra involucrada en el crecimiento de neuritas (O'Shea et al., 1991; Osterhout et al., 1992; Yu et al., 2008), migración neuronal (O'Shea et al., 1991; DeFreitas et al., 1995), diferenciación neuronal (Lu y Kipnis, 2010), sinaptogénesis (Christopherson et al., 2005; Eroglu et al., 2009; Xu et al., 2010; Mendus et al., 2014) y en la formación de las espinas dendríticas (García et al., 2010). La ausencia de TSP-1 afecta la recuperación de la función motora en modelos de isquemia cerebral (Liauw et al., 2008) y favorece la hiperexcitabilidad en modelos de epilepsia (Mendus et al., 2015); sugiriendo un papel importante en la formación de circuitos neuronales y la plasticidad cerebral.

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias que emergen de las dendritas de las neuronas y son consideradas como el principal componente postsináptico en las sinapsis excitatorias (Yuste y Urban 2004; Arellano et al., 2007). Las espinas son estructuras dinámicas cuyo tamaño, forma y número cambia a través de la vida (Hotulainen y Hoogenraad, 2010; Ebrahimi y Okabe,

2014; Gu et al., 2014); en un principio respondiendo a un dictamen genético y posteriormente a la propia actividad neuronal (Yuste et al., 2000; Nimchinsky et al., 2002; Cornelisse et al., 2007; Yang et al., 2009).

En modelos *in vitro* de plasticidad sináptica, como la Potenciación a Largo Plazo y Depresión a Largo Plazo (LTP y LTD, por sus siglas en inglés), las espinas dendríticas presentan cambios en su morfología y densidad después de la estimulación eléctrica (Lamprecht y LeDoux, 2004; Okamoto et al., 2004; Hill y Zito, 2013). Resultados similares se han observado cuando el LTP es inducido *in vivo* (Fukazawa et al., 2003; Lisman, 2003; Popov et al., 2004; De Roo et al., 2008; Jedlicka et al., 2008; Knott y Holtmaat, 2008; Lushnikova et al., 2009). En modelos conductuales que permiten estudiar procesos de plasticidad dependientes de la experiencia, como los ambientes enriquecidos (AE), se ha observado el incremento en el número de espinas dendríticas y sinapsis (Moser et al., 1994; van Praag et al., 2000; Landers et al., 2011), lo que sugiere un papel preponderante de estas estructuras en la plasticidad cerebral. La mayoría de los cambios plásticos han sido vinculados con diversas proteínas y factores neurotróficos; sin embargo, se desconoce si la TSP-1 participa en la formación de espinas dendríticas producidas por los AE. Por lo que en este trabajo se analizó si la TSP-1 tiene un papel fundamental en la plasticidad cerebral dependiente de la experiencia.

ANTECEDENTES

Trombospondinas (TSPs)

Las trombospondinas (TSPs) son glicoproteínas multifuncionales que pertenecen a un grupo de proteínas de la matriz extracelular. Las TSPs pueden interactuar con un gran número de receptores de membrana celular y con una variedad de proteínas de matriz extracelular que le permiten tener una interacción célula-célula y célula-matriz (Adams y Lawler, 2011). La familia de las TSPs está conformada por cinco miembros (TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4 y TSP-5 o proteína de matriz oligomérica de cartílago, COMP). De acuerdo a su dominio estructural y su modo de multimerización, las TSPs han sido divididas en dos subfamilias: la subfamilia A que incluye a la TSP-1 y TSP-2 caracterizada por tener una estructura trimérica y la subfamilia B conformada por la TSP-3, TSP-4 y TSP-5 con una estructura pentamérica (Adams y Lawler, 2004; 2011). Las TSPs tienen importantes funciones biológicas que han sido descubiertas en muchos órganos y sistemas como son: la regulación de la angiogénesis y progresión del cáncer (Bornstein, 2009; Lawler y Lawler, 2012), modulación de la inflamación (Lopez-Dee et al., 2011), modulación de la respuesta inmune (Chamak et al., 1995; Bergstrom et al., 2015), mantenimiento, integridad y función del miocardio (Lawler, 2000; Adams y Lawler, 2004), cicatrización, regulación de la fibrosis (Lawler, 2000) y migración de células neuronales (Girard et al., 2014), entre otras funciones.

Todas las TSPs comparten un alto grado de homología, específicamente en su estructura general representada por: una región carboxilo terminal, 2-3 dominios de unión al Factor de Crecimiento Epidermal (EFG), un dominio de unión a Ca^{2+} y en su porción amino terminal el dominio de tipo C que se une a factor de Von Willebrand (Lawler, 2000; Adams y Lawler, 2004).

Las cinco proteínas se ubican en diferentes cromosomas, tanto en humanos como en ratones. En humanos la TSP-1 es codificada por el gen *THBS1* que se localiza en el cromosoma 15 y en el ratón por el gen *Thbs1* localizado en el cromosoma 2; la TSP-2 es codificada por el gen *THBS2* para humano localizado en el cromosoma 6 y *Thbs2* para ratón localizado en el cromosoma 17; el gen *THBS3* de la TSP-3 para humano se encuentra en el cromosoma 1 y para el ratón *Thbs3*

en el cromosoma 3. La TSP-4 codificada por el gen *THBS4* está localizada en el cromosoma 5 y *Thbs4* de ratón en cromosoma 13. Finalmente la TSP-5 en humanos es codificada por el gen *THBS5* localizada en el cromosoma 19 y para ratón el gen *Thbs5* en el cromosoma 8 (Stenina-Adognravi, 2014).

Trombospondina-1 (TSP1)

La trombospondina-1 (TSP-1) es una glicoproteína de unión a calcio que es liberada por los gránulos α plaquetarios (Blair y Flaumenhaft, 2009) en respuesta a una activación por trombina. La TSP-1 fue la primera molécula en ser caracterizada dentro de la familia de las TSPs, atribuyéndosele funciones de adhesión celular (Chen et al., 2000); además tiene un papel fundamental en el proceso de coagulación y respuesta inflamatoria (Lawler, 2000; Adams y Lawler, 2004; Lopez-Dee et al., 2011).

La TSP-1 no sólo responde a trombina, diversos estudios han demostrado que la expresión de TSP-1 aumenta en respuesta a Adenosina Trifosfato (ATP), glucosa, Factor de Crecimiento Dependiente de Plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), Factor de Crecimiento Fibroblástico beta (β FGF, por sus siglas en inglés), Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (TGF β 1, por sus siglas en inglés) e hipoxia (Adams y Lawler, 2004); mientras que el virus de herpes, inhibidor 1 de DNA (Id1), Herpes virus asociado a sarcoma de Kaposi (KSHV), Interleucina 1 beta (IL-1 β), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), los protooncogenes C-fos, c-jun, vsrc, RAS y la luz UvB disminuyen su expresión (Adams y Lawler, 2011). A nivel celular, se ha visto que además de las plaquetas, las células endoteliales (Murphy-Ullrich y Iozzo, 2012), fibroblastos, adipocitos, células de músculo liso, monocitos y macrófagos son capaces de sintetizar TSP-1 (Lopez-Dee et al., 2011). Durante el periodo embrionario la expresión de TSP-1 es baja; sin embargo, su expresión se incrementa durante el periodo posnatal y vuelve a disminuir en la edad adulta (Caceres et al., 2007).

Estructuralmente la TSP-1 es un homotrímero de aproximadamente 420 kDa que consta de tres cadenas peptídicas idénticas unidas a través de puentes disulfuro

(Chen et al., 2000). Un monómero de TSP-1 se representa como un glicopéptido de 150 kDa que contiene los siguientes dominios: 1) un dominio amino terminal, el cual participa en la adhesión, proliferación y migración celular; 2) un sitio de unión a procolágeno, que funciona como unidad de ensamble para la inhibición de la angiogénesis; 3) tres regiones con secuencias repetidas, conocidos como *secuencia tipo I* o de unión a properdina, que facilita la adhesión celular, crecimiento de neurita y apoptosis e inhibe la proliferación y angiogénesis; *secuencia tipo II* que contiene un sitio de unión al Factor de Crecimiento Epidermal (EGF, por sus siglas en inglés), conformado por los sitios de unión a la heparina, seguido por regiones que contienen secuencias de aminoácidos con homología al procolágeno, properdina, EGF, que favorece el crecimiento celular; y *secuencia tipo III* o sitio de unión a calcio, involucrado en la unión celular por medio de canales de calcio; 4) dominio carboxilo terminal que participa en la migración y adhesión celular (Chen et al., 2000; Carlson et al., 2008) (Figura 1). Cada dominio tiene secuencias específicas de aminoácidos que interactúan con receptores CD36, CD47, TGF β , proteoglicanos, integrinas y otras moléculas de matriz extracelular formando complejos multiprotéicos en la superficie celular que participan en los diferentes procesos fisiológicos y patológicos como proliferación celular, migración, apoptosis, cicatrización de heridas, inflamación, angiogénesis y neoplasia (Adams, 2001; Bornstein, 2009; Isenberg et al., 2009), a través de la comunicación célula-célula y célula-matriz (Chen et al., 2000; Carlson et al., 2008).

La TSP-1 es degradada intracelularmente por endocitosis y proteólisis lisosomal; extracelularmente la TSP-1 puede ser destruida por catepsinas y elastasas como respuesta a la activación de neutrófilos y leucocitos (Adams y Lawler, 2004).

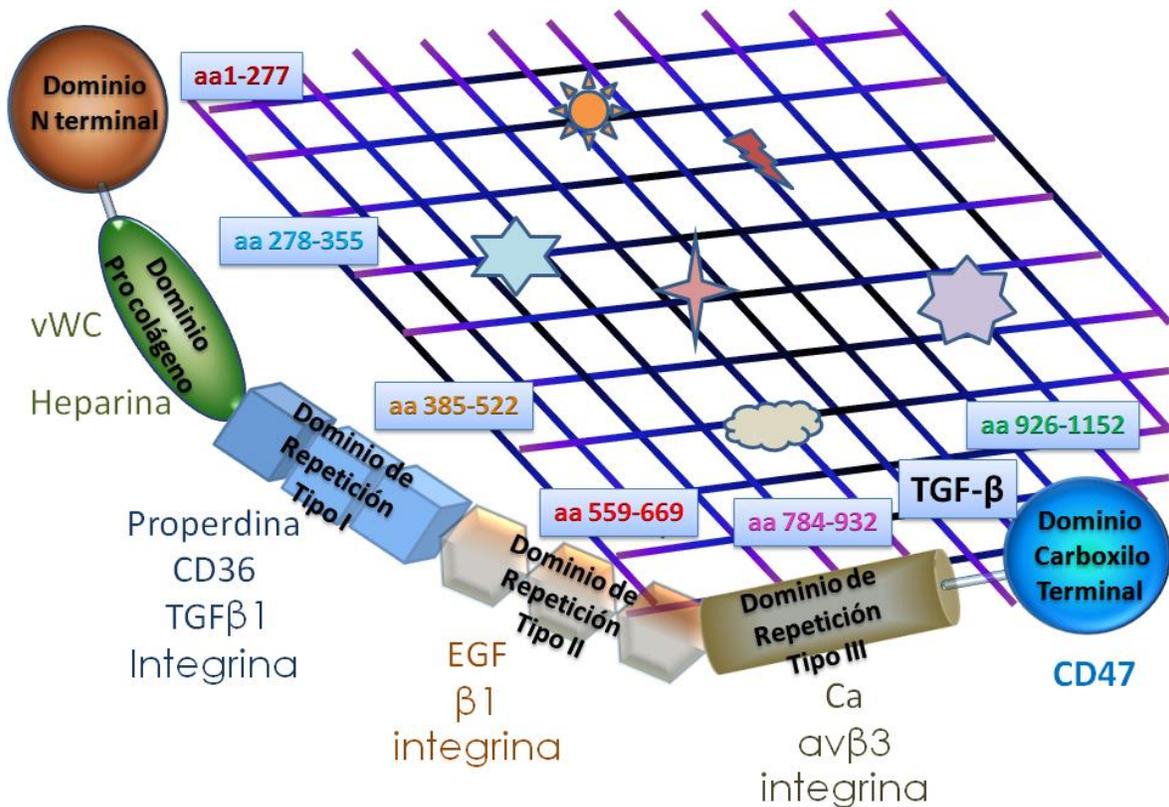


Figura 1. Estructura molecular de la trombospondina 1 (TSP-1). La imagen muestra los dominios globulares amino y carboxilo terminal y los tres tipos de secuencias repetidas. En la parte superior se muestran las regiones de aminoácidos que forman cada dominio y en la parte inferior los diferentes receptores con los que actúan. a.a. (amino ácidos), vWC (Factor de von Wilbrand tipo C), CD36 (Cluster o grupo de diferenciación 36), TGFβ1 (Factor de Crecimiento Transformante Beta 1), EGF (Factor de Crecimiento Endotelial), Ca (Calcio), avβ3 (Receptor a vitronectina), CD47 (Cluster o grupo de diferenciación 47).

La TSP-1 y sus funciones cerebrales

En el Sistema Nervioso Central (SNC), la TSP-1 es sintetizada y secretada por los astrocitos (Asch et al., 1986; Christopherson et al., 2005) principalmente durante las primeras etapas del desarrollo posnatal (Adams y Tucker, 2000). Su expresión podría estar involucrada en el crecimiento de las neuritas (O'Shea et al., 1991; Osterhout et al., 1992; Yu et al., 2008), migración neuronal (O'Shea et al., 1991; DeFreitas et al., 1995) y sinaptogénesis (Christopherson et al., 2005; Eroglu, 2009; Hughes et al., 2010; Crawford et al., 2012) a través de la activación de receptores para gabapentina (Eroglu et al., 2009) y neuroligina 1 (Xu et al., 2010). Los ratones deficientes de TSP-1 exhiben déficit en la recuperación de la función motora

después de una isquemia (Liau et al., 2008) y reducen la proliferación y diferenciación de progenitores neuronales (Lu y Kipnis, 2010). Recientemente se demostró que la ausencia de TSP-1 favorece la excitabilidad en modelos de epilepsia en ratones (Mendus et al., 2015). Mientras que la presencia de TSP-1 revierte la pérdida de espinas y sinapsis observada en modelos de la enfermedad de Alzheimer (Rama et al., 2013; Son et al., 2015); síndrome de Down (García et al., 2010) y lesión de motoneuronas (Tyzack et al., 2014). Adicionalmente se ha observado que la expresión de TSP-1 mejora el aprendizaje espacial en ratones (Chu et al., 2015). Por otro lado la activación del receptor CD47, uno de los receptores a TSP-1 a través de su dominio C-terminal, es necesaria para la maduración neuronal (Numakawa et al., 2004; Ohnishi et al., 2005). En contraste, la activación del receptor a Gabapeptina alfa-2-beta-1 por la TSP-1 estimula la formación de sinapsis excitatorias (Eroglu et al., 2009; Hughes et al., 2010), sugiriendo que la TSP-1 podría tener un papel preponderante en los procesos de desarrollo y plasticidad cerebral.

Espinas dendríticas

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias que emergen de las dendritas de una neurona, y constituyen el principal componente postsináptico excitatorio. Las espinas dendríticas fueron descritas por primera vez en 1888 por Ramón y Cajal en células de Purkinje (García-Lopez et al., 2007), considerándolas como estructuras que aumentan el área de superficie de las dendritas (Yuste, 2011). Los trabajos de Ramón y Cajal fueron confirmados muchos años después a través de diversas investigaciones basadas en microscopía electrónica y microscopía de luz (García-Lopez et al., 2007). Estos estudios lograron establecer que la mayoría de las espinas dendríticas representan el componente postsináptico de muchas sinapsis excitatorias y algunas sinapsis inhibitorias en el cerebro. Las espinas dendríticas están involucradas en la compartimentalización química del calcio, síntesis de proteínas, conectividad de las neuronas, fuerza sináptica, aislamiento eléctrico, función y plasticidad sináptica (Nimchinsky et al., 2002; DeFelipe, 2006; Alvarez y Sabatini, 2007).

Morfología de las espinas

A través de varios métodos de análisis ha sido posible determinar anatómicamente la morfología de las espinas dendríticas, encontrándose que están conformadas por tres estructuras elementales: base, cuello y cabeza (Nimchinsky et al., 2002; Ballesteros-Yanez et al., 2006; Arellano et al., 2007; Hotulainen y Hoogenraad, 2010) (Figura 2). El sitio de contacto entre la cabeza de las espinas y las terminales presinápticas está marcado por un conjunto de proteínas denominado densidad postsináptica 95 (PSD95, por sus siglas en inglés) (Ebrahimi y Okabe, 2014). Dicha densidad está constituida por diferentes proteínas como son: Drebrina (Shim y Lubec, 2002), Actina (Hotulainen y Hoogenraad, 2010; Shirao y Gonzalez-Billault, 2013), Spikar (Yamazaki et al., 2014), Axina (Chen et al., 2015), Kalirina (Penzes y Remmers, 2012) y proteínas de enlace a actina como la Gelsolina, Profilina, Pinofilina, etc., entre otras proteínas de importancia en la formación y modulación de la espina dendrítica (Figura 3).

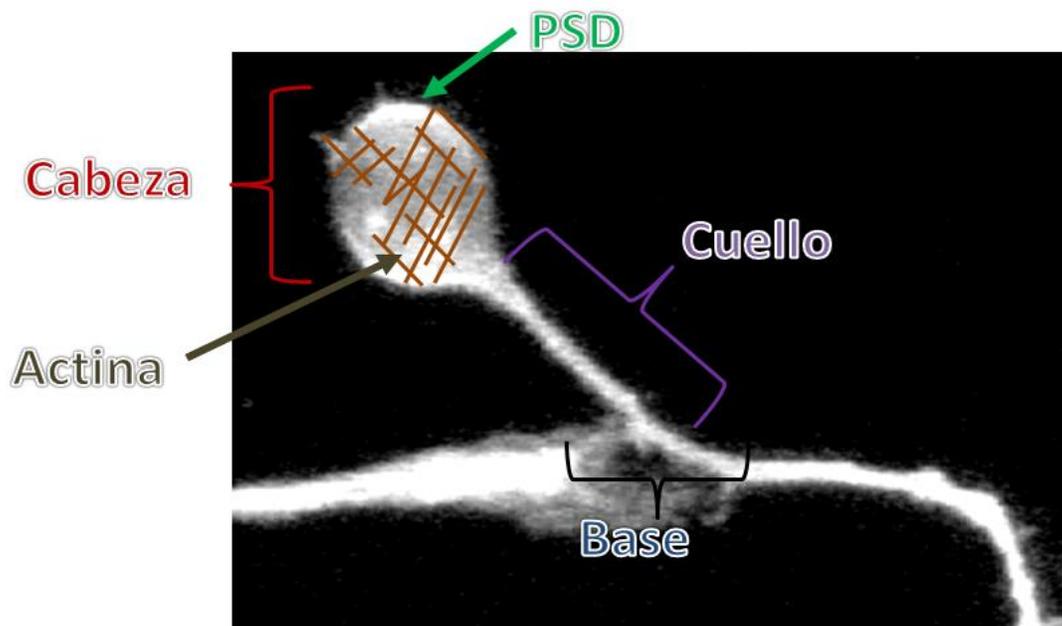


Figura 2. Estructura anatómica de la espina dendrítica. La imagen muestra los componentes centrales de la espina: una base, punto de unión a la dendrita y a partir de la cual se forma; cuello, porción de la espina conformado por actina; cabeza, lugar donde se concentrarán un conjunto de proteínas denominada densidad postsináptica (PSD). Modificada de (Jontes, 2000).

Tradicionalmente y acorde a un análisis ultraestructural que implica el volumen de la cabeza (alrededor de $0.001 \mu\text{m}^3$) y la longitud del cuello (cuyo diámetro es menor de $0.1 \mu\text{m}$), ha sido posible establecer diferentes patrones morfológicos de las espinas dendríticas (Nimchinsky et al., 2002), con lo cual se las ha clasificado en las siguientes categorías: 1) forma de hongo, por contener un cuello delgado y un volumen amplio de su cabeza, se ha sugerido que esta morfología predomina en las dendritas de cerebros maduros y en más del 80 % de ellas se encuentra el “aparato espinoso” (Jedlicka et al., 2008; Ebrahimi y Okabe, 2014), una estructura relacionada con el retículo endoplasmático liso; 2) forma regordeta, se caracteriza por tener un cuello corto y cabeza con volumen prominente; 3) espinas delgadas, que presentan un cuello delgado y una cabeza de volumen pequeño; 4) filopodios, en la cual se encuentra ausencia de cabeza y la longitud del cuello es alargado (Ballesteros-Yanez et al., 2006; Arellano et al., 2007). Estas últimas, consideradas estados inmaduros de las espinas dendríticas (Ziv y Smith, 1996). También se ha planteado la existencia de otro tipo de formas, como la ramificada, la cual constituye un doble contacto sináptico y las espinas delgadas largas por presentar una longitud de cuello de entre 1 y $2 \mu\text{m}$ (Figura 4).

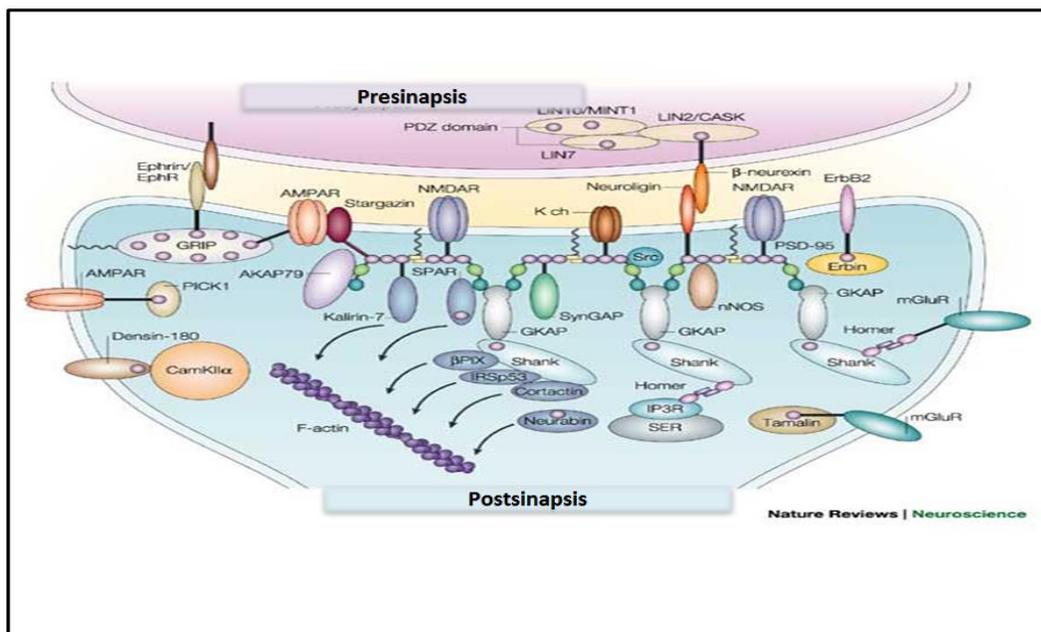


Figura 3. Estructura molecular de la espina dendrítica. La imagen muestra las principales proteínas localizadas en las espinas dendríticas. Modificada de Kim y Sheng, 2004.

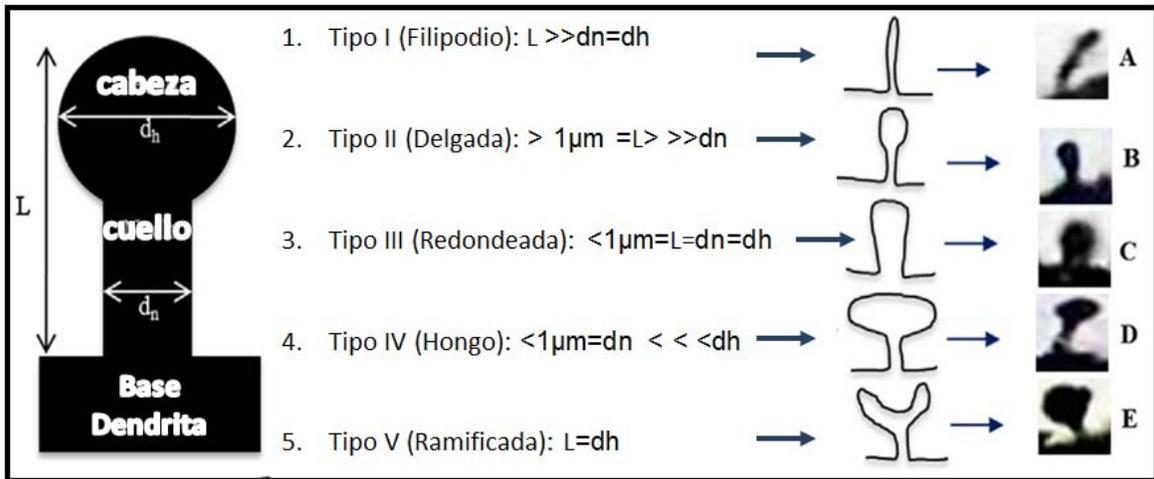


Figura 4. Morfología de las espinas dendríticas. Las espinas son clasificadas de acuerdo a diámetro de la cabeza, cuello de la espinas y la longitud de las mismas. La imagen muestra la relación entre esta medidas en la clasificación de espinas filipoideas, delgada, redonda, hongo y ramificada. Modificada de Maiti, P., 2015. d_h (diámetro de cabeza), d_n (diámetro de cuello), L (Longitud).

Las espinas son estructuras muy dinámicas, así su tamaño, forma y número cambian a través de la vida. El crecimiento dendrítico inicialmente sigue dictámenes genéticos que después se pueden modificar por niveles y patrones de actividad neuronal (Bartlett y Banker, 1984; Buchs y Muller, 1996; Matsuzaki et al., 2004; Nagerl et al., 2004; Zhou y Cohan, 2004; Alvarez y Sabatini, 2007). Durante el desarrollo posnatal, las espinas regordetas son abundantes (Yuste, 2013), aunque también pueden ser encontradas en etapas adultas (Fiala et al., 2002); las espinas delgadas cambian durante el desarrollo, sugiriendo su transformación en espinas tipo hongo (McAllister et al., 1996; Giancotti, 1997); sin embargo, otros estudios sugieren que puede ser un estado de inestabilidad morfológico (Nimchinsky et al., 2002). En la vejez se observa una reducción importante en el número de espinas, particularmente de las espinas delgadas (Luebke et al., 2010). Estudios *in vivo*, realizados en roedores han demostrado que la actividad conductual induce la formación y eliminación de espinas aún en etapas adultas (Yang et al., 2009). Diversas anomalías en el número y morfología de las espinas dendríticas han sido descritas en diferentes desórdenes del

neurodesarrollo como el síndrome de Down (Daroles y Caille, 2013), síndrome de Rett (Fiala et al., 2002; Xu et al., 2014), trastorno del espectro autista (Phillips y Pozzo-Miller, 2015), en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Fiala et al., 2002; Zigman y Lott, 2007), alteraciones neurológicas como la epilepsia (Jones et al., 2011) y desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia (Flores et al., 2015).

Ambientes Enriquecidos

Los ambientes enriquecidos (AE) favorecen condiciones de vivienda en una caja o jaula de exploración, a través de los cuales facilitan y refuerzan la estimulación motora, sensorial y cognoscitiva (Faherty et al., 2003; Nithianantharajah y Hannan 2006; Hirase y Shinohara, 2014). Al insertar a los animales en grupo, se fomenta la socialización y se estimula el olfato, gusto y audición (van Praag et al., 2000). Los objetos que se introducen a un AE varían en su composición, forma, tamaño, textura y color estimulando la visión y la sensibilidad de los sujetos (Figura 5). Además de reforzar la memoria y la cognición, los AE facilitan la formación de mapas espaciales y la habilidad para detectar novedades (Bose et al., 2010; Sztainberg y Chen, 2010); algo que también se favorece bajo condiciones de enriquecimiento natural (Landers et al., 2011). Los AE pueden tener variaciones que permiten asociar componentes sociales y físicos; esto permite estudiar la participación de áreas cerebrales como la corteza motora, somatosensorial, visual e hipocampal principalmente. Los AE fueron empleados por primera vez en pollos y posteriormente en ratones (Rosenzweig et al., 1962; Peña, 2007), en los cuales se observaron cambios en la anatomía cerebral, morfología neuronal, en la neurotransmisión y ejecución de tareas (Krech et al., 1960; Diamond et al., 1964). Los roedores expuestos a AE aumentan la expresión de genes implicados en la estructura neuronal, señalización y plasticidad sináptica, así como procesos de memoria (Rampon et al., 2000; Numakawa et al., 2004; Nithianantharajah y Hannan, 2006).



Figura 5. Modelo de Ambientes Enriquecidos (AE). En la fotografía se muestra una caja para AE que incluye objetos coloridos, con formas variadas y de texturas diversas, esto favorece la socialización con otros individuos y estimulan la plasticidad en diferentes regiones del cerebro.

Ambientes Enriquecidos (AE) y la morfología neuronal

Como se mencionó anteriormente, los AE promueven cambios en la morfología neuronal. Los roedores expuestos a AE presentan árboles dendríticos más complejos (Moser et al., 1994; Sutherland et al., 2010; Hirase y Shinohara, 2014) e incremento en la densidad de las espinas dendríticas en áreas corticales e hipocampales (Gelfo et al., 2009); así como aumento en el número de sinapsis y botones multisinápticos (Landers et al., 2011).

A nivel molecular, los AE favorecen el incremento en la expresión de proteínas presinápticas y postsinápticas como la sinaptofisina y PSD95 respectivamente (Nithianantharajah et al., 2004; Lambert et al., 2005; Nithianantharajah y Hannan 2006), así como de factores neurotróficos como el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Nithianantharajah y Hannan 2006; Anomal et al., 2013), o el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF por sus siglas en

inglés) (Torasdotter et al., 1998; Hirase y Shinohara, 2014). Por otro lado los AE activan genes involucrados en cambios de la morfología neuronal y espinogénesis (Hirase y Shinohara, 2014). Los AE también modifican la forma y número de las células gliales, así como la secreción de moléculas necesarias para la comunicación celular y sinaptogénesis (Sampedro-Piquero et al., 2014), sugiriendo que los AE estimulan diversos mecanismos implicados en la plasticidad cerebral.

Ambientes Enriquecidos y enfermedad

Diversos estudios demostraron que los AE tienen un efecto benéfico en modelos de trauma encefálico, isquemia cerebral, enfermedades neurodegenerativas y desórdenes del neurodesarrollo (van Praag et al., 2000; Nithianantharajah y Hannan, 2006; Bindu et al., 2007; Hutchinson et al., 2012). Por ejemplo, en ratones que fueron sometidos a isquemia cerebral y posteriormente insertados en AE, se observó mejoría en funciones motoras y cognitivas en comparación con sus controles (Johansson y Belichenko 2002; Nithianantharajah y Hannan, 2006). En ratones Ts65Dn utilizados como un modelo de síndrome de Down, se encontró que bajo condiciones de enriquecimiento presentan aumento en el número de espinas dendríticas y modificación en la morfología de las mismas en comparación con los controles del mismo modelo (van Praag et al., 2000). Resultados similares se observaron en modelos animales de varias patologías como: la enfermedad de Alzheimer (Arendash et al., 2004), la enfermedad de Parkinson (Jadavji et al., 2006) o el síndrome X frágil (Restivo et al., 2005). En modelos de estrés bajo condiciones de enriquecimiento, se observó que el aumento en el número de espinas dendríticas correlaciona con el incremento en los receptores para glucocorticoides (Sampedro-Piquero et al., 2014). Los AE pueden representar, por tanto, una analogía de lo que sucedería en las terapias de estimulación temprana o de rehabilitación neurológica en humanos.

Hipocampo y Ambientes Enriquecidos

El hipocampo es una estructura fundamental para el aprendizaje y la memoria, la orientación espacial, el procesamiento del miedo, el comportamiento social y la plasticidad cerebral, entre otras funciones cognitivas (Ahmed y Mehta, 2009). El hipocampo es localizado en la porción dorsomedial y ventrolateral del cerebro e histológicamente está constituido por *Cornu Ammonis* o Cuerno de Ammon (CA), una tira de neuronas piramidales, y el Giro Dentado (DG), formado por células granulares. A su vez el CA está subdividido en tres regiones: CA1, CA2 y CA3 (Ahmed y Mehta, 2009). Cada una de las regiones hipocampales tiene una anatomía y fisiológica con características particulares que podrían deberse a la expresión diferencial de genes (Lein et al., 2004; 2005; Amaral et al., 2007; Thompson et al., 2008, Kohara et al., 2014). Esta especialización celular puede estar asociada a la funcionalidad particular de cada una de las regiones hipocampales, por ejemplo, la regiones CA1 y CA3 están implicadas en procesos de memoria espacial (Moser et al., 1994), en tanto que la región CA2 se le asocia a funciones relacionadas con la sociabilización (Hitti y Siegelbaum, 2014; Alexander et al., 2016; Dudek et al., 2016). El GD es una zona con actividad neurogénica aún en la edad adulta (Kuhn et al., 1996; Kempermann et al., 1998; Amaral et al., 2007; Parent, 2007; Mongiat y Schinder 2011), la cual se favorece con el ejercicio físico (Redila y Christie, 2006; Pereira et al., 2007). El GD puede estar implicado funciones de reconocimiento espacial (Kesner et al., 2015). El hipocampo se comunica con otras estructuras cerebrales, como la corteza entorrinal y el hipotálamo a través de vías aferentes y eferentes (Chevalyere y Siegelbaum, 2010; Caruana et al., 2012; Cui et al., 2013; Kohara et al., 2014).

En los últimos años diversos trabajos han demostrado que el hipocampo es una estructura sensible a los AE. Bajo estas condiciones se pueden observar cambios en la expresión de genes y en la secreción de factores neurotróficos (Birch et al., 2013; Hirase, 2014), activación de la neurogénesis (Kempermann, 1998; Tashiro et al., 2007; Mongiat y Schinder, 2011; Birch et al., 2013; Garthe et al., 2013;) y facilitación de LTP (Eckert y Abraham, 2013; Duffy et al., 2001; Malik y Chattarji, 2012). La inserción de roedores en condiciones de enriquecimiento genera

cambios morfológicos en neuronas hipocampales (Darmopil et al., 2009; Eckert y Abraham, 2013; Faherty et al., 2003) y un incremento en la densidad de espinas dendríticas tanto en segmentos basales (Moser, 1994) como apicales (Malik y Chattarji, 2012). Los AE pueden revertir los déficit neurológicos y conductuales que se observan en modelos de daño hipocampal (Bindu et al., 2007), así como en modelos de envejecimiento (Kempermann et al., 2002; Mora et al., 2007). Estos trabajos en su conjunto sugieren que el hipocampo es una estructura altamente sensible a los procesos de plasticidad cerebral dependientes de la experiencia.

JUSTIFICACIÓN

Las espinas dendríticas son los principales sitios de contacto sináptico excitatorio en el cerebro. Por su alta movilidad, las espinas juegan un papel importante en la plasticidad sináptica; sin embargo, los mecanismos celulares implicados en este proceso no se conocen completamente. La TSP-1 es una proteína implicada en el desarrollo y mantenimiento de las espinas dendríticas (García et al., 2010), así como en el establecimiento de las sinapsis (Christopherson et al., 2005; García et al., 2010; Xu et al., 2010; Risher y Eroglu, 2012). La ausencia de TSP-1 afecta la recuperación funcional en roedores expuestos a isquemia cerebral (Liauw et al., 2008) y favorece la hiperexcitabilidad en modelos de epilepsia, lo que sugiere un papel importante en la plasticidad sináptica. Los ambientes enriquecidos son modelos de hábitat que implican la activación de diversas áreas cerebrales y favorecen la plasticidad cerebral a través de la formación de espinas dendríticas y sinapsis (Faherty et al., 2003; Gelfo et al., 2009; Hirase y Shinohara, 2014); sin embargo, la relación entre TSP-1, espinas dendríticas y plasticidad cerebral no se ha establecido totalmente, por lo que este trabajo buscó establecer si la TSP-1 participa en la formación de espinas dendríticas inducida por un modelo de plasticidad cerebral dependiente de la experiencia como son los ambientes enriquecidos.

Un mejor entendimiento de la participación de la TSP-1 en procesos de plasticidad sináptica ayudaría a conocer los mecanismos celulares implicados en la dinámica de las espinas dendríticas en condiciones fisiológicas o patológicas, lo que daría la posibilidad de crear estrategias terapéuticas o de neurorehabilitación para diversos padecimientos que impliquen patología de las espinas dendríticas.

HIPOTESIS

Los ratones que expresan TSP-1 y son expuestos a Ambientes Enriquecidos (AE) presentarán cambios en la anatomía neuronal así como en la morfología y densidad de las espinas dendríticas de las neuronas de proyección del hipocampo. Los ratones que carecen de TSP-1 y que son sometidos a los AE no tendrán cambios en la anatomía de las neuronas, ni en la morfología y densidad de las espinas dendríticas.

OBJETIVOS

General:

Conocer si la formación de espinas dendríticas en hipocampo de roedores expuestos a ambientes enriquecidos es dependiente de TSP-1.

Específicos:

1. Analizar los cambios morfológicos que se producen en las neuronas y espinas dendríticas de ratones expuestos a ambientes enriquecidos.
2. Determinar si en ratones deficientes de TSP-1 expuestos a ambientes enriquecidos se altera la morfología de la neurona y la densidad de las espinas dendríticas.
3. Establecer si los niveles de TSP-1 se incrementan en hipocampo de ratones sometidos a ambientes enriquecidos.

4. Analizar si existen cambios regionales en la expresión de TSP-1 en hipocampo de ratones sometidos a ambientes enriquecidos.
5. Comprobar si los niveles de TSP-1 correlacionan con el incremento de las espinas dendríticas.
6. Analizar si existen cambios en la morfología de las espinas asociados a TSP-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Ratones silvestres C57BL/6J (Wt) y ratones knock-out de TSP-1 (KO TSP-1) (The Jackson Laboratory), de cuatro semanas de edad se utilizaron durante toda la fase experimental. Los ratones fueron expuestos a ambientes no enriquecidos (ANE o grupo control) y a ambientes enriquecidos (AE o grupo experimental). Durante todo el proceso experimental los ratones fueron mantenidos a una temperatura de 20 ± 2 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (7:00 am a 7:00 pm), con alimento en pellet y agua *ad libitum*, todo el protocolo se realizó durante la fase de luz. El mantenimiento, manipulación y cuidado de los ratones siguieron las reglas establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-200-1999. El uso de los animales y el desarrollo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Psicología de la UNAM (FPSI/DIP/CE/07/2015).

Ambientes enriquecidos

Ratones Wt y ratones KO TSP-1 fueron destetados a los 21 días de edad y criados bajo condiciones de ANE y de AE durante 5 semanas. Para los ANE (un ratón en cada caja) fueron puestos en cajas de acrílico con las siguientes medidas: 16x28x13cm. Para los AE (3 ratones en cada caja) fueron puestos en cajas de acrílico de: 55cmx25cmx15cm, equipadas con una rueda para correr, juguetes de diferentes formas, color y texturas diversas, además de mangueras de PVC que simulaban túneles y pendientes. Los objetos fueron modificados en

estructura y posición dentro de la caja tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) a la misma hora (10 a.m.) previo aseo de las cajas y objetos. Los experimentos fueron cuadruplicados con ratones diferentes (Wt, n=24; TSP-1 KO, n=24). Este modelo de AE para ratones ha sido validado previamente (Sztainberg y Chen, 2010).

Después del periodo experimental los animales fueron sacrificados y sus cerebros procesados para la impregnación de Golgi y cuantificación de los niveles de TSP-1.

Impregnación de Golgi

La impregnación de Golgi es una técnica histológica, basada en la impregnación argéntica que tiñe preferentemente y de manera aleatoria a las neuronas. La sedimentación de las sales de plata utilizadas en esta técnica permite identificar la morfología de la superficie neuronal, haciendo visibles a las espinas dendríticas (Melendez-Ferro et al., 2009; Levine et al., 2013; Mancuso et al., 2013).

Para la realización de la impregnación de Golgi, los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (> 80mg/kg, i.p.) (Pet'sPharma USA), perfundidos vía cardíaca con solución salina al 0.9% y fijados con PFA/PBS 4% (Paraformaldehído 4% con un Buffer de Fosfatos 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 de Golgi (Avila-Costa et al., 2006). Bloques de 3-4 mm se fijaron en una solución de Golgi conformada por dicromato de potasio al 3% (Electron Microscopy Science) y tetraóxido de osmio al 0.3% (Electron Microscopy Science, USA), en la cual permanecieron por 7 días a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Después de este periodo los bloques de cerebro se cambiaron a una solución de nitrato de plata al 0.75% (Electron Microscopy Science, USA) por 24 horas para su impregnación. Los cerebros fueron encastrados en parafina y cortados coronalmente en rebanadas de 90 µm de grosor con un microtomo semiautomático (American Optical Company). Las rebanadas fueron deshidratadas con alcohol absoluto (J.T. Backer, México) por 10 minutos (2 veces) y aclaradas con esencia de clavo (Cosmopolitan, México),

durante 10 minutos seguido de la inmersión en xilol (Hycel, México) por 10 minutos adicionales. Las rebanadas procesadas se montaron en portaobjetos y fueron recubiertos con Entellan (Merck Millipore, USA). Una vez montado, el tejido se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 días para su posterior análisis. Las preparaciones de los grupos experimentales fueron equivalentes y equidistantes a los grupos control.

Análisis de Sholl para la morfología neuronal

Las características morfológicas de las neuronas y el análisis cuantitativo de la arborización dendrítica se realizó a través de un análisis semiautomatizado de tipo Sholl a doble ciego (Kutzing et al., 2010; Langhammer et al., 2010). Para lo cual se analizaron al menos 10 neuronas de manera aleatorizada y por cada ratón en las subregiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo dorso-ventral y medial (bregma: -1.82). Si bien se privilegió a neuronas del stratum radiatum, la selección de las mismas se realizó en todas las capas del hipocampo tomando como límites de las subregiones hipocámpales propuestas por Lein y colaboradores (Lein et al., 2004). Sólo las neuronas que mostraron una impregnación completa del árbol dendrítico, que se encontraran relativamente aisladas de las neuronas vecinas y que no cruzaron con dendritas de otras neuronas fueron seleccionadas para el análisis. Una vez seleccionadas las neuronas se capturaron diversas imágenes con una cámara digital (Euromex microscopes, Holanda) conectada a un microscopio óptico (US MICROS IV, Holanda) con un objetivo 40x.

Las imágenes se capturaron en serie (*Z-stack*), con espacio entre cada sección de 0.5 μm , 10 imágenes en formato *Z-stacks* fueron tomadas de cada grupo y procesadas en una resolución 2560 x 1920 pixeles con el programa ImagenFocus v3.0. Todas las imágenes fueron calibradas a 100 μm / 859 pixeles e importadas al programa libre ImageJ/fiji (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2014), convertidas al formato de mapa de 8 bits y procesadas con diferentes herramientas (plugins) de este programa. Mediante el *plugin Z Project* las imágenes capturadas en *Z-stacks*

fueron acopladas para tener una mejor definición de la morfología neuronal, la imagen final fue guardada con formato Tiff e importada al plugin NeuroImageJ. Este plugin permite tener información acerca de la posición de segmentos de dendritas en un espacio relativo del resto de la célula y realizar un modelado de la arborización neuronal. Las coordenadas obtenidas fueron transferidas al programa Bonfire de Matlab (Mathworks, versión 8.5.0, R2015a), el análisis de las coordenadas permitió generar imágenes en formato SWC, que fueron importadas al programa NeuronStudio. Las imágenes procesadas en NeuronStudio permitieron hacer correcciones y definir información estructural acerca de la conectividad entre neuritas para tener una descripción completa del árbol dendrítico y los diferentes tipos de arborizaciones. Con los datos obtenidos, se realizó un nuevo análisis en el programa Bonfire de Matlab que permitió conocer el número de dendritas primarias, número de dendritas secundarias, ramificaciones, número de racimos dendríticos por célula y número de terminales neuríticas (Figura 6A y B).

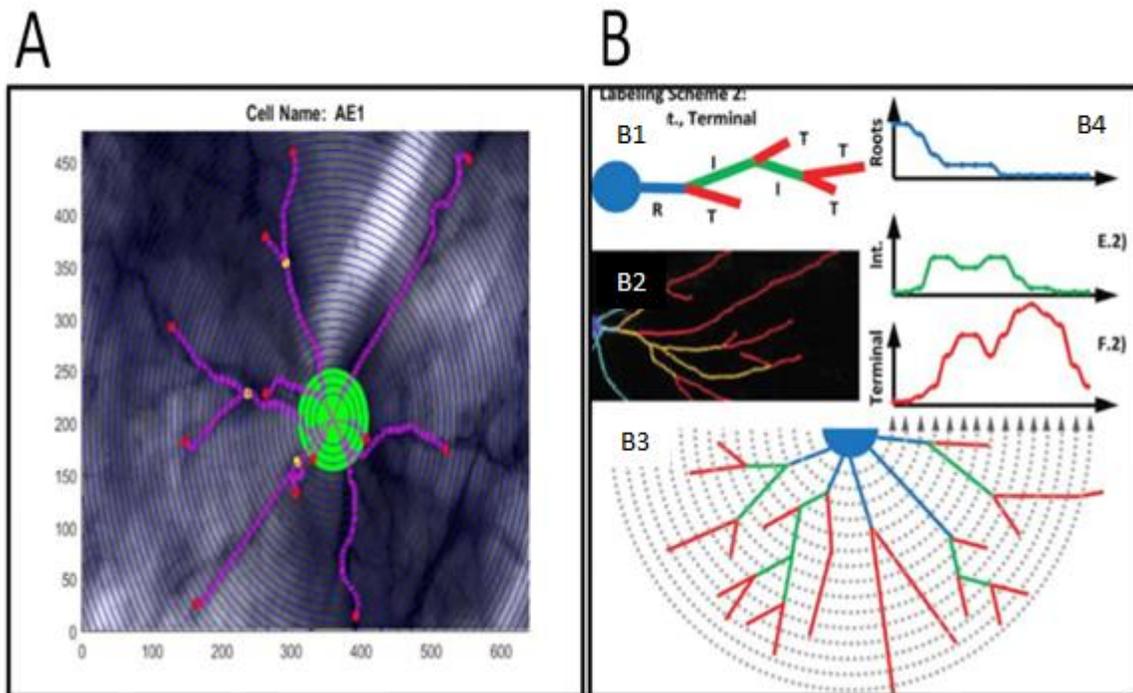


Figura 6. Análisis de Sholl para la morfología neuronal. **A)** La imagen muestra los círculos concéntricos generados a partir del soma, cada círculo permite el análisis de los segmentos dendríticos, longitudes e intersecciones de las ramificaciones. La distancia entre cada círculo es de 3 μm . **B)** La imagen muestra el resultado del análisis semiautomatizado de sholl (**B1**). Se aprecian los puntos de ramificaciones dendríticas primarias, secundarias o terciarias asignadas como Raíz (R), Intermedia (I) y Terminal (T) respectivamente obtenidos de la dendrita (**B2**); el número de círculos depende del número de ramificaciones y el largo de la neurona (**B3**). Las gráficas representan el número de ramificaciones que se obtienen en cada una de las intersecciones de los círculos concéntricos (**B4**). Modificado de (Langhammer et al., 2010).

Análisis cuantitativo de espinas dendríticas

La estimación del número de espinas dendríticas se realizó a través de un método a doble ciego y semiautomatizado desarrollado por Orłowski y Bjarkam (2012), tomando en cuenta los siguientes criterios: a) selección de una dendrita lo más recta posible; b) se consideró espina a cualquier protuberancia que emanara de esa dendrita; c) se seleccionó la dendrita que presentara espinas con mayor nitidez y d) la cuantificación de las espinas se normalizó en fragmentos de 50 μm a partir del soma (Figura 7). Las dendritas seleccionadas se tomaron de neuronas de las regiones CA1, CA2, CA3 y GD del hipocampo dorso-ventral y medial del *stratum radiatum* con la intención de realizar un comparativo entre cada región.

Una vez seleccionadas las dendritas, 60 imágenes en serie (*Z-stacks*) con un espacio de 0.5 μm entre sección y sección fueron tomadas de cada grupo y procesadas en una resolución 2560 x 1920 píxeles con el programa ImagenFocus v3.0. Las imágenes fueron calibradas a 100 μm /2209 píxeles y ordenadas en grupos de 10 secciones. Las imágenes en Z-stack fueron importadas al programa ImageJ para elaborar una imagen digitalizada de la región de interés (ROI, por sus siglas en inglés); conteniendo el fragmento de dendrita que fue seleccionado en cada fotografía (Figura 7A), las partes remanentes de la fotografía fueron borrados. Un primer conteo manual del número de espinas fue realizado sobre esta imagen (Figura 7B), posteriormente se realizó un análisis semiautomatizado para corroborar el número de espinas, para lo cual las imágenes fueron binarizadas con el programa ImageJ (Figura 7C), con la intención de obtener una imagen blanco y negro sobre la cual se procedió a generar una “esqueletonización” de la fotografía binaria (Figura 7D). La “esqueletonización” es un método implementado en el programa ImageJ basado en la eliminación de algoritmos (Orlowski, et al., 2012), que remueve los píxeles de los bordes del objeto en una imagen binaria hasta reducirlos a formas de un sólo píxel de ancho (topología del esqueleto) permitiendo identificar las protuberancias reales que emergen de la dendrita (Figura 7D), las imágenes obtenidas fueron posteriormente corregidas (Figura 7E y F) para realizar un análisis cuantitativo del esqueleto mediante el plugin Analyzeskeleton. Esta segunda “esqueletonización” permite descartar irregularidades de la superficie de la dendrita que podrían dar una estimación errónea en el número de espinas; finalmente se corroboraron protuberancias, las cuales fueron consideradas espinas dendríticas.

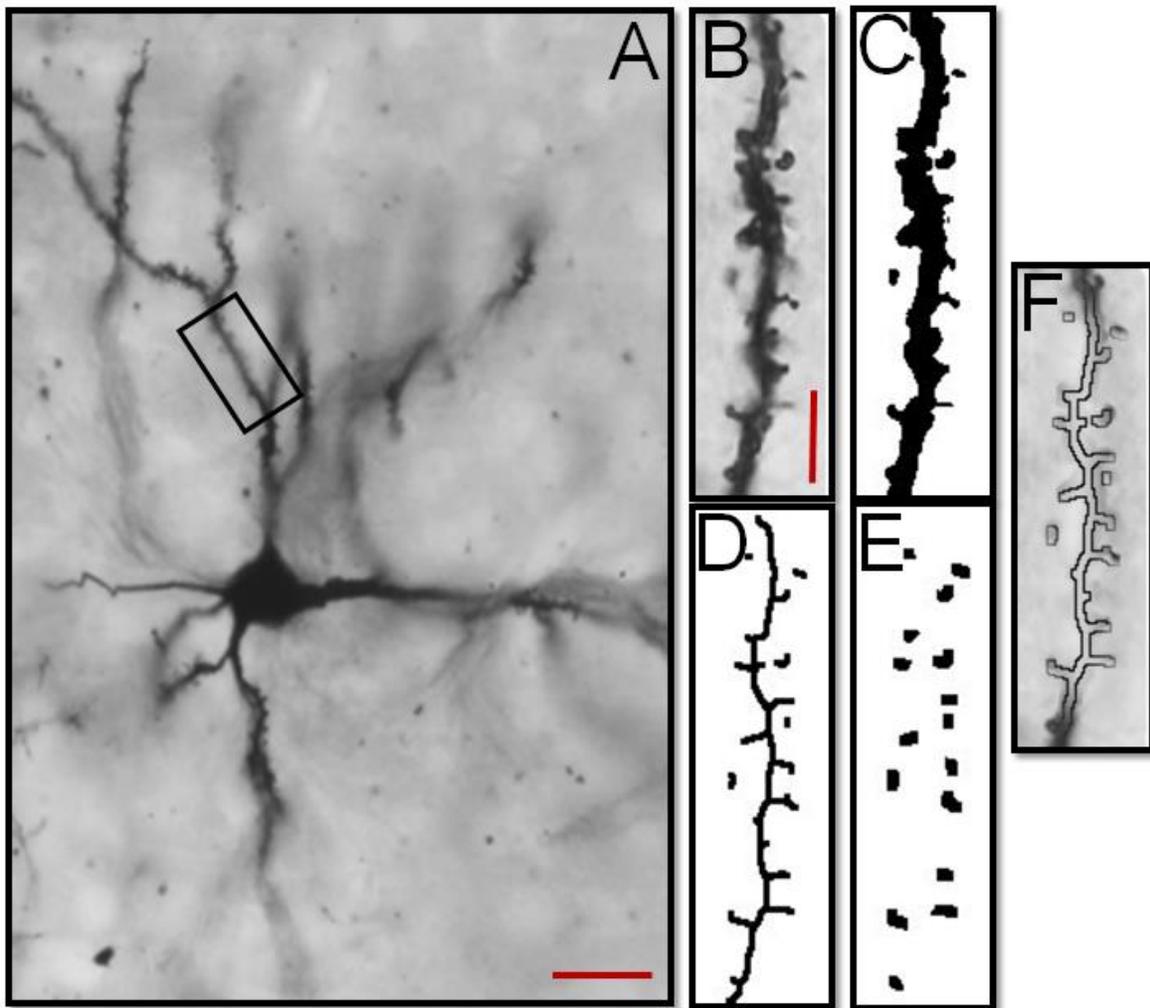


Figura 7. Imagen de neurona que sirve para ejemplificar el método semiautomatizado para la estimación de espinas dendríticas. **A)** Localización de la región de interés, **B)** Fragmento de dendrita analizado, **C)** réplica binaria del fragmento obtenido en B, **D)** esqueleto calculado de la imagen binaria, **E)** puntos terminales del esqueleto, **F)** imagen sobrepuesta del esqueleto y los puntos terminales. Escala de barra = 10 μ m.

Clasificación de espinas dendríticas

La clasificación de las espinas dendríticas se realizó a través del método propuesto por Risher et al., (2014), con pequeñas modificaciones. El método permite identificar la morfología de las espinas dendríticas en células impregnadas con Golgi convencional. Las imágenes capturadas para la cuantificación de las espinas fueron empleadas para la clasificación de las espinas. Brevemente, la

imagen final *Z-stack* procesada en *Z project*, se convirtió a un formato RGB color y se guardó como una secuencia de imágenes. Posteriormente se empleó el software libre RECONSTRUCT (<http://synapses.clm.utexas.edu>) para elaborar un trazado ininterrumpido sobre la dendrita, de 10 μm de longitud. Con las espinas dendríticas visualizadas en este segmento, se realizó una medición del diámetro de la cabeza y la longitud del cuello de la espina, que permitió la clasificación de las espinas con los siguientes criterios: “filipodia”, longitud de cuello $>2 \mu\text{m}$, “delgada-larga” longitud de cuello $>1\mu\text{m}$ pero $<2\mu\text{m}$, “delgada” longitud de cuello $<1\mu\text{m}$, “hongo” cabeza con un diámetro $>0.6 \mu\text{m}$ y “redondeada” para una ratio cabeza/cuello $\leq 1\mu\text{m}$ (Figura 8). Un aproximado de 85 espinas dendríticas por grupo fueron utilizadas para el análisis morfológico.

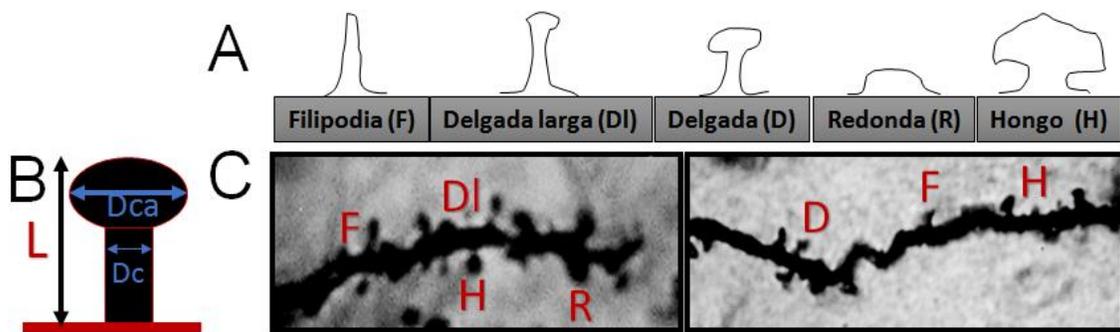


Figura 8. Identificación de espinas dendríticas. **A)** Esquema de los tipos de espina comúnmente encontrados, de acuerdo a la longitud de su cuello (L), diámetro de su cuello (D_c) y diámetro de la cabeza (D_{ca}) **B)**; **C)** Ejemplo de espina en forma de filipodia (F), hongo (H), redondeada (R), delgada (D) y delgada larga (DI) encontradas en este trabajo.

Determinación de TSP-1

Los niveles de TSP-1 fueron determinados a partir de las regiones CA1, CA2/CA3 y GD del hipocampo en tejido fresco y siguiendo el lineamiento de los cortes sugerido por Sultan y colaboradores (2013), para los 3 grupos de ratones expuestos a ANE y 3 grupos de ratones expuestos a AE. Brevemente, los cerebros fueron homogenizados por separado en un buffer RIPA por medio de un homogeneizador Ultra-Turrax (Ika Works) y centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C para separar la fracción soluble. Los niveles de TSP-1 fueron

determinados inmediatamente por un inmunoensayo de ELISA (R&D system), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los niveles de TSP-1 fueron obtenidos a partir de una curva estándar de concentraciones conocidas de TSP-1 y los resultados fueron expresados como ng/ml (García et al., 2010).

Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS (versión 22.0). Una prueba de “t” no pareada fue usada para todas las comparaciones entre grupos. La normalización de los datos se realizó mediante las pruebas Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Cuando nuestras muestras no cumplían criterios de normalidad, se utilizó U de Mann-Whitney. La comparación entre los tipos de espinas se realizó mediante ANOVA multivariada. Los resultados se expresaron en promedios \pm error estándar, un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado para indicar la significancia estadística.

RESULTADOS

Los Ambientes Enriquecidos modifican la morfología dendrítica

El análisis cualitativo de la tinción de Golgi en cerebros de ratones Wt y KO TSP-1 demostró que las células mantenían un excelente estado de impregnación con somas bien definidos y dendritas basales y apicales cubiertas por espinas dendríticas (Figura 9), en el hipocampo. Con el fin de determinar si los AE modificaban la morfología neuronal como previamente se ha reportado (Faherty et al., 2003; Hirase y Shinohara, 2014), se realizó un análisis de Sholl para cuantificar cambios en la arborización dendrítica en neuronas hipocampales (Bose et al., 2010; Gensel et al., 2010; Kutzing et al., 2010; Langhammer et al., 2010; Binley et al., 2014).

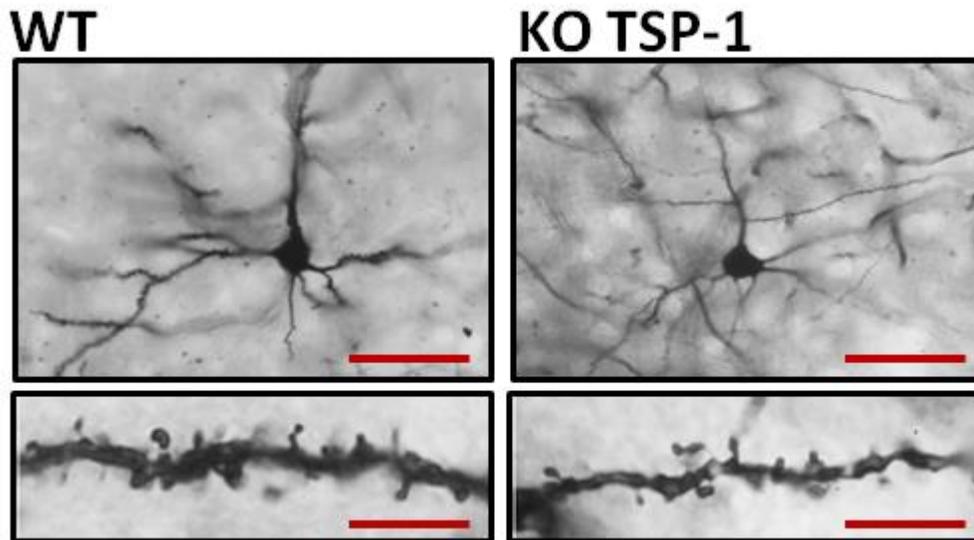


Figura 9. Impregnación de Golgi en neuronas piramidales del hipocampo (CA2/3). En el panel superior se muestra la morfología neuronal de ratones Wild type (Wt) y ratones deficientes de TSP-1 (KO TS-1). En el panel inferior se muestra una magnificación de la dendrita con diferentes espinas. Escala de la barra en panel superior = 100 μ m y panel inferior = 10 μ m.

Nuestros resultados muestran que las neuronas hipocampales de ratones Wt expuestos a AE no presentaron cambios significativos en su morfología general de las neuronas con respecto a los ratones mantenidos en condiciones no enriquecidas (Figura 10 A). El análisis semiautomatizado de Sholl confirmó que el número de ramificaciones dendríticas permanece sin cambio entre ambos grupos (Figura 10 B). Tampoco se observaron cambios significativos en las dendritas primarias, secundarias y terciarias (Figura 10 D) así como en los puntos terminales de las dendritas (Figura 10 C). Sin embargo, se observó que los AE producen disminución significativa en la longitud de las ramificaciones dendríticas (U de Mann-Whitney, $p= 0.023$) (Figura 11A); particularmente en las dendritas secundarias y terciarias comparados con las dendritas de los ANE (Figura 11 B).

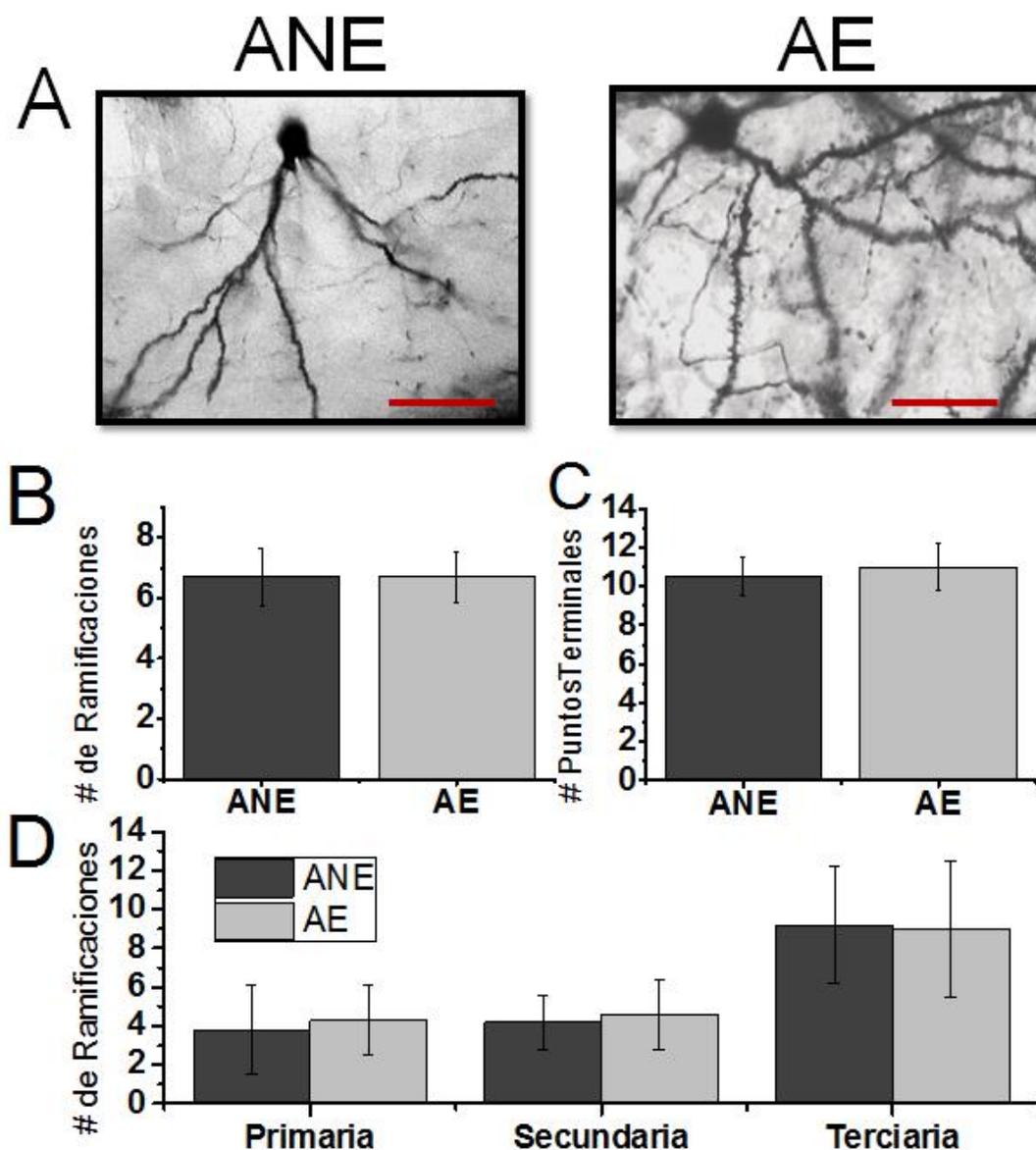


Figura 10. Los AE no modifican las arborizaciones dendríticas. (A) Morfología general de las neuronas de ratones expuestos a ANE y AE. Análisis de Sholl utilizado para cuantificar cambios en el número de ramificaciones dendríticas (B), puntos terminales de la dendrita (C) y tipo de dendrita (D). Los datos son expresados como el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$. Escala de la barra = 100 μ m.

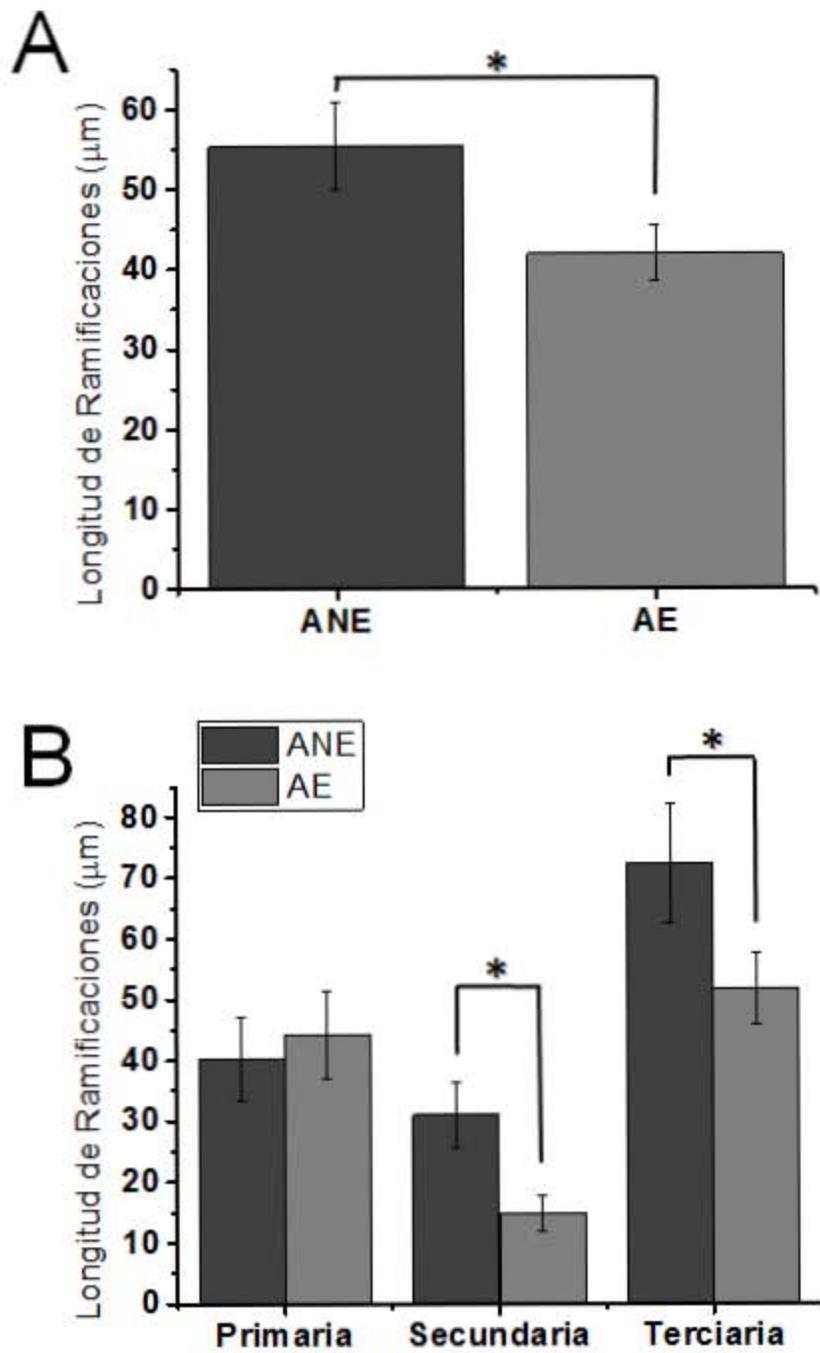


Figura 11. Los AE modifican la longitud de las ramificaciones dendríticas. El análisis de Sholl muestra una disminución en la longitud de las ramificaciones dendríticas (A), el cual puede observarse principalmente en la porción secundaria y terciaria de la neurona (B). Las barras representan el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$.

Para conocer si los AE incrementaban la complejidad de las dendritas en cada neurona se realizó un análisis de Sholl. La complejidad fue considerada como el número de intersecciones dendríticas a lo largo de las dendritas a partir del centro del soma (Binley et al., 2014). Nuestros resultados muestran que los AE incrementan de manera significativa ($p < 0.05$, U de Mann-Whitney, $n = 10$) el número de intersecciones en las dendritas entre los 25 y 50 μm de longitud comparado con los ANE (Figura 12). Este resultado también se observó en los segmentos secundarios y terciarios de las dendritas.

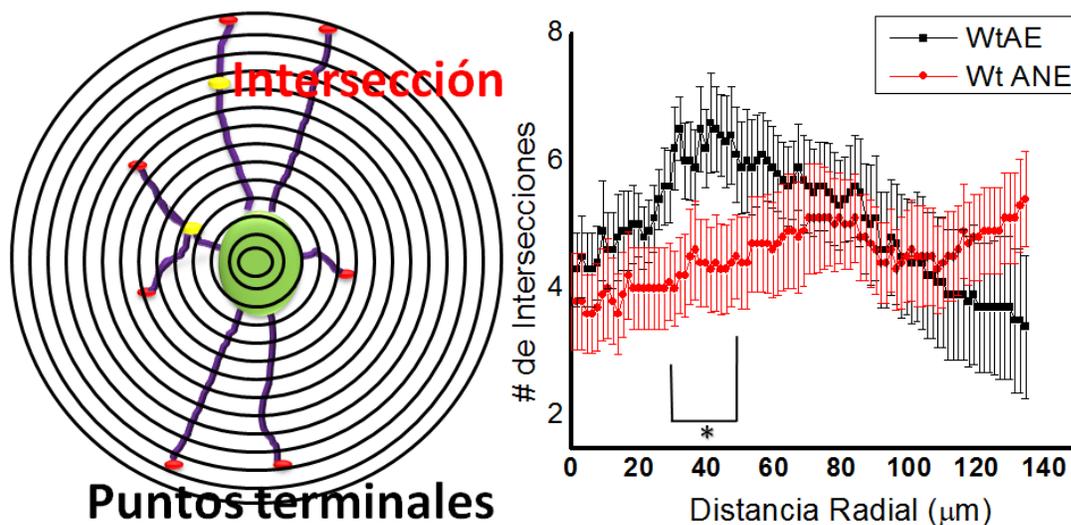


Figura 12. Los AE incrementan la complejidad de las arborizaciones dendríticas. **A)** Imagen representativa de una intersección definida como el número de veces que una dendrita intersecta con un círculo concéntrico. **B)** Análisis de la complejidad de la neurona a partir del número de intersecciones promedio (10 neuronas) en 3 ratones Wt del grupo experimental y grupo control. Los datos representan el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$.

Los AE incrementan la densidad de espinas dendríticas

El análisis del número de espinas dendríticas se realizó en ratones Wt sometidos a AE y ANE. Los resultados mostraron un incremento significativo en el número de espinas dendríticas de las neuronas del hipocampo de los ratones sometidos a AE

(Figura 13 A). Este incremento se observó tanto en las dendritas basales como en las dendritas apicales (AE 15.21 ± 0.83 ; ANE 11.05 ± 0.60 espinas/50 μm ; $p < 0.05$, $p = 0.001$, $n=60$) (Figura 13B).

Un análisis comparativo de las regiones hipocampales demostró que los AE incrementan el número de espinas dendríticas de manera diferencial (CA1: ANE, 11.0 ± 2.9 , $n=10$, AE, 13.8 ± 6.1 espinas/50 μm , $n=20$; CA2/CA3: ANE, 11.0 ± 4.0 , $n=10$, AE 16.8 ± 7.3 espinas/50 μm , $n=20$); Sin embargo, solamente en la región CA2/CA3 tuvieron un incremento estadísticamente significativo (U de Mann-Whitney, $p=0.042$) en el número de espinas dendríticas (Figura 14 A). De manera interesante se observó que los AE no modifican significativamente el número de espinas dendríticas en el GD (ANE, 13.6 ± 3.9 espinas/50 μm , $n=20$; AE, 10.3 ± 4.3 espinas/50 μm , $n=10$, U de Mann-Whitney, $p=0.48$).

Los Ambientes Enriquecidos producen un incremento en los niveles de TSP-1 en el hipocampo

Con el fin de establecer si la formación de espinas dendríticas inducida por los AE es dependiente de TSP-1, se cuantificó la concentración de TSP-1 en cerebros de ratones expuestos a ANE ($n=9$) y AE ($n=12$). Los resultados mostraron que cuando los ratones son sometidos a condiciones de enriquecimiento, se presenta un leve incremento en los niveles de TSP-1 en el hipocampo (ANE, 11.4 ± 0.6 ng/ml, AE, 12.7 ± 0.6 ng/ml; U de Mann-Whitney $p= 0.004$) (Figura 13 C). Con el fin de determinar si este incremento era selectivo para cada una de las regiones hipocampales se realizó una disección precisa de las regiones CA1, CA2/CA3 y GD (Sultan et al., 2013), y se midieron los niveles de TSP-1. Los resultados mostraron un aumento significativo de los niveles de TSP-1 en la región CA2/CA3 ($p=0.020$) así como en el GD ($p=0.020$) cuando los ratones fueron sometidos a AE (CA1: ANE, 11.4 ng/ml, AE, 11.9 ng/ml; CA2/CA3 ANE, 10.7 ng/ml, AE, 12.6 ng/ml; GD ANE 12,2 ng/ml; AE, 13.5 ng/ml) (Figura 14 B).

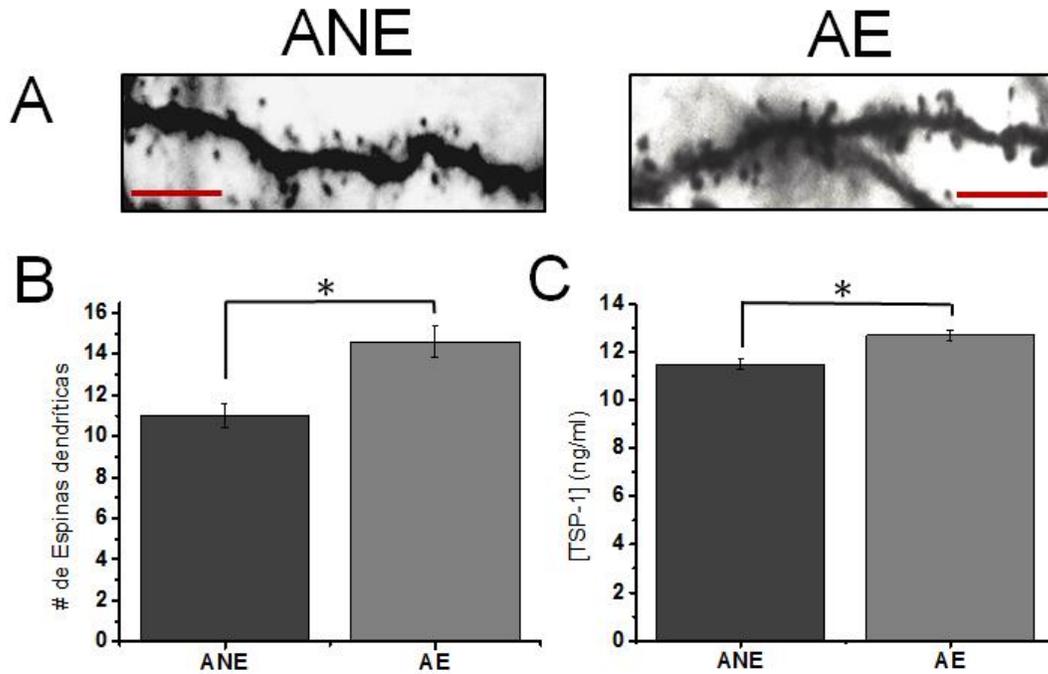


Figura 13. Los AE incrementan la formación de espinas dendríticas y la concentración de TSP-1. **A)** Segmento de dendritas con espinas de ratones expuestos a ANE y AE; **B)** Cuantificación de espinas dendríticas bajo las mismas condiciones. **C)** Concentración de TSP-1 en el hipocampo. Los datos representan el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$. Escala de la barra = 10 μ m.

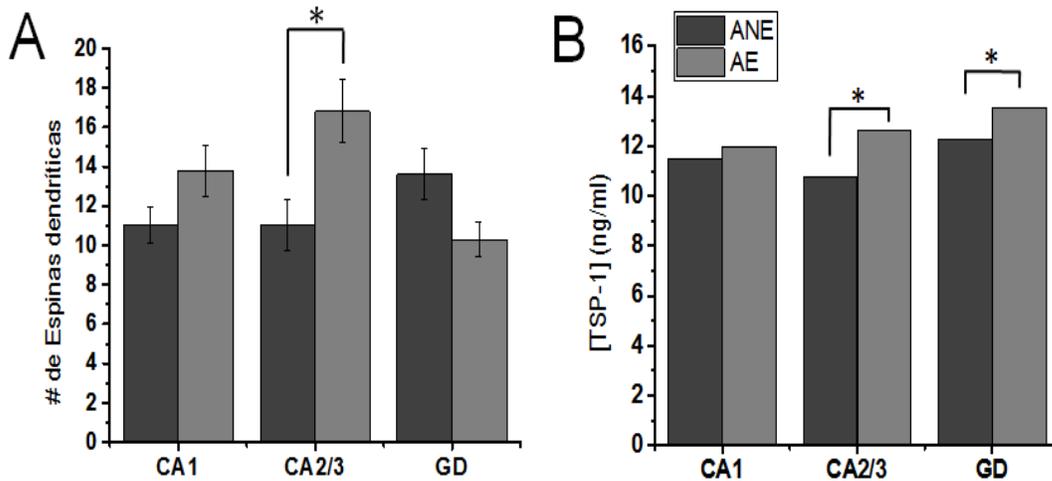


Figura 14. Los AE inducen un incremento selectivo de espinas dendríticas en el hipocampo dependiente de TSP-1. **(A)** Aumento significativo del número de espinas dendríticas en CA2/3 ($p < 0.05$) y de los niveles de TSP-1 **(B)** en las regiones hipocámpales CA2/3 y GD. Los datos representan el promedio \pm el error estándar. * $p < 0.05$.

La morfología neuronal se modifica en ratones KO TSP-1

Con el fin de conocer si la TSP-1 tiene un papel determinante en la formación de espinas dendríticas en las neuronas hipocampales, los ratones KO TSP-1 fueron sometidos a condiciones de enriquecimiento y a condiciones estándar. Primero se analizó si los AE producían cambios en la morfología neuronal de ratones KO TSP-1 (Figura 15). Bajo estas condiciones las neuronas presentaron menor ramificación dendrítica. El análisis de Sholl demostró que los ratones KO TSP-1 muestran una disminución significativa ($p = 0.03$) en el número de ramificaciones comparado con ratones Wt ($n=10$, KO TSP-1: 3.0 ± 1.5 ; Wt: 6.7 ± 2.9). La exposición de los ratones KO TSP-1 a AE no modificó este resultado ($n=10$, KO TSP-1: 1.7 ± 0.4 ; Wt: 6.7 ± 2.7 , $p=0.02$) (Figura 16A). Adicionalmente, se observó que los ratones KO TSP-1 presentaron una longitud mayor de la arborización dendrítica que la observada en ratones Wt ($n=10$, KO TSP-1: 92.4 ± 19.5 ; Wt: 55.3 ± 17.5). La longitud de las ramificaciones no se modificó cuando los ratones fueron sometidos a AE ($n=10$, KO TSP-1: 77.3 ± 21.9 ; Wt: 41.9 ± 11.0 , $p=0.002$) (Figura 16B).

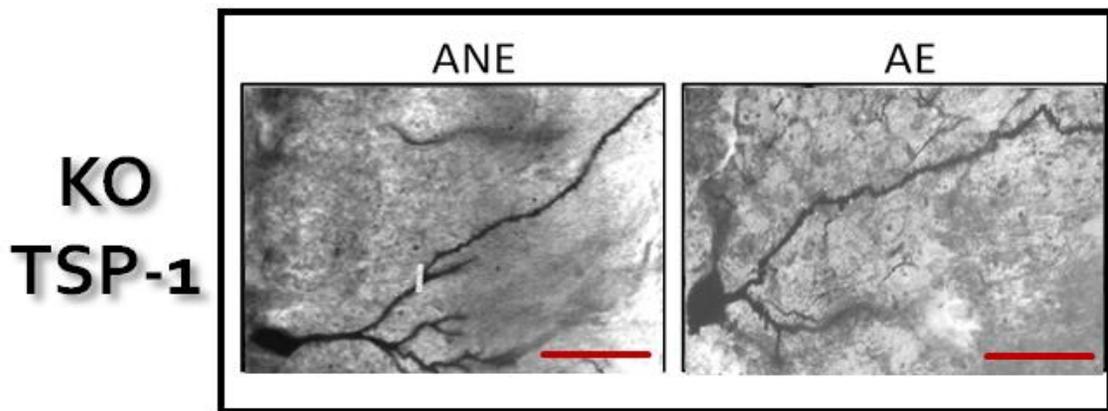


Figura 15. Neuronas hipocampales de ratones KO TSP-1 sometidos a AE y ANE. La fotografía no muestra cambios significativos en la arborización ni en la longitud de las ramificaciones. Escala de la barra correspondiente a $100 \mu\text{m}$.

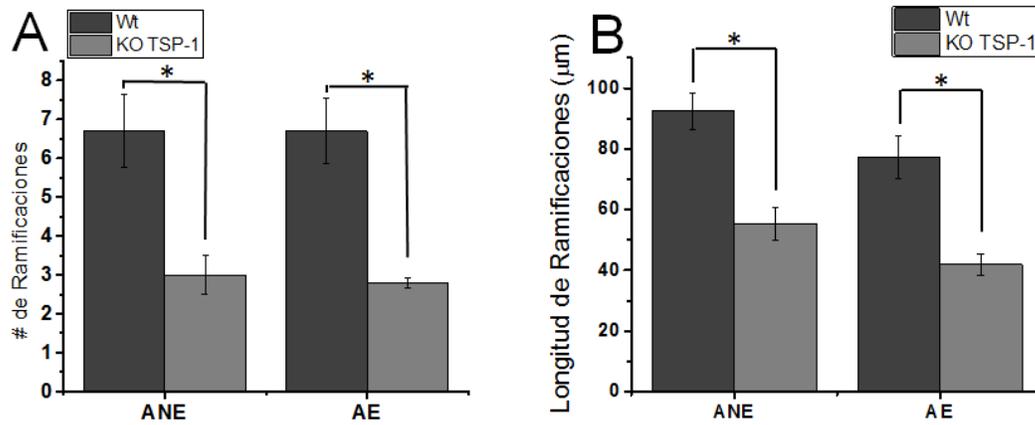


Figura 16. Los ratones KO TSP-1 muestran reducciones significativas ($* p < 0.05$) en el número y longitud de las ramificaciones dendríticas, figuras A y B, tanto en Ambientes no Enriquecidos (ANE) como en Ambientes Enriquecidos (AE). Los datos representan el promedio \pm error estándar.

En el mismo análisis de Sholl se observó que las neuronas de los ratones KO TSP-1 presentan menos intersecciones, lo que sugiere menor complejidad con respecto a las neuronas de los ratones Wt (Figura 17). Cuando ambos grupos son sometidos a AE los ratones Wt incrementan el número de intersecciones mientras que los ratones KO TSP-1 muestran un leve decremento, entre los 20-50 μm del largo de la dendrita. La disminución es significativa a partir de los 80 μm del largo de la dendrita (Figura 17, Figura 18), lo que sugiere que la TSP-1 es necesaria en la plasticidad neuronal.

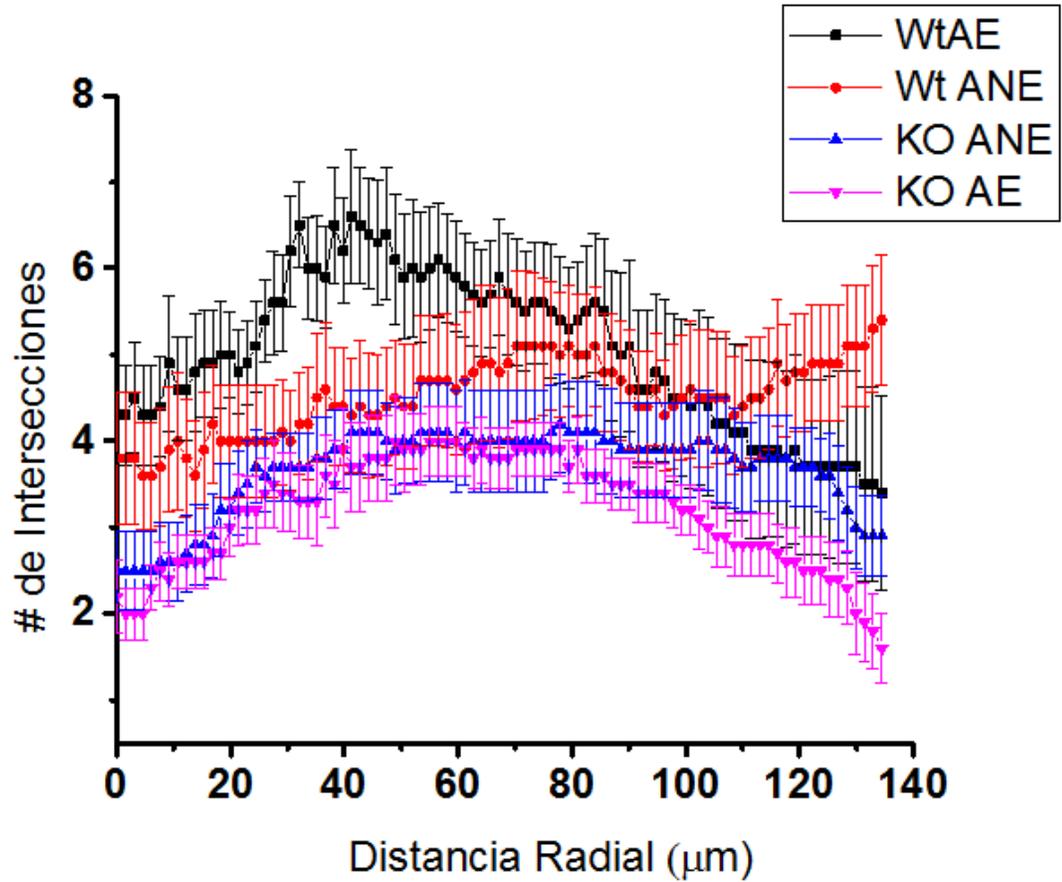


Figura 17. La gráfica muestra la complejidad neuronal de ratones Wt y KO TSP-1 sometida a ANE y AE. La TSP-1 es necesaria para estimular la complejidad neuronal. Los ratones Wt después de ser sometidos a AE muestran incremento en el número de intersecciones, los ratones KO TSP-1 muestran menor complejidad la cual no se revierte después de ser sometidos a AE.

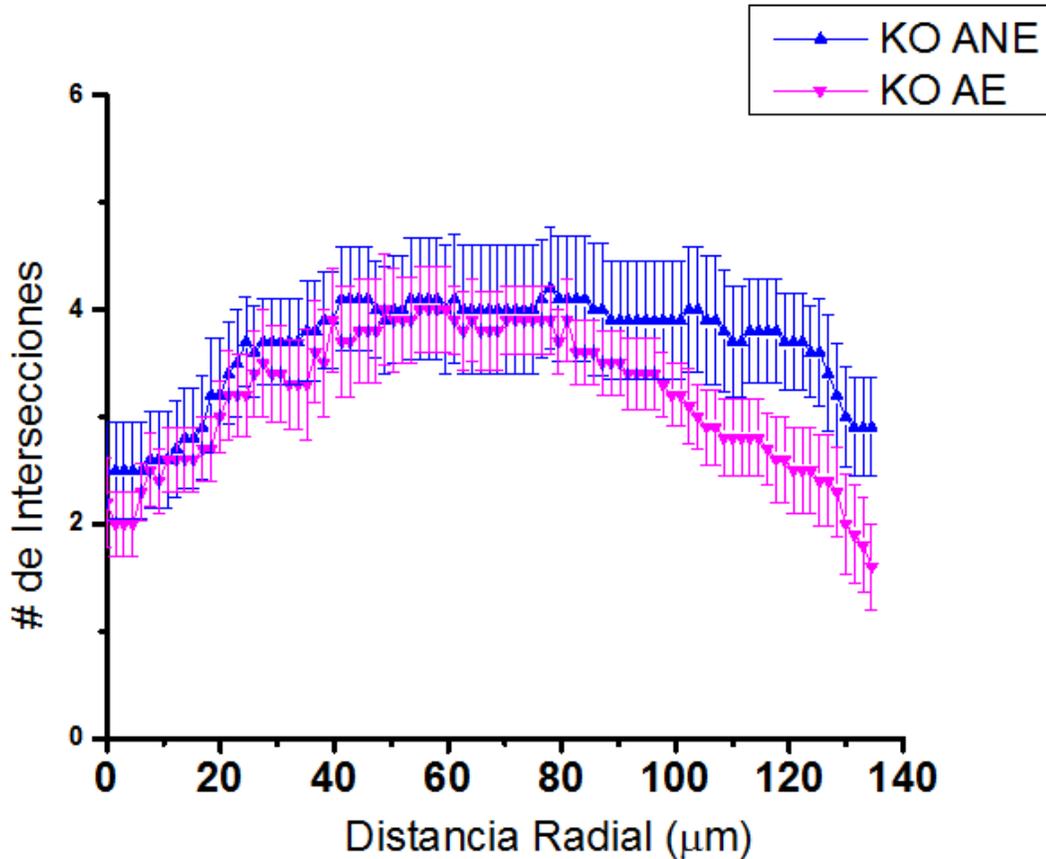


Figura 18. Los AE no incrementan la complejidad neuronal en ratones KO TSP-1. El número de intersecciones no se modifica de manera significativa a lo largo de la distancia radial de la neurona aún después de que los ratones KO TSP-1 son expuestos a AE. Los datos representan el promedio \pm el error estándar.

Los AE no incrementan la densidad de espinas dendríticas en ratones KO TSP-1

Dado que la morfología general de la neurona se ve afectada en los ratones KO TSP-1 bajo condiciones de AE y ANE, se investigó si los cambios observados en las ramificaciones dendríticas se extienden a las espinas dendríticas. Nuestros resultados muestran que los ratones KO TSP-1 expuestos a ANE tienen el mismo número de espinas dendríticas que los ratones Wt (KO TSP-1: $n=29$, 11.6 ± 3.3 espinas/ $50\mu\text{m}$; Wt: $n=29$, 10.2 ± 1.0 espinas/ $50\mu\text{m}$, $p=0.082$). Cuando los ratones KO TSP-1 son sometidos a AE se observa un pequeño incremento en la densidad

de espinas dendríticas (KO TSP-1: $n=27$, 13.1 ± 3.3 espinas/ $50\mu\text{m}$; Wt: $n=27$, 12.8 ± 4.3 espinas/ $50\mu\text{m}$); sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo, lo que sugiere que la TSP-1 es necesaria para la formación de espinas dendríticas (Figura 19).

La densidad de espinas dendríticas se ve disminuida en ratones carentes de TSP-1 en las porciones distales de la dendrita

Debido a que el número de espinas se incrementa conforme la dendrita se aleja del soma hasta llegar a los puntos terminales (Marin-Padilla, 1967; Elston y DeFelipe, 2002), se realizó un análisis para determinar si el número de espinas dendríticas cambiaba a partir del punto terminal. Para lo cual nosotros tomamos las ramificaciones apicales y partiendo de sus puntos terminales realizamos una medición de $50\mu\text{m}$ de distancia y cuantificamos el número de espinas dendríticas. Nuestros resultados mostraron que bajo condiciones de ANE, los ratones KO TSP-1 presentan una disminución en la densidad de espinas dendríticas con respecto a los ratones Wt (KO TSP-1: $n=30$, 13.4 ± 2.7 espinas/ $50\mu\text{m}$ = 0.322 espinas/ μm ; Wt: $n=30$, 23.2 ± 3.7 espinas/ $50\mu\text{m}$ = 0.538 espinas/ μm , $p=0.000$). Al someterlos a AE los ratones KO TSP-1 presentan un leve incremento en el número de espinas; sin embargo, este aumento se encuentra por debajo de las condiciones control (KO TSP-1: $n=30$, 20.1 ± 2.9 espinas/ $50\mu\text{m}$ = 0.46 espinas/ μm ; Wt: $n=30$, 29.6 ± 4.6 espinas/ $50\mu\text{m}$ = 0.684 espinas/ μm $p=0.000$) (Figura 20). Estos resultados confirman la importancia de la TSP-1 en la formación de espinas dendríticas.

Los AE modifican la morfología de las espinas dendríticas

La morfología de las espinas dendríticas puede ser modificada por la propia actividad neuronal y la estimulación ambiental (Nimchinsky et al., 2002). Para determinar si los AE podrían tener efecto sobre el tipo de espinas estandarizamos el método semiautomatizado propuesto por Risher et al., (2014). Nuestros resultados muestran que las dendritas de ratones Wt y KO TSP-1 presentan

espinas en forma de hongo, filipodio, delgada y delgada larga. Con este método no fue posible identificar espinas regordetas. Tanto ratones Wt como KO TSP-1 presentaron predominio de espinas tipo hongo; sin embargo, los ratones KO TSP-1 mostraron una disminución en la forma filipodio, delgada y delgada larga. Bajo condiciones de estimulación se observa una disminución de la forma filipodio y hongo y un incremento en la forma delgada. Esta disminución no es estadísticamente significativa. En el caso de los ratones KO TSP-1 los AE disminuyen las espinas tipo hongo y delgada larga, pero incrementan los filipodios y la forma delgada; sin embargo, estos cambios tampoco son estadísticamente significativos (Figura 21).

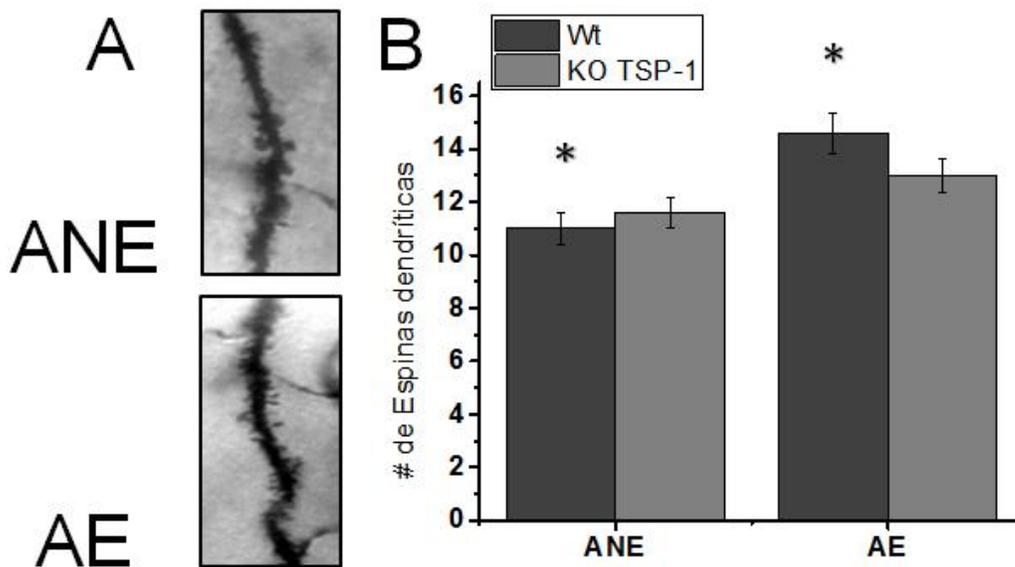


Figura 19. Los AE no incrementan las espinas dendríticas en ratones KO TSP-1. **A)** Se muestran segmentos dendríticos de neuronas hipocampales de ratones KO TSP-1 bajo condiciones de ANE y AE. **B)** La gráfica muestra la cuantificación de espinas dendríticas de ratones Wt y KO TSP-1, sometidos a ANE y AE con una diferencia significativa en ratones Wt. Las barras representan el promedio \pm error estándar.

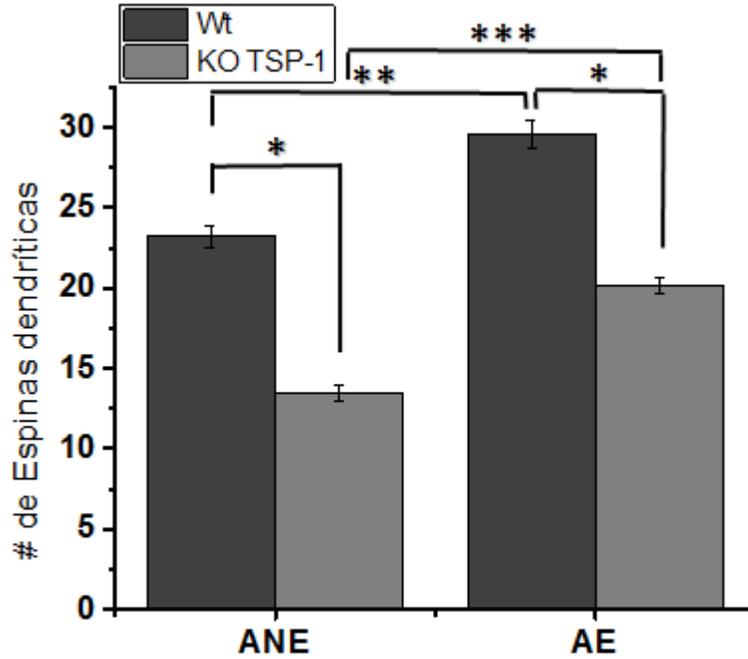


Figura 20. Los AE incrementan el número de espinas en las partes terminales de la dendrita en ratones KO TSP-1. La gráfica muestra el número de espinas obtenido a lo largo de 50 μm a partir del punto terminal. Los datos representan el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$.

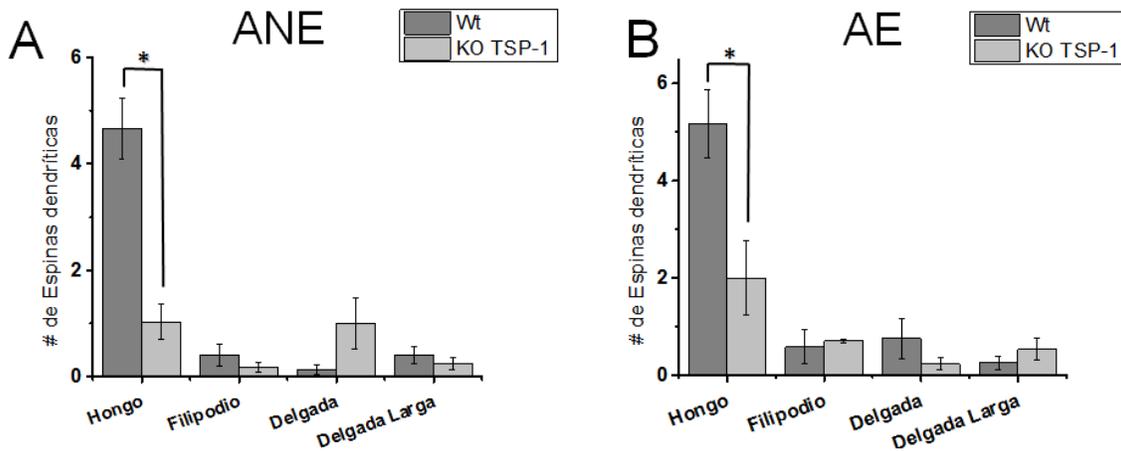


Figura 21. Los AE producen cambios en la morfología de las espinas dendríticas. A) Morfología de espinas en ratones Wt y KO TSP-1 bajo ANE y AE (B). Los datos representan el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

Existen diversas evidencias que demuestran que los AE pueden producir cambios en la morfología neuronal (Faherty et al. 2003; Bindu et al., 2007; Bose et al., 2010; Hutchinson et al., 2012; Hirase y Shinohara, 2014); particularmente se han reportado incrementos en la longitud y complejidad de las dendritas (Sutherland et al., 2010; Hirase y Shinohara, 2014). Nuestros resultados muestran que los ratones Wt sometidos a AE no presentan cambios en el número de ramificaciones pero sí se observa un decremento significativo en la longitud de las dendritas hipocampales (Figura 10, 11). La ausencia de cambios en las ramificaciones de las dendritas en animales sometidos a AE ha sido reportada en la corteza frontal de ratas (Globus et al., 1973; Kolb et al., 2003, 2008). De esta manera, los AE podrían tener un efecto sobre la morfología neuronal en regiones específicas del cerebro (Faherty et al., 2003; Kolb et al., 2003; Gelfo et al., 2009).

En este trabajo se reportó una disminución significativa en la longitud de las ramificaciones dendríticas de las neuronas del hipocampo en los ratones expuestos a AE, particularmente en las regiones secundarias y terciarias de las neuronas (Figura 11). Las dendritas son estructuras que muestran un remodelamiento dinámico (McAllister 2000; Kanamori et al., 2015; Stuart y Spruston, 2015), algunas dendritas muestran una poda a la distancia mientras que otras se pueden alargar, contraer o ramificar (Coleman y Riesen, 1968; Mason, et al., 1997; McAllister, 2000). Este remodelamiento dendrítico no solo ocurre durante el desarrollo neuronal, sino también en dendritas maduras bajo condiciones fisiológicas y patológicas, lo que sugiere su contribución en la plasticidad neuronal (Kulkarni y Firestein, 2012; Kanamori et al., 2015). Por ejemplo, durante el desarrollo del bulbo olfatorio hay una eliminación selectiva de los racimos dendríticos y una contracción dendrítica que permite un refinamiento de los circuitos neuronales (Malun y Brunjes, 1996). Las ramificaciones dendríticas pueden reducir su longitud en respuesta a estímulos externos e internos para formar sinapsis (Cline, 2001; Dailey y Smith, 1996; Niell et al., 2004). Además la reducción del largo y complejidad de las dendritas en neuronas hipocampales ha

sido reportada en asociación con el envejecimiento, hibernación, estrés y modelos de Diabetes Mellitus tipo I (Lolova, 1989; Watanabe et al., 1992; Magariños y McEwen, 2000; Magariños et al., 2006; Beauquis et al., 2010; Hutchinson et al., 2012; Silva-Gomez et al., 2013). Aunque los mecanismos de este proceso no se conocen completamente, la activación de los receptores tipo AMPA y de tipo metabotrópico de glutamato podrían estar implicados en la reducción de la longitud de las dendritas (Sirzen-Zelenskoya et al., 2006; Gugger y Kapfhammer, 2010). La activación de este tipo de receptores se reportó en roedores expuestos a AE (Gagne et al., 1998; Naka et al., 2005; Nichols et al., 2007). La disminución en la longitud de las dendritas que se observó en el presente estudio podría estar asociada a la activación de los receptores glutamatérgicos, metabotrópicos y de tipo AMPA.

El incremento en la complejidad de las dendritas implica en parte, el remodelamiento dendrítico (McAllister, 2000; Auriat et al., 2010; Nagy y Aubert, 2015; Xiao et al., 2015). En este trabajo se analizó la complejidad de las dendritas cuantificando el número de intersecciones que presentaban (Binley et al., 2014). Nuestros resultados mostraron que los AE incrementan el número de intersecciones en las dendritas terciarias y secundarias, principalmente en sus porciones apicales, sugiriendo arborizaciones más complejas después del estímulo (Figura 12). El incremento en las intersecciones podría ayudar a las neuronas a mejorar su capacidad para recibir, integrar y codificar información de los patrones complejos como los que se encuentran en los AE (Tronel et al., 2010); tal vez para dar cabida a nuevas sinapsis, estabilizar las sinapsis existentes y/o contrarrestar la sobreexcitabilidad inminente, que de otro modo sería tóxico para la célula (Tronel et al., 2010). Por otro lado, diversos trabajos han demostrado que las regiones hipocampales responden de manera diferencial a un mismo estímulo (Chevalyere y Siegelbaum, 2010; Caruana et al., 2012), estas diferencias podría estar asociadas a la propia anatomía neuronal y los receptores particulares que se expresan en cada región (Kohara et al., 2014; Lein et al., 2004, 2005). La actividad diferencial de cada una de las regiones hipocampales podría estimular conexiones neuronales con diferente grado de complejidad neuronal (Kohara et al., 2014; Lein

et al., 2004, 2005; Simons et al., 2009; Thomson et al., 2008; Zhao et al., 2007). Un análisis de tipo Sholl para las subregiones hipocampales nos permitiría conocer si el hipocampo responde con diferentes grados complejidad cuando se tienen diferentes estímulos de manera simultánea como sería el caso de los AE.

Diversos trabajos han demostrado que bajo condiciones de enriquecimiento la densidad de espinas dendríticas se puede incrementar de manera diferencial en las diversas áreas del cerebro (Faherty et al., 2003; Kolb et al., 2003; Bose et al., 2010; Sutherland et al., 2010; Hirase y Shinohara, 2014). En el presente trabajo se evaluó si los AE: 1) producían cambios en la densidad de las espinas dendríticas en neuronas hipocampales, principalmente en sus dendritas apicales y 2) si existían diferencias en la densidad de espinas en cada una de las subregiones del hipocampo. Nuestros resultados mostraron que los AE producen un incremento en la densidad de espinas dendríticas (Figura 13) y que este aumento se encuentra principalmente en la región CA2/CA3 del hipocampo y de manera parcial en la región CA1 (Figura 14). De manera interesante se observó una disminución de la densidad de espinas dendríticas en el GD (Figura 14). El incremento en las espinas dendríticas en las regiones CA2/CA3, podría estar asociado a los diferentes estímulos que recibieron los ratones por los AE, por ejemplo, la región CA1 puede activarse durante procesos de localización espacial, producido por los cambios de objetos durante el proceso experimental (Moser et al., 1994; 1997; Bindu et al., 2007; Lushnikova et al., 2009; Hirase y Shinohara, 2014). Por su parte se sugiere que la región hipocampal CA2 no responde a los mecanismos de plasticidad cerebral como lo hacen CA1 y CA3 (Zhao et al., 2007; Simons et al., 2009; Kohara et al., 2014; Dudek et al., 2016); a pesar de que se encuentra involucrada en los procesos de memoria social (Hitti y Siegelbaum, 2014; Stevenson y Caldwell, 2014). Los cambios observados en CA2 podrían estar involucrados con el componente social producido por los propios AE (Nithianantharajah y Hannan, 2006). Un análisis más profundo sobre los cambios en CA2 inducidos por cada uno de los componentes del enriquecimiento ambiental tendrían que ser evaluados. Por otro lado, los AE producen incremento en los potenciales postsinápticos excitatorios en la región CA2/CA3 (Foster y Dumas,

2001), así como en la LTP (Malik et al., 2012) y Depresión a Largo Plazo (LTD) (Artola et al., 2006). Los cambios en la transmisión sináptica producidos por el enriquecimiento ambiental podrían estar vinculados con el incremento en el número de sinapsis y espinas dendríticas (Duffy et al., 2001; Huang et al., 2006; Jung y Herms, 2012; Koleske, 2013). Bajo condiciones donde no hay enriquecimiento la densidad de espinas entre las regiones CA1, CA2/CA3 y GD son similares, como ha sido reportado en otros trabajos (Smith y Holahan, 2014). En nuestro estudio se observó que los AE producen una disminución significativa en el número de espinas en el GD, contrario a lo previamente reportado (Redila y Christie 2006). La actividad del GD ha sido observada cuando los roedores son sometidos a tareas de reconocimiento espacial (Tashiro et al., 2007), y bajo ejercicio voluntario (Redila y Christie, 2006; Pereira et al., 2007; Gregoire et al., 2014), condiciones que se pueden presentar en los AE. La discrepancia entre nuestro estudio y los reportes previos podría deberse a los modelos animales utilizados y a la subregión estudiada dentro del GD (Gallitano et al., 2016). Un análisis entre la subregión supra piramidal o infra piramidal del GD podría determinar si los AE producen un aumento en el número de espinas en el GD.

Con el fin de determinar si los cambios observados en la morfología neuronal producida por lo AE eran dependientes de TSP-1, se cuantificaron los niveles de TSP-1 en el hipocampo de ratones sometidos a AE (Figura 13, 14). Los resultados mostraron que los AE incrementaron los niveles de TSP-1 en CA2/CA3 y GD, esto se encuentra asociado con el aumento en el número de espinas en CA2/CA3 pero no en GD, en donde observamos una disminución significativa en la densidad de las espinas dendríticas. La TSP-1 está involucrada en el crecimiento de neuritas (Osterhout et al., 1992), arborización dendrítica (O'shea et al., 1991), sinaptogénesis (Christopherson et al., 2005; Hughes et al., 2010; Xu et al., 2010; Risher y Eroglu, 2012), espinogénesis (Garcia et al., 2010) y plasticidad sináptica (Cáceres et al., 2007; Risher y Eroglu, 2012). La TSP-1 acelera la formación de sinapsis y espinas dendríticas en neuronas hipocámpales (Xu et al., 2010; García et al., 2010). Las sinapsis que se forman por TSP-1 tienen una ultraestructura presináptica y postsináptica normales (Christopherson et al., 2005; Barres, 2008).

La formación de espinas y sinapsis dependientes de TSP-1 podría deberse a la activación de algunas vías de señalización dirigidas al citoesqueleto como la familia de cinasas Src, fosfoinosítido 3-kinasa (PI3-K), Rac-1 o ERK 1/2, p38 MAPK (Stevens, 2008). Por otro lado, la generación de nuevas neuronas hipocampales continúa en etapas postnatales, especialmente en el GD (Kuhn et al., 1996). La neurogénesis hipocampal es promovida por la actividad física en los AE (Kempermann et al., 1998; van Praag et al., 2000, Garthe et al., 2015). Algunos trabajos han demostrado que la TSP-1 participa en los procesos de proliferación y diferenciación de células progenitoras neuronales; adicionalmente, los ratones KO TSP-1 presentan fallas en la neurogénesis (Lu y Kipnis, 2010). En nuestro modelo los AE podrían estimular la neurogénesis en el DG, sin embargo, las neuronas podrían mantenerse en un estado inmaduro, condición en la que se presenta una disminución en el número de espinas (Rahimi y Claiborne, 2007). Experimentos adicionales tendrían que realizarse para determinar si el incremento de TSP-1 en el GD que encontramos en el presente estudio podría estar asociado con la neurogénesis.

Con el fin de corroborar si la TSP-1 juega un papel determinante en el remodelamiento dendrítico y en la formación de las espinas dendríticas en las neuronas hipocampales, se evaluó el efecto de AE en ratones Wt y KO TSP-1. Los resultados mostraron que la ausencia de TSP-1 modifica notablemente la morfología de las células nerviosas presentando neuronas con menos ramificaciones, mayor longitud y menor complejidad (Figura 15, 16, 17). Sin embargo, los AE no revirtieron estos cambios, lo que sugiere que la TSP-1 es necesaria en estos eventos de plasticidad cerebral. Como mencionamos anteriormente, la TSP-1 estimula el crecimiento de neuritas (Osterhout et al., 1992) y la arborización dendrítica (O'shea et al., 1991) en cultivos de células nerviosas. *In vivo* la falta de TSP-1 en los ratones podría activar un mecanismo adaptativo o compensatorio para responder a los estímulos tanto de los ANE como AE, y ante la ausencia de ramificaciones dendríticas, las neuronas incrementarían la longitud de estas estructuras con el fin de cubrir el déficit de ramificaciones dendríticas (Perry y Maffei, 1988; McAllister, 2000). Sin embargo, esto no es

suficiente ya que no permite incrementar la complejidad neuronal (Figura 17), lo que indica que la TSP-1 es necesaria para que la plasticidad neuronal ocurra en el hipocampo.

Los AE pueden causar cambios en la morfología y densidad de las espinas dendríticas (Alvarez y Sabatini, 2007). En este estudio se demostró que existe una relación entre la formación de espinas dendríticas y los niveles de TSP-1 en ratones Wt sometidos a los AE. Mientras que en los ratones KO TSP-1 los AE no producen un incremento significativo en la densidad de espinas en las dendritas primarias (Figura 19); cercano a los puntos terminales de la dendrita, se pudo observar un aumento en la densidad de espinas, aunque este incremento, nunca fue superior al número de espinas encontrado en ratones WT en ANE (Figura 20), sugiriendo que la TSP-1 tiene un papel importante pero no determinante en la formación de espinas dendríticas. La presencia de factores de crecimiento como el NFG, GDNF y BDNF podrían compensar la ausencia de TSP-1 y estimular la formación de espinas dendríticas en condiciones de enriquecimiento (Nithianantharajah y Hanna, 2006). Adicionalmente, la TSP-2, TSP-3 y TSP-4 podrían tener una participación en la espinogénesis y sinaptogénesis (Eroglu et al., 2009; Risher y Eroglu, 2012). El incremento de espinas en los puntos terminales de la dendrita es una característica común en muchos tipos neuronales (Marín-Padilla, 1967; Elston y DeFelipe, 2002; Beltran-Campos et al., 2015). La diferencia en la densidad espinas a lo largo de la dendrita podría estar asociada con sus propias funciones, particularmente con el amortiguamiento de calcio, evitando la toxicidad neuronal (Holthoff et al., 2002) y a una mejora en la integración de los circuitos sinápticos (Grienberger et al., 2015); de forma que el incremento de espinas en los ratones KO TSP-1 podría ser un mecanismo adaptativo para generar circuitos sinápticos funcionales ante una estimulación constante como son los AE.

Finalmente, la clasificación sobre la morfología de las espinas demostró que los ratones Wt y ratones KO TPS-1 presentan espinas tipo hongo, filipodio, delgada y delgada larga. La morfología de las espinas cambia después de que los ratones

son sometidos a AE (Figura 21). Para el caso de los ratones KO TSP-1 en AE producen un aumento aparente de las espinas tipo filipodio y delgada, disminución de las espinas delgadas largas y de la forma de hongo. Mientras que en los ratones Wt se observó predominio de las espinas en forma de hongo. La importancia de las espinas delgadas y en forma de hongo radica en su funcionamiento. Las espinas delgadas se relacionan con procesos de aprendizaje y las espinas tipo hongo con procesos de memoria (Bourne y Harris, 2007). Bajo nuestras condiciones es probable que el incremento de espinas delgadas este asociado a un aumento de espinas inmaduras o filipoideas (Ziv y Smith, 1996; Dailey y Smith, 1996; Fiala et al., 1998; Yuste y Bonhoeffer, 2001). Las espinas delgadas podrían ser un indicador de un proceso de aprendizaje (Bourne y Harris, 2007; García-López et al., 2007), Experimentos que permitan conocer la capacidad de los ratones KO TSP-1 para resolver paradigmas de memoria y aprendizaje, antes y después de haber sido sometidos a condiciones de enriquecimiento, ayudarían a esclarecer si la disminución observada en las espinas con forma de hongo podría tener relación con algún defecto en la memoria y el aprendizaje de estos ratones. En resumen, los datos obtenidos en la presente tesis sugieren que la TSP-1 puede tener un papel importante en los mecanismos de plasticidad neuronal.

CONCLUSIONES

- 1) Los ratones Wt sometidos a los Ambientes Enriquecidos muestran modificaciones en la morfología neuronal como son:
 - Disminución en la longitud de las arborizaciones dendríticas, principalmente en las porciones secundarias y terciarias de las neuronas.
 - Incremento en la complejidad de sus arborizaciones.
 - Incremento en la densidad de espinas dendríticas.
- 2) Existe una relación en los niveles de TSP-1 del hipocampo y el incremento en el número de espinas dendríticas en las regiones CA2/CA3.
- 3) Los niveles de TSP-1 en DG se encuentra asociado a un decremento en el número de espinas dendríticas.
- 4) La ausencia de TSP-1 en los ratones produce cambios en la morfología neuronal como son:
 - Disminución en la arborización dendrítica
 - Incremento en la longitud de las ramificaciones dendríticas
 - Menor complejidad de las arborizaciones dendríticas
 - Disminución en la densidad de espinas dendríticas en las regiones distales de las neuronas
- 5) Los AE no revirtieron los cambios observados en la morfología neuronal.
- 6) Los resultados en su conjunto sugieren que la TSP-1 tiene un papel importante en los mecanismos de plasticidad neuronal dependientes de la experiencia.

Investigaciones futuras podrían dirigirse a analizar la función de la TSP-1 en relación con procesos de aprendizaje y memoria así como conocer la contribución específica de la TSP-1 en los mecanismos de plasticidad cerebral.

REFERENCIAS

- Adams, J. C. (2001). "Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 25-51.
- Adams, J. C. and J. Lawler (2004). "The thrombospondins." Int J Biochem Cell Biol **36**(6): 961-968.
- Adams, J. C. and J. Lawler (2011). "The thrombospondins." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(10): a009712.
- Adams, J. C. and R. P. Tucker (2000). "The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development." Dev Dyn **218**(2): 280-299.
- Ahmed, O. J. and M. R. Mehta (2009). "The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory." Trends Neurosci **32**(6): 329-338.
- Alexander, G. M., S. Farris, J. R. Pirone, C. Zheng, L. L. Colgin and S. M. Dudek (2016). "Social and novel contexts modify hippocampal CA2 representations of space." Nat Commun **7**: 10300.
- Alvarez, V. A. and B. L. Sabatini (2007). "Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines." Annu Rev Neurosci **30**: 79-97.
- Amaral, D. G., H. E. Scharfman and P. Lavenex (2007). "The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)." Prog Brain Res **163**: 3-22.
- Anomal, R., E. de Villiers-Sidani, M. M. Merzenich and R. Panizzutti (2013). "Manipulation of BDNF signaling modifies the experience-dependent plasticity induced by pure tone exposure during the critical period in the primary auditory cortex." PLoS One **8**(5): e64208.
- Arellano, J. I., R. Benavides-Piccione, J. Defelipe and R. Yuste (2007). "Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies." Front Neurosci **1**(1): 131-143.
- Arendash, G. W., M. F. Garcia, D. A. Costa, J. R. Cracchiolo, I. M. Wefes and H. Potter (2004). "Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition." Neuroreport **15**(11): 1751-1754.

Artola, A., J. C. von Frijtag, P. C. Fermont, W. H. Gispen, L. H. Schrama, A. Kamal and B. M. Spruijt (2006). "Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment." Eur J Neurosci **23**(1): 261-272.

Asch, A. S., L. L. Leung, J. Shapiro and R. L. Nachman (1986). "Human brain glial cells synthesize thrombospondin." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(9): 2904-2908.

Auriat, A. M., S. Wowk and F. Colbourne (2010). "Rehabilitation after intracerebral hemorrhage in rats improves recovery with enhanced dendritic complexity but no effect on cell proliferation." Behav Brain Res **214**(1): 42-47.

Avila-Costa, M. R., T. I. Fortoul, G. Niño-Cabrera, L. Colin-Barenque, P. Bizarro-Nevares, A. L. Gutierrez-Valdez, J. L. Ordonez-Librado, V. Rodriguez-Lara, P. Mussali-Galante, P. Diaz-Bech and V. Anaya-Martinez (2006). "Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V(2)O(5)) promote memory deterioration." Neurotoxicology **27**(6): 1007-1012.

Ballesteros-Yanez, I., R. Benavides-Piccione, G. N. Elston, R. Yuste and J. DeFelipe (2006). "Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex." Neuroscience **138**(2): 403-409.

Barres, B. A. (2008). "The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease." Neuron **60**(3): 430-440.

Bartlett, W. P. and G. A. Banker (1984). "An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships." J Neurosci **4**(8): 1954-1965.

Beauquis, J., P. Roig, A. F. De Nicola and F. Saravia (2010). "Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice." PLoS One **5**(11): e13993.

Beltran-Campos, V., A. Diaz-Ruiz, E. Padilla-Gomez, H. Aguilar Zavala, C. Rios and S. Diaz Cintra (2015). "Effect of tibolone on dendritic spine density in the rat hippocampus." Neurologia **30**(7): 401-406.

Bergstrom, S. E., M. Uzunel, T. Talme, E. Bergdahl and K. G. Sundqvist (2015). "Antigen-induced regulation of T-cell motility, interaction with antigen-presenting

cells and activation through endogenous thrombospondin-1 and its receptors." Immunology **144**(4): 687-703.

Bindu, B., P. A. Alladi, B. M. Mansooralikhan, B. N. Srikumar, T. R. Raju and B. M. Kutty (2007). "Short-term exposure to an enriched environment enhances dendritic branching but not brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of rats with ventral subicular lesions." Neuroscience **144**(2): 412-423.

Binley, K. E., W. S. Ng, J. R. Tribble, B. Song and J. E. Morgan (2014). "Sholl analysis: a quantitative comparison of semi-automated methods." J Neurosci Methods **225**: 65-70.

Birch, A. M., N. B. McGarry and A. M. Kelly (2013). "Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner." Hippocampus **23**(6): 437-450.

Blair, P. and R. Flaumenhaft (2009). "Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates." Blood Rev **23**(4): 177-189.

Bornstein, P. (2009). "Thrombospondins function as regulators of angiogenesis." J Cell Commun Signal **3**(3-4): 189-200.

Bose, M., P. Munoz-Llancao, S. Roychowdhury, J. A. Nichols, V. Jakkamsetti, B. Porter, R. Byrapureddy, H. Salgado, M. P. Kilgard, F. Aboitiz, A. Dagnino-Subiabre and M. Atzori (2010). "Effect of the environment on the dendritic morphology of the rat auditory cortex." Synapse **64**(2): 97-110.

Bourne, J. and K. M. Harris (2007). "Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?" Curr Opin Neurobiol **17**(3): 381-386.

Buchs, P. A. and D. Muller (1996). "Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 8040-8045.

Caceres, M., C. Suwyn, M. Maddox, J. W. Thomas and T. M. Preuss (2007). "Increased cortical expression of two synaptogenic thrombospondins in human brain evolution." Cereb Cortex **17**(10): 2312-2321.

Carlson, C. B., J. Lawler and D. F. Mosher (2008). "Structures of thrombospondins." Cell Mol Life Sci **65**(5): 672-686.

Caruana, D. A., G. M. Alexander and S. M. Dudek (2012). "New insights into the regulation of synaptic plasticity from an unexpected place: hippocampal area CA2." Learn Mem **19**(9): 391-400.

Cline, H. T. (2001). "Dendritic arbor development and synaptogenesis." Curr Opin Neurobiol **11**(1): 118-126.

Clipperton-Allen, A. E., J. C. Ingraio, L. Ruggiero, L. Batista, J. Ovari, J. Hammermueller, J. N. Armstrong, D. Bienzle, E. Choleris and P. V. Turner (2015). "Long-Term Provision of Environmental Resources Alters Behavior but not Physiology or Neuroanatomy of Male and Female BALB/c and C57BL/6 Mice." J Am Assoc Lab Anim Sci **54**(6): 718-730.

Coleman, P. D. and A. H. Riesen (1968). "Environmental effects on cortical dendritic fields. I. Rearing in the dark." J Anat **102**(Pt 3): 363-374.

Cornelisse, L. N., R. A. van Elburg, R. M. Meredith, R. Yuste and H. D. Mansvelder (2007). "High speed two-photon imaging of calcium dynamics in dendritic spines: consequences for spine calcium kinetics and buffer capacity." PLoS One **2**(10): e1073.

Crawford, D. C., X. Jiang, A. Taylor and S. Mennerick (2012). "Astrocyte-derived thrombospondins mediate the development of hippocampal presynaptic plasticity in vitro." J Neurosci **32**(38): 13100-13110.

Cui, Z., C. R. Gerfen and W. S. Young, 3rd (2013). "Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus." J Comp Neurol **521**(8): 1844-1866.

Chamak, B., A. Dobbertin and M. Mallat (1995). "Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain." Neuroscience **69**(1): 177-187.

Chen, H., M. E. Herndon and J. Lawler (2000). "The cell biology of thrombospondin-1." Matrix Biol **19**(7): 597-614.

Chen, Y., Z. Liang, E. Fei, Y. Chen, X. Zhou, W. Fang, W. Y. Fu, A. K. Fu and N. Y. Ip (2015). "Axin Regulates Dendritic Spine Morphogenesis through Cdc42-Dependent Signaling." PLoS One **10**(7): e0133115.

Chevalleyre, V. and S. A. Siegelbaum (2010). "Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop." Neuron **66**(4): 560-572.

Christopherson, K. S., E. M. Ullian, C. C. Stokes, C. E. MULLOWNEY, J. W. Hell, A. Agah, J. Lawler, D. F. Mosher, P. Bornstein and B. A. Barres (2005). "Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis." Cell **120**(3): 421-433.

Chu, Y. Y., C. Y. Ko, W. J. Wang, S. M. Wang, P. W. Gean, Y. M. Kuo and J. M. Wang (2015). "Astrocytic CCAAT/Enhancer Binding Protein delta Regulates Neuronal Viability and Spatial Learning Ability via miR-135a." Mol Neurobiol.

Dailey, M. E. and S. J. Smith (1996). "The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices." J Neurosci **16**(9): 2983-2994.

Darmopil, S., Z. Petanjek, A. H. Mohammed and N. Bogdanovic (2009). "Environmental enrichment alters dentate granule cell morphology in oldest-old rat." J Cell Mol Med **13**(8B): 1845-1856.

Daroles, L. and I. Caille (2013). "Dendritic spines and local protein synthesis contribute to Down and fragile X syndromes." Med Sci (Paris) **29**(1): 17-19.

De Roo, M., P. Klauser, P. M. Garcia, L. Poglia and D. Muller (2008). "Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes." Prog Brain Res **169**: 199-207.

DeFelipe, J. (2006). "Brain plasticity and mental processes: Cajal again." Nat Rev Neurosci **7**(10): 811-817.

DeFreitas, M. F., C. K. Yoshida, W. A. Frazier, D. L. Mendrick, R. M. Kypta and L. F. Reichardt (1995). "Identification of integrin alpha 3 beta 1 as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth." Neuron **15**(2): 333-343.

Diamond, M. C., D. Krech and M. R. Rosenzweig (1964). "The Effects of an Enriched Environment on the Histology of the Rat Cerebral Cortex." J Comp Neurol **123**: 111-120.

Dudek, S. M., G. M. Alexander and S. Farris (2016). "Rediscovering area CA2: unique properties and functions." Nat Rev Neurosci **17**(2): 89-102.

Duffy, S. N., K. J. Craddock, T. Abel and P. V. Nguyen (2001). "Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory." Learn Mem **8**(1): 26-34.

Ebrahimi, S. and S. Okabe (2014). "Structural dynamics of dendritic spines: molecular composition, geometry and functional regulation." Biochim Biophys Acta **1838**(10): 2391-2398.

Eckert, M. J. and W. C. Abraham (2013). "Effects of environmental enrichment exposure on synaptic transmission and plasticity in the hippocampus." Curr Top Behav Neurosci **15**: 165-187.

Elston, G. N. and J. DeFelipe (2002). "Spine distribution in cortical pyramidal cells: a common organizational principle across species." Prog Brain Res **136**: 109-133.

Eroglu, C. (2009). "The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function." J Cell Commun Signal **3**(3-4): 167-176.

Eroglu, C., N. J. Allen, M. W. Susman, N. A. O'Rourke, C. Y. Park, E. Ozkan, C. Chakraborty, S. B. Mulinyawe, D. S. Annis, A. D. Huberman, E. M. Green, J. Lawler, R. Dolmetsch, K. C. Garcia, S. J. Smith, Z. D. Luo, A. Rosenthal, D. F. Mosher and B. A. Barres (2009). "Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis." Cell **139**(2): 380-392.

Faherty, C. J., D. Kerley and R. J. Smeyne (2003). "A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment." Brain Res Dev Brain Res **141**(1-2): 55-61.

Fiala, J. C., B. Allwardt and K. M. Harris (2002). "Dendritic spines do not split during hippocampal LTP or maturation." Nat Neurosci **5**(4): 297-298.

Fiala, J. C., M. Feinberg, V. Popov and K. M. Harris (1998). "Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1." J Neurosci **18**(21): 8900-8911.

Fiala, J. C., J. Spacek and K. M. Harris (2002). "Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?" Brain Res Brain Res Rev **39**(1): 29-54.

Flores, G., J. C. Morales-Medina and A. Diaz (2015). "Neuronal and brain morphological changes in animal models of schizophrenia." Behav Brain Res **301**: 190-203.

Foster, T. C. and T. C. Dumas (2001). "Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience." J Neurophysiol **85**(4): 1377-1383.

Fukazawa, Y., Y. Saitoh, F. Ozawa, Y. Ohta, K. Mizuno and K. Inokuchi (2003). "Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo." Neuron **38**(3): 447-460.

Gagne, J., S. Gelinas, M. G. Martinoli, T. C. Foster, M. Ohayon, R. F. Thompson, M. Baudry and G. Massicotte (1998). "AMPA receptor properties in adult rat hippocampus following environmental enrichment." Brain Res **799**(1): 16-25.

Gallitano, A. L., E. Satvat, M. Gil and D. F. Marrone (2016). "Distinct dendritic morphology across the blades of the rodent dentate gyrus." Synapse.

Garcia-Lopez, P., V. Garcia-Marin and M. Freire (2007). "The discovery of dendritic spines by Cajal in 1888 and its relevance in the present neuroscience." Prog Neurobiol **83**(2): 110-130.

Garcia, O., M. Torres, P. Helguera, P. Coskun and J. Busciglio (2010). "A role for thrombospondin-1 deficits in astrocyte-mediated spine and synaptic pathology in Down's syndrome." PLoS One **5**(12): e14200.

Garthe, A., I. Roeder and G. Kempermann (2015). "Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis." Hippocampus.

Gelfo, F., P. De Bartolo, A. Giovine, L. Petrosini and M. G. Leggio (2009). "Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat." Neurobiol Learn Mem **91**(4): 353-365.

Gensel, J. C., D. L. Schonberg, J. K. Alexander, D. M. McTigue and P. G. Popovich (2010). "Semi-automated Sholl analysis for quantifying changes in growth and differentiation of neurons and glia." J Neurosci Methods **190**(1): 71-79.

Giancotti, F. G. (1997). "Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 691-700.

Girard, F., S. Eichenberger and M. R. Celio (2014). "Thrombospondin 4 deficiency in mouse impairs neuronal migration in the early postnatal and adult brain." Mol Cell Neurosci **61**: 176-186.

Globus, A., M. R. Rosenzweig, E. L. Bennett and M. C. Diamond (1973). "Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex." J Comp Physiol Psychol **82**(2): 175-181.

Gregoire, C. A., D. Bonenfant, A. Le Nguyen, A. Aumont and K. J. Fernandes (2014). "Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis." PLoS One **9**(1): e86237.

Grienberger, C., X. Chen and A. Konnerth (2015). "Dendritic function in vivo." Trends Neurosci **38**(1): 45-54.

Gu, L., S. Kleiber, L. Schmid, F. Nebeling, M. Chamoun, J. Steffen, J. Wagner and M. Fuhrmann (2014). "Long-term in vivo imaging of dendritic spines in the hippocampus reveals structural plasticity." J Neurosci **34**(42): 13948-13953.

Gugger, O. S. and J. P. Kapfhammer (2010). "Reduced size of the dendritic tree does not protect Purkinje cells from excitotoxic death." J Neurosci Res **88**(4): 774-783.

Hill, T. C. and K. Zito (2013). "LTP-induced long-term stabilization of individual nascent dendritic spines." J Neurosci **33**(2): 678-686.

Hirase, H. and Y. Shinohara (2014). "Transformation of cortical and hippocampal neural circuit by environmental enrichment." Neuroscience **280**: 282-298.

Hitti, F. L. and S. A. Siegelbaum (2014). "The hippocampal CA2 region is essential for social memory." Nature **508**(7494): 88-92.

Holthoff, K., D. Tsay and R. Yuste (2002). "Calcium dynamics of spines depend on their dendritic location." Neuron **33**(3): 425-437.

Hotulainen, P. and C. C. Hoogenraad (2010). "Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function." J Cell Biol **189**(4): 619-629.

Huang, Z. H., H. J. Wu, C. C. Yeh, Y. C. Chou and Y. C. Chang (2006). "Dendritic spines of developing rat cortical neurons in culture." Chin J Physiol **49**(1): 39-45.

Hughes, E. G., S. B. Elmariah and R. J. Balice-Gordon (2010). "Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis." Mol Cell Neurosci **43**(1): 136-145.

Hutchinson, K. M., K. J. McLaughlin, R. L. Wright, J. Bryce Ortiz, D. P. Anouti, A. Mika, D. M. Diamond and C. D. Conrad (2012). "Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity." Neurobiol Learn Mem **97**(2): 250-260.

Isenberg, J. S., G. Martin-Manso, J. B. Maxhimer and D. D. Roberts (2009). "Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies." Nat Rev Cancer **9**(3): 182-194.

Jadavji, N. M., B. Kolb and G. A. Metz (2006). "Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats." Neuroscience **140**(4): 1127-1138.

Jedlicka, P., A. Vlachos, S. W. Schwarzacher and T. Deller (2008). "A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning." Behav Brain Res **192**(1): 12-19.

Johansson, B. B. and P. V. Belichenko (2002). "Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain." J Cereb Blood Flow Metab **22**(1): 89-96.

Jones, E. V., Y. Bernardinelli, Y. C. Tse, S. Chierzi, T. P. Wong and K. K. Murai (2011). "Astrocytes control glutamate receptor levels at developing synapses through SPARC-beta-integrin interactions." J Neurosci **31**(11): 4154-4165.

Jung, C. K. and J. Herms (2012). "Role of APP for dendritic spine formation and stability." Exp Brain Res **217**(3-4): 463-470.

Kanamori, T., K. Togashi, H. Koizumi and K. Emoto (2015). "Dendritic Remodeling: Lessons from Invertebrate Model Systems." Int Rev Cell Mol Biol **318**: 1-25.

Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1998). "Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus." J Neurosci **18**(9): 3206-3212.

Knott, G. and A. Holtmaat (2008). "Dendritic spine plasticity--current understanding from in vivo studies." Brain Res Rev **58**(2): 282-289.

Kesner, R. P., J. O. Taylor, J. Hoge and F. Andy (2015). "Role of the dentate gyrus in mediating object-spatial configuration recognition." Neurobiol Learn Mem **118**: 42-48.

Kohara, K., M. Pignatelli, A. J. Rivest, H. Y. Jung, T. Kitamura, J. Suh, D. Frank, K. Kajikawa, N. Mise, Y. Obata, I. R. Wickersham and S. Tonegawa (2014). "Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits." Nat Neurosci **17**(2): 269-279.

Kolb, B., G. Gorny, A. H. Soderpalm and T. E. Robinson (2003). "Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens." Synapse **48**(3): 149-153.

Kolb, B., J. Cioe and W. Comeau (2008). "Contrasting effects of motor and visual spatial learning tasks on dendritic arborization and spine density in rats." Neurobiol Learn Mem **90**(2): 295-300.

Koleske, A. J. (2013). "Molecular mechanisms of dendrite stability." Nat Rev Neurosci **14**(8): 536-550.

Krech, D., M. R. Rosenzweig and E. L. Bennett (1960). "Effects of environmental complexity and training on brain chemistry." J Comp Physiol Psychol **53**: 509-519.

Kuhn, H. G., H. Dickinson-Anson and F. H. Gage (1996). "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation." J Neurosci **16**(6): 2027-2033.

Kulkarni, V. A. and B. L. Firestein (2012). "The dendritic tree and brain disorders." Mol Cell Neurosci **50**(1): 10-20.

Kutzing, M. K., C. G. Langhammer, V. Luo, H. Lakdawala and B. L. Firestein (2010). "Automated Sholl analysis of digitized neuronal morphology at multiple scales." J Vis Exp(45).

Lambert, T. J., S. M. Fernandez and K. M. Frick (2005). "Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice." Neurobiol Learn Mem **83**(3): 206-216.

Lamprecht, R. and J. LeDoux (2004). "Structural plasticity and memory." Nat Rev Neurosci **5**(1): 45-54.

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

Langhammer, C. G., M. L. Previtara, E. S. Sweet, S. S. Sran, M. Chen and B. L. Firestein (2010). "Automated Sholl analysis of digitized neuronal morphology at multiple scales: Whole cell Sholl analysis versus Sholl analysis of arbor subregions." Cytometry A **77**(12): 1160-1168.

Lawler, J. (2000). "The functions of thrombospondin-1 and-2." Curr Opin Cell Biol **12**(5): 634-640.

Lawler, P. R. and J. Lawler (2012). "Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(5): a006627.

Lein, E. S., X. Zhao and F. H. Gage (2004). "Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput in situ hybridization." J Neurosci **24**(15): 3879-3889.

Lein, E. S., E. M. Callaway, T. D. Albright and F. H. Gage (2005). "Redefining the boundaries of the hippocampal CA2 subfield in the mouse using gene expression and 3-dimensional reconstruction." J Comp Neurol **485**(1): 1-10.

Levine, N. D., D. J. Rademacher, T. J. Collier, J. A. O'Malley, A. P. Kells, W. San Sebastian, K. S. Bankiewicz and K. Steece-Collier (2013). "Advances in thin tissue Golgi-Cox impregnation: fast, reliable methods for multi-assay analyses in rodent and non-human primate brain." J Neurosci Methods **213**(2): 214-227.

Liau, J., S. Hoang, M. Choi, C. Eroglu, M. Choi, G. H. Sun, M. Percy, B. Wildman-Tobriner, T. Bliss, R. G. Guzman, B. A. Barres and G. K. Steinberg (2008). "Thrombospondins 1 and 2 are necessary for synaptic plasticity and functional recovery after stroke." J Cereb Blood Flow Metab **28**(10): 1722-1732.

Lisman, J. (2003). "Actin's actions in LTP-induced synapse growth." Neuron **38**(3): 361-362.

Lolova, I. (1989). "Dendritic changes in the hippocampus of aged rats." Acta Morphol Hung **37**(1-2): 3-10.

Lopez-Dee, Z., K. Pidcock and L. S. Gutierrez (2011). "Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation." Mediators Inflamm **2011**: 296069.

Lu, Z. and J. Kipnis (2010). "Thrombospondin-1 a key astrocyte-derived neurogenic factor." FASEB J **24**(6): 1925-1934.

Luebke, J., H. Barbas and A. Peters (2010). "Effects of normal aging on prefrontal area 46 in the rhesus monkey." Brain Res Rev **62**(2): 212-232.

Lushnikova, I., G. Skibo, D. Muller and I. Nikonenko (2009). "Synaptic potentiation induces increased glial coverage of excitatory synapses in CA1 hippocampus." Hippocampus **19**(8): 753-762.

Magarinos, A. M. and B. S. McEwen (2000). "Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11056-11061.

Magarinos, A. M., B. S. McEwen, M. Saboureau and P. Pevet (2006). "Rapid and reversible changes in intrahippocampal connectivity during the course of hibernation in European hamsters." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(49): 18775-18780.

Maiti, P., J. Manna, G. Ilavazhagan, J. Rossignol and G. L. Dunbar (2015). "Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases." Neurosci Biobehav Rev **59**: 208-237.

Malik, R. and S. Chattarji (2012). "Enhanced intrinsic excitability and EPSP-spike coupling accompany enriched environment-induced facilitation of LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons." J Neurophysiol **107**(5): 1366-1378.

Malun, D. and P. C. Brunjes (1996). "Development of olfactory glomeruli: temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats." J Comp Neurol **368**(1): 1-16.

Mancuso, J. J., Y. Chen, X. Li, Z. Xue and S. T. Wong (2013). "Methods of dendritic spine detection: from Golgi to high-resolution optical imaging." Neuroscience **251**: 129-140.

Marin-Padilla, M. (1967). "Number and distribution of the apical dendritic spines of the layer V pyramidal cells in man." J Comp Neurol **131**(4): 475-490.

Mason, C. A., M. E. Morrison, M. S. Ward, Q. Zhang and D. H. Baird (1997). "Axon-target interactions in the developing cerebellum." Perspect Dev Neurobiol **5**(1): 69-82.

Matsuzaki, M., N. Honkura, G. C. Ellis-Davies and H. Kasai (2004). "Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines." Nature **429**(6993): 761-766.

McAllister, A. K. (2000). "Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth." Cereb Cortex **10**(10): 963-973.

McAllister, A. K., L. C. Katz and D. C. Lo (1996). "Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity." Neuron **17**(6): 1057-1064.

Melendez-Ferro, M., E. Perez-Costas and R. C. Roberts (2009). "A new use for long-term frozen brain tissue: golgi impregnation." J Neurosci Methods **176**(2): 72-77.

Mendus, D., S. Sundaresan, N. Grillet, F. Wangsawihardja, R. Leu, U. Muller, S. M. Jones and M. Mustapha (2014). "Thrombospondins 1 and 2 are important for afferent synapse formation and function in the inner ear." Eur J Neurosci **39**(8): 1256-1267.

Mendus, D., E. K. Rankin-Gee, M. Mustapha and B. E. Porter (2015). "Increased sensitivity to kindling in mice lacking TSP1." Neuroscience **305**: 302-308.

Mongiat, L. A. and A. F. Schinder (2011). "Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network." Eur J Neurosci **33**(6): 1055-1061.

Mora, F., G. Segovia and A. del Arco (2007). "Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain." Brain Res Rev **55**(1): 78-88.

Moser, M. B., M. Trommald and P. Andersen (1994). "An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12673-12675.

Moser, M. B., M. Trommald, T. Egeland and P. Andersen (1997). "Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells." J Comp Neurol **380**(3): 373-381.

Murphy-Ullrich, J. E. and R. V. Iozzo (2012). "Thrombospondins in physiology and disease: new tricks for old dogs." Matrix Biol **31**(3): 152-154.

Nagerl, U. V., N. Eberhorn, S. B. Cambridge and T. Bonhoeffer (2004). "Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons." Neuron **44**(5): 759-767.

Nagy, P. M. and I. Aubert (2015). "Overexpression of the vesicular acetylcholine transporter enhances dendritic complexity of adult-born hippocampal neurons and improves acquisition of spatial memory during aging." Neurobiol Aging **36**(5): 1881-1889.

Naka, F., N. Narita, N. Okado and M. Narita (2005). "Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment." Brain Dev **27**(4): 275-278.

Nichols, J. A., V. P. Jakkamsetti, H. Salgado, L. Dinh, M. P. Kilgard and M. Atzori (2007). "Environmental enrichment selectively increases glutamatergic responses in layer II/III of the auditory cortex of the rat." Neuroscience **145**(3): 832-840.

Niell, C. M., M. P. Meyer and S. J. Smith (2004). "In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor." Nat Neurosci **7**(3): 254-260.

Nimchinsky, E. A., B. L. Sabatini and K. Svoboda (2002). "Structure and function of dendritic spines." Annu Rev Physiol **64**: 313-353.

Nithianantharajah, J. and A. J. Hannan (2006). "Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system." Nat Rev Neurosci **7**(9): 697-709.

Nithianantharajah, J., H. Levis and M. Murphy (2004). "Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins." Neurobiol Learn Mem **81**(3): 200-210.

Numakawa, T., T. Ishimoto, S. Suzuki, Y. Numakawa, N. Adachi, T. Matsumoto, D. Yokomaku, H. Koshimizu, K. E. Fujimori, R. Hashimoto, T. Taguchi and H. Kunugi (2004). "Neuronal roles of the integrin-associated protein (IAP/CD47) in developing cortical neurons." J Biol Chem **279**(41): 43245-43253.

Ohnishi, H., Y. Kaneko, H. Okazawa, M. Miyashita, R. Sato, A. Hayashi, K. Tada, S. Nagata, M. Takahashi and T. Matozaki (2005). "Differential localization of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 and CD47

and its molecular mechanisms in cultured hippocampal neurons." J Neurosci **25**(10): 2702-2711.

Okamoto, K., T. Nagai, A. Miyawaki and Y. Hayashi (2004). "Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity." Nat Neurosci **7**(10): 1104-1112.

O'Shea, K. S., L. H. Liu and V. M. Dixit (1991). "Thrombospondin and a 140 kd fragment promote adhesion and neurite outgrowth from embryonic central and peripheral neurons and from PC12 cells." Neuron **7**(2): 231-237.

Orlowski, D., B. Elfving, H. K. Muller, G. Wegener and C. R. Bjarkam (2012). "Wistar rats subjected to chronic restraint stress display increased hippocampal spine density paralleled by increased expression levels of synaptic scaffolding proteins." Stress **15**(5): 514-523.

Osterhout, D. J., W. A. Frazier and D. Higgins (1992). "Thrombospondin promotes process outgrowth in neurons from the peripheral and central nervous systems." Dev Biol **150**(2): 256-265.

Parent, J. M. (2007). "Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus." Prog Brain Res **163**: 529-540.

Penzes, P. and C. Remmers (2012). "Kalirin signaling: implications for synaptic pathology." Mol Neurobiol **45**(1): 109-118.

Peña, Y. (2007). El enriquecimiento ambiental en ratas: efectos diferenciales en función del sexo. Doctorado Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.

Perry, V. H. and L. Maffei (1988). "Dendritic competition: competition for what?" Brain Res **469**(1-2): 195-208.

Pereira, A. C., D. E. Huddleston, A. M. Brickman, A. A. Sosunov, R. Hen, G. M. McKhann, R. Sloan, F. H. Gage, T. R. Brown and S. A. Small (2007). "An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5638-5643.

Phillips, M. and L. Pozzo-Miller (2015). "Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders." Neurosci Lett **601**: 30-40.

Popov, V. I., H. A. Davies, V. V. Rogachevsky, I. V. Patrushev, M. L. Errington, P. L. Gabbott, T. V. Bliss and M. G. Stewart (2004). "Remodelling of synaptic

morphology but unchanged synaptic density during late phase long-term potentiation (LTP): a serial section electron micrograph study in the dentate gyrus in the anaesthetised rat." Neuroscience **128**(2): 251-262.

Rahimi, O. and B. J. Claiborne (2007). "Morphological development and maturation of granule neuron dendrites in the rat dentate gyrus." Prog Brain Res **163**: 167-181.

Rama Rao, K. V., K. M. Curtis, J. T. Johnstone and M. D. Norenberg (2013). "Amyloid-beta inhibits thrombospondin 1 release from cultured astrocytes: effects on synaptic protein expression." J Neuropathol Exp Neurol **72**(8): 735-744.

Rampon, C., C. H. Jiang, H. Dong, Y. P. Tang, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, J. Z. Tsien and Y. Hu (2000). "Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12880-12884.

Redila, V. A. and B. R. Christie (2006). "Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus." Neuroscience **137**(4): 1299-1307.

Restivo, L., F. Ferrari, E. Passino, C. Sgobio, J. Bock, B. A. Oostra, C. Bagni and M. Ammassari-Teule (2005). "Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11557-11562.

Risher, W. C. and C. Eroglu (2012). "Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system." Matrix Biol **31**(3): 170-177.

Risher, W. C., S. Patel, I. H. Kim, A. Uezu, S. Bhagat, D. K. Wilton, L. J. Pilaz, J. Singh Alvarado, O. Y. Calhan, D. L. Silver, B. Stevens, N. Calakos, S. H. Soderling and C. Eroglu (2014). "Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines." Elife **3**.

Rosenzweig, M. R., D. Krech, E. L. Bennett and M. C. Diamond (1962). "Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension." J Comp Physiol Psychol **55**: 429-437.

Sampedro-Piquero, P., A. Begega and J. L. Arias (2014). "Increase of glucocorticoid receptor expression after environmental enrichment: relations to

spatial memory, exploration and anxiety-related behaviors." Physiol Behav **129**: 118-129.

Shim, K. S. and G. Lubec (2002). "Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome." Neurosci Lett **324**(3): 209-212.

Shirao, T. and C. Gonzalez-Billault (2013). "Actin filaments and microtubules in dendritic spines." J Neurochem **126**(2): 155-164.

Silva-Gomez, A. B., Y. Aguilar-Salgado, D. O. Reyes-Hernandez and G. Flores (2013). "Dexamethasone induces different morphological changes in the dorsal and ventral hippocampus of rats." J Chem Neuroanat **47**: 71-78.

Simons, S. B., Y. Escobedo, R. Yasuda and S. M. Dudek (2009). "Regional differences in hippocampal calcium handling provide a cellular mechanism for limiting plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 14080-14084.

Sirzen-Zelenskaya, A., J. Zeyse and J. P. Kapfhammer (2006). "Activation of class I metabotropic glutamate receptors limits dendritic growth of Purkinje cells in organotypic slice cultures." Eur J Neurosci **24**(11): 2978-2986.

Smith, C. A. and M. R. Holahan (2014). "Reduced hippocampal dendritic spine density and BDNF expression following acute postnatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in male Long Evans rats." PLoS One **9**(10): e109522.

Son, S. M., D. W. Nam, M. Y. Cha, K. H. Kim, J. Byun, H. Ryu and I. Mook-Jung (2015). "Thrombospondin-1 prevents amyloid beta-mediated synaptic pathology in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **36**(12): 3214-3227.

Stenina-Adognravi, O. (2014). "Invoking the power of thrombospondins: regulation of thrombospondins expression." Matrix Biol **37**: 69-82.

Stevens, B. (2008). "Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits." Neurosignals **16**(4): 278-288.

Stevenson, E. L. and H. K. Caldwell (2014). "Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice." Eur J Neurosci **40**(9): 3294-3301.

Stevenson, E. L. and H. K. Caldwell (2014). "Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice." Eur J Neurosci **40**(9): 3294-3301.

Stuart, G. J. and N. Spruston (2015). "Dendritic integration: 60 years of progress." Nat Neurosci **18**(12): 1713-1721.

Sultan, F. (2013). "Dissection of different Areas from Mouse Hippocampus." Bio-protocol **3**(21).

Sutherland, R., R. Gibb and B. Kolb (2010). "The hippocampus makes a significant contribution to experience-dependent neocortical plasticity." Behav Brain Res **214**(1): 121-124.

Sztainberg, Y. and A. Chen (2010). "An environmental enrichment model for mice." Nat Protoc **5**(9): 1535-1539.

Tashiro, A., H. Makino and F. H. Gage (2007). "Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage." J Neurosci **27**(12): 3252-3259.

Thompson, C. L., S. D. Pathak, A. Jeromin, L. L. Ng, C. R. MacPherson, M. T. Mortrud, A. Cusick, Z. L. Riley, S. M. Sunkin, A. Bernard, R. B. Puchalski, F. H. Gage, A. R. Jones, V. B. Bajic, M. J. Hawrylycz and E. S. Lein (2008). "Genomic anatomy of the hippocampus." Neuron **60**(6): 1010-1021.

Torasdotter, M., M. Metsis, B. G. Henriksson, B. Winblad and A. H. Mohammed (1998). "Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus." Behav Brain Res **93**(1-2): 83-90.

Tronel, S., A. Fabre, V. Charrier, S. H. Oliet, F. H. Gage and D. N. Aebischer (2010). "Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(17): 7963-7968.

Tucker, R. P., C. Hagios, R. Chiquet-Ehrismann, J. Lawler, R. J. Hall and C. A. Erickson (1999). "Thrombospondin-1 and neural crest cell migration." Dev Dyn **214**(4): 312-322.

Tyzack, G.E., Sitnikov, S., Barson, D., Adams-Carr, K. L., Lau, N. K., Kwok, J. C., Zhao, C., Franklin, R. J., Karadottir, R. T., Fawcett, J. W., Lakatos, A. (2014). "Astrocyte response to motor neuron injury promotes structural synaptic plasticity via STAT3-regulated TSP-1 expression". Nat Commun **5**.

van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage (2000). "Neural consequences of environmental enrichment." Nat Rev Neurosci **1**(3): 191-198.

Watanabe, Y., E. Gould and B. S. McEwen (1992). "Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons." Brain Res **588**(2): 341-345.

Xiao, F., J. M. Xu and X. H. Jiang (2015). "CX3 chemokine receptor 1 deficiency leads to reduced dendritic complexity and delayed maturation of newborn neurons in the adult mouse hippocampus." Neural Regen Res **10**(5): 772-777.

Xu, J., N. Xiao and J. Xia (2010). "Thrombospondin 1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons through neuropilin 1." Nat Neurosci **13**(1): 22-24.

Xu, X., E. C. Miller and L. Pozzo-Miller (2014). "Dendritic spine dysgenesis in Rett syndrome." Front Neuroanat **8**: 97.

Yamazaki, H., N. Kojima, K. Kato, E. Hirose, T. Iwasaki, T. Mizui, H. Takahashi, K. Hanamura, R. T. Roppongi, N. Koibuchi, Y. Sekino, N. Mori and T. Shirao (2014). "Spikar, a novel drebrin-binding protein, regulates the formation and stabilization of dendritic spines." J Neurochem **128**(4): 507-522.

Yang, G., F. Pan and W. B. Gan (2009). "Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories." Nature **462**(7275): 920-924.

Yu, K., J. Ge, J. B. Summers, F. Li, X. Liu, P. Ma, J. Kaminski and J. Zhuang (2008). "TSP-1 secreted by bone marrow stromal cells contributes to retinal ganglion cell neurite outgrowth and survival." PLoS One **3**(6): e2470.

Yuste, R., A. Majewska and K. Holthoff (2000). "From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines." Nat Neurosci **3**(7): 653-659.

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

Yuste, R. (2011). "Dendritic spines and distributed circuits." Neuron **71**(5): 772-781.

Yuste, R. (2013). "Electrical compartmentalization in dendritic spines." Annu Rev Neurosci **36**: 429-449.

Yuste, R. and R. Urban (2004). "Dendritic spines and linear networks." J Physiol Paris **98**(4-6): 479-486.

Zhao, M., Y. S. Choi, K. Obrietan and S. M. Dudek (2007). "Synaptic plasticity (and the lack thereof) in hippocampal CA2 neurons." J Neurosci **27**(44): 12025-12032.

Zhou, F. Q. and C. S. Cohan (2004). "How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets." J Neurobiol **58**(1): 84-91.

Zigman, W. B. and I. T. Lott (2007). "Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **13**(3): 237-246.

Ziv, N. E. and S. J. Smith (1996). "Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation." Neuron **17**(1): 91-102.