



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto de la bulbectomía olfatoria neonatal en la locomoción, en el aprendizaje y en la morfología dendrítica de hipocampo dorsal y corteza entorrinal de rata hembra

Tesis que para obtener el título de
BIÓLOGA

PRESENTA
Paola Rojas Pérez

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Adriana Berenice Silva Gómez



Junio del 2017

ÍNDICE

GLOSARIO DE

BREVIATURAS.....	I
RESUMEN	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 SISTEMA OLFATIVO	1
1.2 BULBOS OLFATORIOS	1
1.3 CONEXIONES OLFATORIAS	2
1.4 CORTEZA ENTORRINAL.....	4
1.5 HIPOCAMPO	5
1.5.1 CIRCUITO TRISINAPTICO	8
1.6 BULBECTOMÍA OLFATORIA BILATERAL	9
1.6.1 BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL.....	10
1.7 PLASTICIDAD	11
1.7.1 LA PLASTICIDAD Y LA EDAD.....	12
1.7.2 ESTROGENOS Y LA PLASTICIDAD	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. HIPOTESIS	15
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 OBJETIVO GENERAL	15
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	15
5. MATERIAL Y METODOS.....	16
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	16
5.2 PROTOCOLO DE ABLACIÓN DE BULBOS OLFATORIOS EN NEONATOS	17
5.3 PRUEBAS CONDUCTUALES	18
5.3.1 PRUEBA DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN CAMPO CERRADO	18
5.3.2 PRUEBA DE LABERINTO ACUATICO DE MORRIS	19
5.4. MORFOLOGIA NEURONAL.....	21
5.4.1 TINCIÓN DEL GOLGI-COX	21
5.4.2 ANÁLISIS DE SHOLL.....	22
5.5. ANÁLISIS ESTADISTICO.....	23
6. RESULTADOS.....	24

6.1 MORFOLOGIA DE NEURONAS DE CORTEZA ENTORRINAL.....	24
6.1.2 DENSIDAD DE ESPINAS DENDRITICAS DE CE	26
6.2 MORFOLOGIA DE NEURONAS CA3.....	28
6.2.1 DENSIDAD DE ESPINAS DENDRITICA	30
6.3 MORFOLOGIA DE NEURONAS CA1.....	32
6.3.1 DENSIDAD DE ESPINAS DENDRITICAS.....	33
6.4 ACTIVIDAD LOCOMOTORA.....	35
6.5 LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS.....	37
6.6 TAMAÑO DE BULBOS OLFATORIOS.....	38
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIÓN	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza

BO: Bulbos olfatorios

CA1: Región CA1 del hipocampo

CA2: Región CA2 del hipocampo

CA3: Región CA3 del hipocampo

CE: Corteza Entorrinal

cm: Centímetro

CMPF: Corteza Media Prefrontal

COF: Corteza Orbitofrontal

CON: Grupo control

CPF: Corteza Prefrontal

CPir: Corteza Piriforme

DPN60: Día postnatal 60

GD: Giro Dentado

LTP: Potenciación a Largo Plazo

NAcc: Núcleo Accumbens

OBX: Grupo con bulbectomía olfatoria

OBXn: Bulbectomía Olfatoria Neonatal

SHAM: Grupo con cirugía simulada

µm: Micrómetro

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

RESUMEN

El sistema olfatorio es importante para muchas funciones tales como conductas sociales, reproductivas y maternas. La bulbectomía olfatoria es un modelo experimental que consiste en la remoción de los bulbos olfatorios y que provoca alteraciones de comportamiento, neuroquímicas y endocrinas semejantes a las observadas en pacientes deprimidos. Este procedimiento experimental ha sido realizado principalmente en individuos adultos. No obstante, la bulbectomía olfatoria en ratas neonatas ha permitido obtener información acerca de la gran capacidad de plasticidad que los individuos presentan para compensar un daño. Esta cirugía ha sido habitualmente realizada en ratas macho y es de interés para el presente estudio determinar los efectos de este procedimiento en ratas hembra, ya que las mujeres parecen ser más susceptibles a las enfermedades relacionadas con el estrés es importante incluir en los trabajos de investigación a organismos hembra.

Se utilizaron cuarenta y ocho ratas hembra Wistar de 7 días de edad, de los cuales a 16 ratas se les sometió a ablación de bulbos olfatorios mediante succión con previa anestesia por hipotermia, (grupo OBX). Otro grupo de animales (grupo SHAM, n=16) fue utilizado para realizar la cirugía sham de forma tal que se expusieron los bulbos sin ser removidos. Incluimos un grupo control (n=16) de ratas a las que no se les realizó ningún procedimiento quirúrgico (ratas intactas, CON). A los 60 días de edad un lote de ratas que contiene los 3 grupos experimentales (n=8 por grupo) fueron sometidas a las pruebas de conducta de actividad locomotora ante un ambiente nuevo en campo cerrado y memoria espacial (Laberinto Acuático de Morris). El segundo lote de animales (n=8 por grupo experimental) fue sacrificado para obtener el encéfalo, el cual se procesó mediante el método de Golgi-Cox para analizar la densidad de espinas dendríticas y la longitud dendrítica de las neuronas de corteza entorrinal y de hipocampo dorsal. A diferencia de lo observado previamente en ratas macho, la bulbectomía olfatoria neonatal en la rata hembra no causó alteraciones en la actividad locomotora y memoria. No se observaron cambios en la morfología dendrítica de neuronas de corteza entorrinal. En el hipocampo las neuronas CA1 no se observaron cambios. Únicamente en las neuronas CA3 mostraron una disminución en la densidad de espinas dendríticas por efecto de la

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

bulbectomia olfatoria. Estos datos sugieren que las ratas hembra expresan mecanismos de plasticidad neuronal que les permite compensar o recuperarse morfológicamente de un posible daño de manera eficiente por una lesión.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA OLFATIVO

El sentido del olfato juega un papel importante para los seres vivos porque les brinda información química del medio externo (Kandel *et al.*, 2013). El sistema olfatorio procesa la información a partir de reconocer la identidad, la concentración y la calidad de una amplia gama de estímulos químicos denominados sustancias odoríferas. Las sustancias odoríferas provocan eventos fisiológicos en el organismo tales como respuestas motoras viscerales al oler comida agradable, o náuseas y vómito cuando se detecta un olor aversivo. El olfato en los seres humanos es considerado un sistema sensorial poco agudo, en cambio, la capacidad olfatoria de otras especies como los roedores es muy superior (Purves *et al.*, 2007). En ratas, el sistema olfatorio es importante para muchas funciones tales como conductas sociales, reproductivas y maternas. El sistema olfativo aporta al organismo una enorme cantidad de información necesaria para la regulación neuroendocrina y para las respuestas emocionales durante eventos de agresión y reconocimiento de depredadores y presas (Fleming & Rosenblat, 1974).

1.2 BULBOS OLFATORIOS

La transducción y transmisión de la información sobre las sustancias odoríferas hacia el encéfalo ocurre en el epitelio olfatorio que incluye varios tipos neuronales, la primera de ellas es la neurona receptora olfatoria, célula bipolar, que transmite la información mediante un axón ubicado en la parte basal hacia el bulbo olfatorio (Purves *et al.*, 2007). Los bulbos olfatorios (BO) son extensiones bilaterales del telencéfalo rostral y son un sistema único y dinámico que conserva la capacidad de generar nuevas neuronas durante toda la vida (Altman, 1969; Bovetti *et al.*, 2011). En la rata adulta constituyen aproximadamente el 4% de la masa total del cerebro (Caín, 1974). El BO está organizado por múltiples capas neuronales, una de ellas es la capa glomerular que contiene glomérulos que son un conjunto de acumulaciones más o menos esféricas de neuropilo que reciben las proyecciones de las neuronas receptoras olfatorias y las proyecciones de las células mitrales y periglomerulares (Figura 1)

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

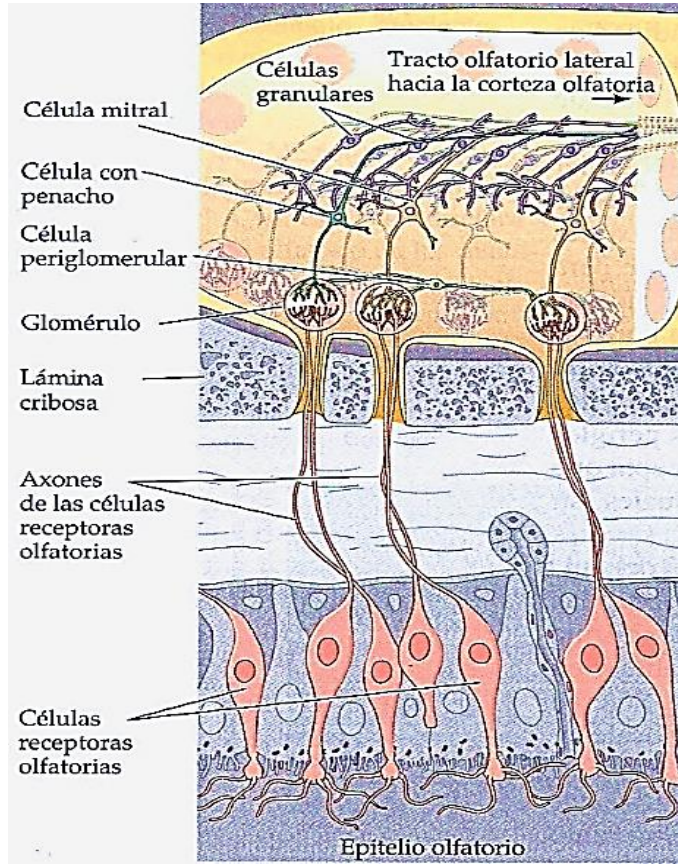


Figura 1. Esquema de los tipos celulares del epitelio olfatorio y bulbo olfatorio. Las células receptoras olfatorias envían la información odorífera hasta los glomérulos de los BO para iniciar una vía de señalización olfatoria que informe a la corteza del estímulo. Tomado de Purves *et al.*, 2007.

1.3 CONEXIONES OLFATORIAS

El sistema olfatorio es reconocido por el múltiple establecimiento de interacciones sinápticas entre el epitelio olfatorio, BO y la corteza olfatoria (Ho & Liu, 2001). La información que llega desde el epitelio olfatorio es enviada por distintas vías a diferentes estructuras cerebrales.

Los axones de las células mitrales forman un haz, el tracto olfatorio y mediante éste el bulbo olfatorio es conectado a diversas estructuras del sistema límbico, la corteza olfatoria primaria es la estructura diana principal. Desde las áreas olfatorias primarias y desde el tracto olfatorio, se dirigen proyecciones hacia otras estructuras para un proceso adicional de la información como el hipotálamo y al núcleo medial dorsal del tálamo,

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

desde el cual neuronas aferentes se proyectan a la corteza orbitofrontal (COF) (Franks *et al.*, 2015).

Existen relaciones recíprocas entre estas estructuras, así como con otras estructuras de orden superior (Doty, 2009) y desde estas regiones se establecen conexiones que integran información olfatoria con otras funciones neuronales (Ho & Liu, 2001). Heimer y Wilson (1975) mencionan que la información límbica y olfatoria converge en el estriado ventral y que este a su vez integra la información motora, además, procesos cognitivos tales como aprendizaje y memoria, pueden estar relacionados con el sistema olfatorio debido a la presencia del circuito olfatorio-entorrinal-hipocampal (Figura 2) (Shipley & Puche, 2004) .

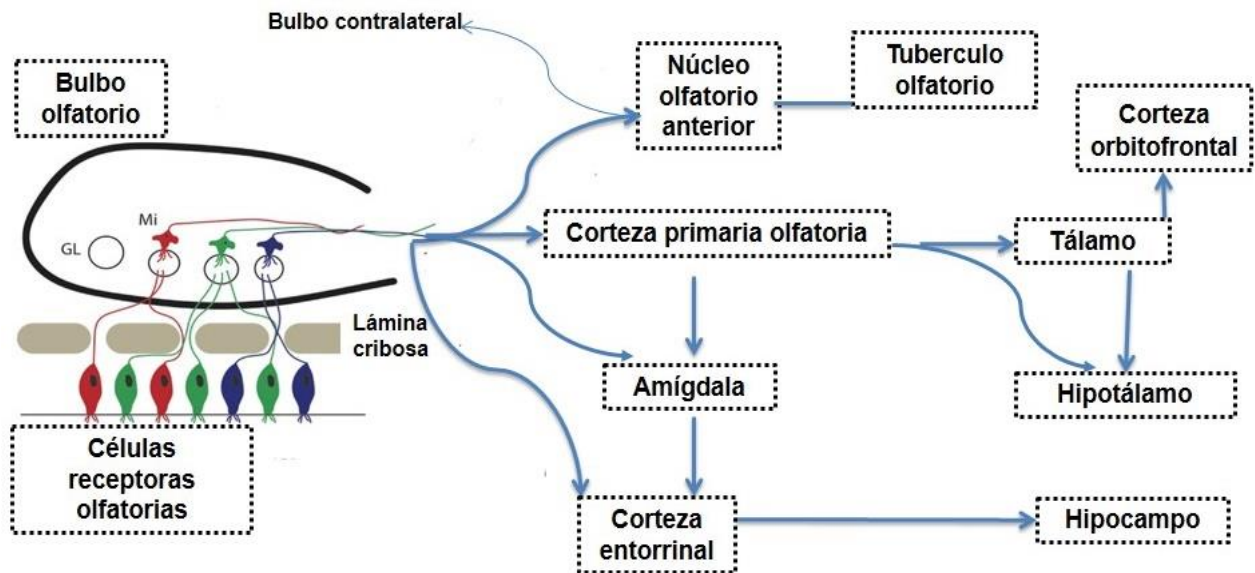


Figura 2. Proyecciones generales del sistema olfatorio. La información que llega a los glomérulos es enviada a varias estructuras de orden superior incluyendo el núcleo olfatorio anterior que está formado por células esparcidas a lo largo del tracto olfatorio (Vía de la comisura anterior). Otras de las áreas que recibe información del glomérulo es el tubérculo olfatorio y la amígdala específicamente al núcleo corticomediales algunas otras fibras alcanzan centros autónomos para las respuestas viscerales, como la salivación en respuesta a olores agradables o náuseas en respuesta a olores desagradables. Células mitrales (Mi), Glomérulo (GL) (Martin, 1989 ; Franks *et al.*, 2015).

1.4 CORTEZA ENTORRINAL

La corteza entorrinal (CE) es una estructura compuesta de seis capas convencionales que muestran varios tipos de células (Ramon & Cajal 1904; Schwartz & Coleman, 1981; Carboni *et al.*, 1990; Gernroth *et al.*, 1991; Amaral & Lavenex, 2007). La CE de la rata recibe entradas de una variedad de regiones corticales (Burwell & Amaral, 1998). Estas entradas corticales forman dos grupos: el primer grupo son las que terminan en las capas superficiales (I-III) en su mayoría, en estas capas se encuentran un gran número de neuronas de tipo piramidal seguidas de otros tipos neuronales que dan lugar a la vía perforante y alveolar que proyectan hacia la región CA1 del hipocampo y hacia el subículo. Estos axones de igual manera dan lugar a las colaterales que distribuyen principalmente a las capas I hasta la III. El segundo grupo son las que se distribuyen preferentemente a las capas profundas (IV-VI) (Amaral & Lavenex, 2007), que contienen una gran variedad de tipos de neuronas como piramidales, fusiformes y pequeñas células esféricas algunas de éstas células contribuyen a las proyecciones del giro dentado y del hipocampo. De tal manera que se completa un circuito cerrado de información en la formación hipocampal (Figura 3) (Chrobak & Buzsáki, 1994; Chrobak *et al.*, 2000).

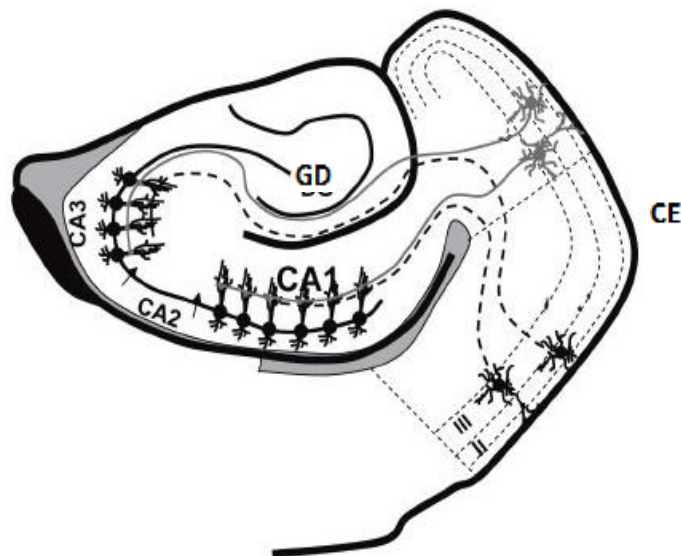


Figura 3. Esquema de las principales conexiones de la corteza entorrinal. Las neuronas de las capa II y III de la CE envían información hacia el giro dentado y las regiones CA3 y CA1 del hipocampo. Las interconexiones entre estas dos áreas forman un circuito cerrado de información. (Torrealba & Valdés 2008).

Además, estas conexiones son de gran importancia ya que continúan en el circuito trisináptico del hipocampo (Witter & Amaral, 1991) y cualquier daño de estas puede tener un profundo impacto en los procesos de memoria de los individuos (Gómez-Isla *et al.*, 1996). La CE, a su vez, tiene importantes conexiones bidireccionales con una variedad de regiones corticales multisensoriales incluyendo la corteza perirrinal y el hipocampo, la COF, la corteza cingulada, la corteza retrosplenial, la ínsula, y otras regiones temporales (Insausti & Amaral, 2008; Lavenex *et al.*, 2002,. Mohedano-Moriano *et al.*, 2007, 2008; Suzuki & Amaral, 1994; Van Hoesen & Pandya, 1975; Van Hoesen *et al.*, 1972). Una entrada sustancial a las capas superficiales de la CE se origina a partir de estructuras olfativas del telencéfalo, en particular desde el BO, el núcleo olfatorio anterior, y la corteza piriforme (CPir) (Haberly & Price, 1978; Kosel *et al.*, 1981). Por lo que esta organización anatómica sugiere que la CE juega un papel importante como una interfaz entre áreas de orden superior y áreas neocorticales sensoriales y varios campos de la formación del hipocampo (componente importante en el procesos de memoria) (Lavenex & Amaral, 2000).

1.5 HIPOCAMPO

El hipocampo, situado en la parte medial del lóbulo temporal constituye una estructura cerebral crucial en la memoria así como también esta relacionado con el estrés (Lambert *et al.*, 1998; Kim & Diamond, 2002). Su estructura se puede dividir en hipocampo dorsal y ventral (Figura 4A). El hipocampo dorsal ha sido relacionado con procesos de aprendizaje, memoria y otras funciones cognitivas, mientras que el hipocampo ventral se asocia con el sistema límbico y los procesos de estrés (Pothuizen *et al.*, 2004; Fanselow & Dong, 2010).

El hipocampo se delimita por una densa capa de células piramidales y el área dentada por una densa banda de células granulares o piramidales pequeñas (Issacson, 1982). El hipocampo presenta una organización laminar y se subdivide en CA1, CA2, CA3 (CA proviene del termino Cuerno de Ammón) (Figura 4B) en la cual se ubican más regiones

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

como el giro dentado (GD), el complejo subicular que incluye el subículo, presubículo, el parasubículo y la CE.

La región CA1 se caracteriza por la presencia de neuronas piramidales homogéneas con una o dos dendritas apicales y la longitud total de las neuronas CA1 es aproximadamente de 13.5 mm y el diámetro de su soma es de 15 µm. En general las células CA1 reciben entradas de información provenientes de la CPF, BO, núcleo accumbens (NAcc) amígdala e hipotálamo (Figura 4C).

La región CA2 está compuesta de somas grandes, ovoides y densamente empaquetados que forman el estrato piramidal denso estrecho, en un marcado contraste con la región CA1. La función de la región CA2 del hipocampo es poco conocida. No recibe entradas de las fibras musgosas del GD, no obstante es la única región del hipocampo que recibe entrada desde el hipotálamo posterior (Borhegyi y Leranth, 1997; Vertes & McKenna, 2000; Bartesaghi et al., 2006)

La región CA3 contiene células piramidales heterogéneas, pueden variar en tamaño de entre 8 hasta 18 mm (las más grandes) con somas que tienen un diámetro de hasta 30 µm. Presentan una alta interconectividad y excitabilidad que se genera cuando hay una entrada de información desde las células granulares del giro GD, CE e hipotálamo (Figura 3D). Todas estas distintas áreas están estratificadas, se reconoce el *stratum oriens* (s.o), el *stratum pyramidale* (s.p), el *stratum radiatum* (s.r.), el *stratum lacunosum moleculare* (s.l.m) y el *stratum lucidum* (exclusivo de CA3) (s.l) (Andersen et al., 2007).

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

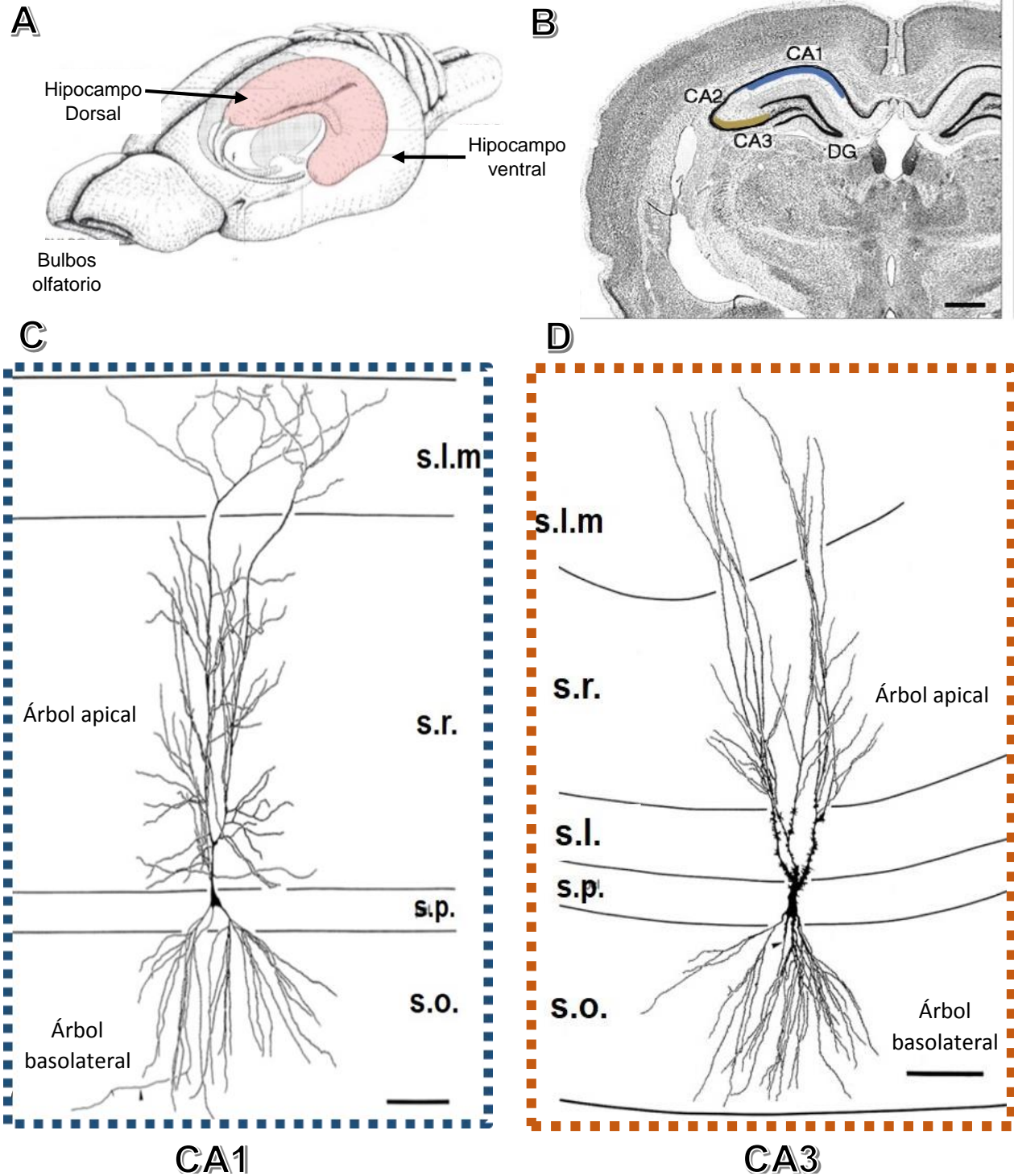


Figura 4. Hipocampo y neuronas CA1 y CA3. Se observa en A) la representación del hipocampo y su división de hipocampo dorsal e hipocampo ventral en el cerebro de rata. En la parte (B) se observa un corte coronal de hipocampo dorsal (barra 1 mm) marcando la ubicación de las regiones CA1 y las neuronas CA3. En la parte abajo es una imagen de reconstrucción de las neuronas piramidales CA1 (C) y CA3 (D) y los estratos en los que extienden sus árboles basolaterales y apicales, se reconoce el *stratum oriens* (s.o), el *stratum pyramidale* (s.p), el *stratum radiatum* (s.r.), el *stratum lacunosum moleculare* (s.l.m) y el *stratum lucidum* (exclusivo de CA3) (s.l). Barra 100 μ m (Tomado y modificado de Amaral & Lavenex, 2007).

1.5.1 CIRCUITO TRISINAPTICO

La formación hipocampal posee un circuito trisináptico excitador que tiene inicio en la vía perforante de la CE; estas proyecciones contactan con las células granulares del GD, en seguida envían sus axones (fibras musgosas) hacia las neuronas piramidales de la región CA3, y éstas a su vez envían sus axones hacia las neuronas piramidales de la región CA1 mediante las colaterales de Schaffer; por último éstas envían la información al subículo (Sub) (Andersen *et al.*, 2007).

La información procesada mediante este circuito trisináptico permite relacionar las diferentes aferencias sensoriales pertenecientes a diversos estímulos (por ejemplo, provenientes de BO) gracias a que las células piramidales del hipocampo tienen un alto grado de interconexión, se facilita las relaciones entre las diferentes entradas de información (Figura 5) (Zhang *et al.*, 2013).

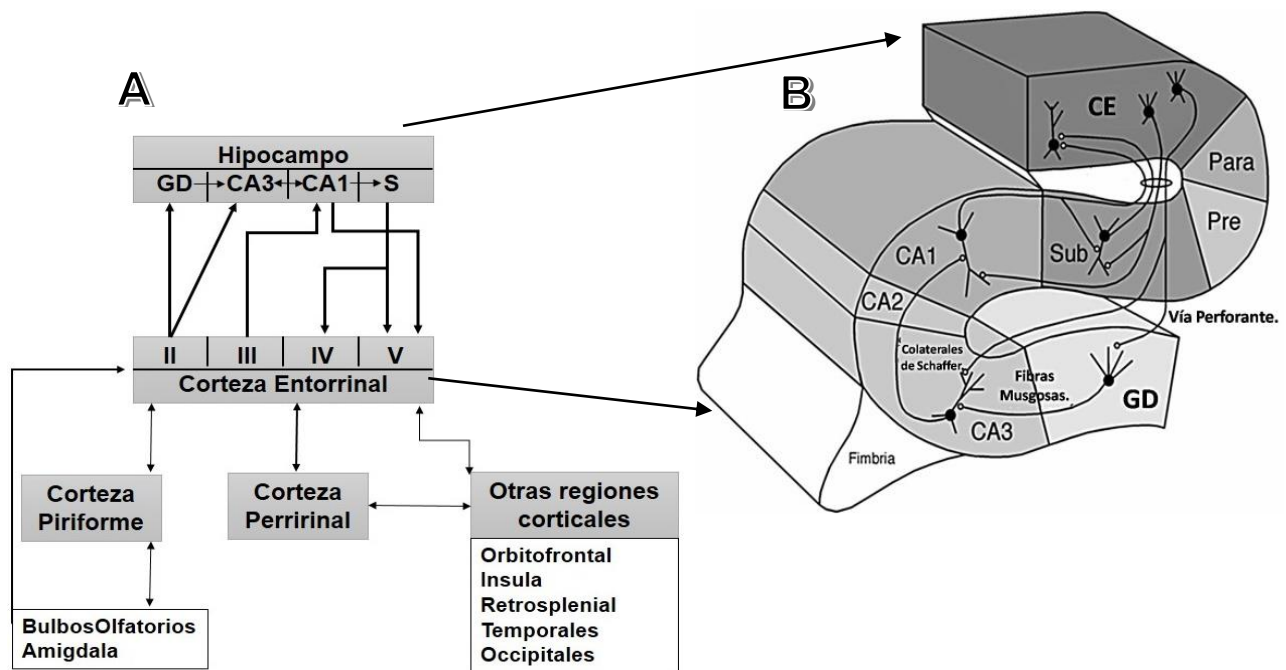


Figura 5. Esquema general de las aferencias y eferencias de la corteza entorrinal e el hipocampo. En (A) se observa un diagrama general de la comunicación entre la CE y el hipocampo y las conexiones directas e indirectas de los BO y otras regiones corticales de gran importancia. En (B) se muestra directamente las conexiones sinápticas y vías de la formación hipocampal, la primera sinapsis la de CE a GD, la segunda de GD a CA3, y la tercera va de CA3 a CA1 (Andersen *et al.*, 2007).

1.6 BULBECTOMÍA OLFATORIA BILATERAL

La bulbectomía olfatoria (OBX) es un procedimiento experimental que consiste en la remoción de los BO que se encuentran ubicados en la parte rostral del telencéfalo (Masini *et al.*, 2004). La OBX induce inicialmente muerte ipsilateral de neuronas olfatorias primarias y neuronas vomeronasales de la cavidad nasal y del órgano vomeronasal, respectivamente (Chehrehasa *et al.*, 2006).

La ablación bilateral de los BO en ratas adultas conduce a una variedad de cambios de comportamientos, neuroquímicos, endocrinos, e inmunológicos semejantes a los observados en sujetos deprimidos. Este modelo se basa en la hipótesis de que la eliminación de los BO, que son parte del sistema límbico, afecta a sus amplias redes neuronales eferentes y perturba la conexión y funcionamiento de todo el sistema límbico (Song & Leonard, 2005). El circuito límbico es esencial para regular los estados de ánimo, emociones; por lo tanto, la OBX induce comportamientos de tipo depresivo (Czeh *et al.*, 2015; Hendriksen *et al.*, 2015). La depresión se define como la alteración en los afectos, en el estado de ánimo o en los sentimientos (Sachar, 1985; Willner, 1990; Song & Leonard, 2005). El tratamiento antidepresivo crónico alivia muchos de los déficits de comportamiento siendo así un modelo experimental válido para el estudio de la depresión (Kelly *et al.*, 1997).

Entre los cambios que son evidentes en la depresión y el modelo de OBX, se incluye el aumento de la sensibilidad a ambientes estresantes (Hendriksen *et al.*, 2015; Song y Leonard, 2005; Zueger *et al.*, 2005) por ejemplo, el roedor muestra hiperactividad en la prueba de campo abierto o en un ambiente novedoso. Además expresan aumento en la irritabilidad (Song y Leonard, 2005) por lo que la rata muestra conducta muricida, agresión territorial y deterioro de aprendizaje y memoria (Holubova *et al.*, 2016). En este aspecto los roedores muestran déficits en la prueba de evitación pasiva y laberinto acuático de Morris (Nakagawasai *et al.* 2003; Morales-Medina *et al.* 2013a). También las ratas muestran una mayor vulnerabilidad a los factores de estrés, alteración en algunos niveles de neurotransmisores como la serotonina que pueden promover trastornos del sueño, ingesta de alimentos y cambios hormonales (Mc Ewen *et al.*, 1994; Song & Leonard 2005; Jaako *et al.*, 2006).

La OBX causa un incremento en la concentración de glucocorticoides lo cual reduce en gran medida la neurogénesis al nivel de GD (Kole, 2004). De igual forma la atrofia neuronal en el hipocampo, se ha relacionado a altos niveles de glucocorticoides, lo que provoca una reducción en la densidad dendrítica de neuronas piramidales CA1 y CA3 de hipocampo y neuronas granulosas del GD. Estos cambios en la morfología neuronal coincide con la disminución de la arborización neuronal en el hipocampo y otras regiones cerebrales observadas en los cerebros post-mortem de sujetos que sufrieron depresión (Cotter et al., 2005; Hercher et al., 2009).

1.6.1 BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL

La bulbectomia olfatoria neonatal (OBXn) consiste en la extracción de ambos BO en etapas tempranas del neurodesarrollo. Diferentes estudios han observado que la OBX unilateral realizada en el día postnatal 1 (DPN1) produce una limitada recuperación de la olfacción en adultos jóvenes (Hendrick et al., 1994), lo cual se relaciona con la capacidad del lóbulo frontal para desplazarse o crecer hacia adelante para llenar la cavidad vacante. Los resultados de la cirugía inician con la muerte de las neuronas sensoriales olfativas maduras, pero los axones de las neuronas recién diferenciadas se extienden y hacen contacto sináptico con células multipolares corticales (Graziadei et al., 1978, 1979), además también hay una penetración del nervio olfatorio y la migración de células de CPF. La penetración del nervio olfatorio solo ocurre cuando la OBX es desarrollada en neonatos ya que no se ha observado algo semejante después de la OBX en ratas adultas (Hendricks et al., 1994). Se muestra entonces que las consecuencias de la OBX entre rata adulta y la rata neonatal son diferentes.

Como se mencionó anteriormente, la OBX en rata adulta provoca trastornos relacionados con los síntomas de depresión, padecimiento que no solo afecta a los adultos, sino también comúnmente a niños y adolescentes (Bylun & Reed 2007). En la depresión infantil y adolescente los síntomas varían de acuerdo con la edad, ya que el cerebro juvenil y el adulto tanto en humanos como en otros organismos difieren en muchos aspectos tales como en la anatomía, la conducta, la respuesta al estrés y las lesiones cerebrales (Bylun & Reed 2007).

Por tanto, los modelos perinatales pueden brindar información importante; el periodo de gestación de la rata es de aproximadamente 22 días, en donde la neurogénesis cerebral comienza alrededor del día embrionario 11 y termina después del nacimiento, la migración celular continúa a través de la primera semana postnatal y la sinaptogénesis continúa a una tasa elevada hasta aproximadamente el día 25 postnatal. La primera semana postnatal de las ratas corresponde al tercer trimestre de gestación humano por lo que cualquier manipulación en la primera semana de vida a través de lesiones, tratamientos farmacológicos o estrés, altera el neurodesarrollo y produce disfunciones severas que son similares a los daños en los humanos adolescentes (Kolb, 2005). De tal manera que la propuesta de la OBXn como modelo animal se fundamenta en la hipótesis de que la ausencia de BO durante el neurodesarrollo temprano puede provocar condiciones que promuevan el desarrollo de un trastorno depresivo semejante al que se expresa en jóvenes humanos. No obstante, esto no es del alcance del presente proyecto.

1.7 PLASTICIDAD

La neuroplasticidad puede ser ampliamente definida como la capacidad del sistema nervioso para responder a estímulos intrínsecos y extrínsecos y hacer cambios a nivel estructural, funcional y en conexiones. Puede ser descrita en muchos niveles, desde el sistema molecular y celular hasta el conductual; puede ocurrir durante todo el desarrollo, en respuesta a estímulos ambientales, por ejemplo estrés y depresión, por lesiones o en apoyo al proceso de aprendizaje (Cramer *et al.*, 2011).

La plasticidad morfológica que ocurre naturalmente, es un proceso que puede ser provocado por la estimulación ambiental y que es observado y medido en múltiples niveles (Briones *et al.*, 2004; Holtmaat & Svoboda 2009; Muhammad *et al.*, 2013). En modelos animales los cambios en el hipocampo inducidos por el estrés están relacionados con la pérdida de espinas, la atrofia dendrítica, la pérdida de células glía y el deterioro de la neurogénesis en el hipocampo y la CPF (Pittenger & Duman 2008; D'Sa & Dumas 2002; Jay 2009). En consecuencia, el hipocampo, la CPF y estructuras relacionadas generan un deterioro no solamente estructural, sino también en la función (Reznikov *et al.*, 2009). En el caso de una lesión, varios trabajos de investigación sugieren

que las diferentes regiones del cerebro presentan distintas susceptibilidades dependiendo de su estado de madurez (YouRong *et al.*, 2016).

1.7.1 LA PLASTICIDAD Y LA EDAD

Las primeras experiencias de vida adversas representan uno de los principales factores de riesgo para desarrollar sensibilidad a los efectos del estrés o para desarrollar trastornos mentales como la depresión mayor. El período postnatal temprano se caracteriza por expresar una considerable plasticidad del sistema nervioso en desarrollo. Como tal, el medio ambiente postnatal temprano es crítico por su capacidad para influir en el comportamiento adulto (Ernst *et al.*, 2006). Como se mencionó anteriormente en los animales, el olfato proporciona información crítica sobre el medio ambiente y su privación completa en un periodo postnatal temprano puede provocar alteraciones en el desarrollo neuronal y la función del cerebro, lo que sugiere que existe un "período crítico" en el desarrollo del sistema olfativo (Brunjes, 1985; Semjidsuren, 2008).

Por otra parte los efectos de un daño o una lesión a una porción del cerebro varían con la edad exacta de la lesión. El daño puede ser provocado por una variedad amplia de manipulaciones que incluye la remoción de tejido por succión de áreas corticales, daño excitotóxico e hipoxia-isquemia. En general estas diferentes manipulaciones muestran un resultado consistente. Cuando el daño se produce en la primera semana de vida se presentan severas disfunciones mientras que si el daño se produce en la segunda semana de vida las alteraciones funcionales son menos severas. Las consecuencias conductuales entre estos dos momentos de daño (semana 1 y semana 2 de vida) están correlacionados con una respuesta anatómica diferente. Por ejemplo el daño en la segunda semana induce neurogénesis, gliogénesis e hipertrofia dendrítica mientras que el daño provocado en la primera semana tiene poco efecto en la neurogénesis y gliogénesis y mucho menos efecto en la atrofia dendrítica. Además diferentes efectos sobre la expresión de proteínas han sido reportados. En general un daño cerebral en la primera semana de vida provoca menos consecuencias pero lleva a la atrofia dendrítica (Kolb, 2005). El uso de modelos animales en etapa neonatal, pueden ayudar a

comprender como se llevan a cabo los mecanismos de plasticidad para entender las diferencias en la respuesta al estrés y la vulnerabilidad a los trastornos.

1.7.2 ESTROGENOS Y LA PLASTICIDAD

Existe un cúmulo de evidencia que menciona que los machos y las hembras difieren tanto en la estructura, como en la organización dendrítica de las neuronas neocorticales (Kolb & Stewart, 1991), la mayoría de estas diferencias dependen del sexo y en el sistema nervioso de los mamíferos se deben en gran medida a las hormonas gonadales (Juraska, 1991; Kolb *et al.*, 1998).

Los estrógenos tienen acciones importantes mucho más allá del sistema reproductivo, puesto que tienen la capacidad de inducir cierta plasticidad sináptica al regular factores neurotróficos y neuropeptidos (Brown *et al.*, 2009). En modelos *In vitro*, se ha demostrado que los estrógenos endógenos, como el 17 β -Estradiol protegen a las neuronas de lesiones neurotóxicas en modelos de la enfermedad de Alzheimer, de hipoxia, de estrés oxidativo del Parkinson, excitotoxicidad, y lesiones físicas (McCollum *et al.*, 2002). Estas acciones neuroprotectoras tienen gran alcance en múltiples regiones del cerebro, incluyendo la corteza cerebral, el hipocampo, el cuerpo estriado, el cerebro anterior basal, y el cerebelo.

En condiciones naturales los niveles fluctuantes de estradiol y progesterona producen cambios estructurales en una variedad de núcleos cerebrales que incluyen al núcleo hipotalámico ventromedial, al núcleo arcuato, al núcleo del septum lateral y también al hipocampo. Específicamente, la densidad de espinas dendríticas o la forma de las espinas en células tales como las neuronas piramidales CA1 del hipocampo es sensible a estas hormonas (Woolley & McEwen, 1993) mientras que la longitud dendrítica o el número de ramificaciones dendríticas no es afectada (Wolley & McEwen, 1994). De tal forma que un incremento en las sinapsis de espinas CA1 mejora la función en tareas dependientes del hipocampo (Wooley, 1998). Tales como la formación de memoria asociativa que está relacionada con un incremento en la densidad de espinas (Leuner, 2003)

2. JUSTIFICACIÓN

El sistema nervioso experimenta cambios estructurales y funcionales detonados por factores endógenos o exógenos. En las primeras etapas de vida, las experiencias adversas representan uno de los principales factores de riesgo en la sensibilidad a los efectos del estrés o al desarrollo de trastornos mentales como la depresión (Ernst *et al.*, 2006). No obstante se conoce poco acerca de los mecanismos que pueden alterar el desarrollo del sistema nervioso central en organismos del sexo femenino.

Se ha hecho énfasis en que ante una lesión cerebral, los cambios compensatorios en el cerebro dependen de la edad y del sexo (Kolb *et al.*, 1998), no obstante la influencia hormonal del ciclo estral ha limitado el interés por investigar cómo responde un organismo hembra ante una lesión. Recientemente Prendergast *et al.*, (2014) con un estudio de meta-análisis, determina que el ciclo estral genera variación en el comportamiento, en la morfología, fisiología y en rasgos moleculares, sin embargo esas variaciones no son suficientes para explicar las diferencias entre los sexos y entonces, existen otros factores tales como el ambiente familiar que resultan de mayor impacto.

Aunado a esto, muchos modelos animales de enfermedades mentales tales como la depresión ocupan organismos macho y los resultados son continuamente extrapolados a las hembras tal es el caso del modelo de bulbectomía olfatoria propuesto como modelo de depresión.

Los efectos de la bulbectomía olfatoria en rata han sido ampliamente estudiados y a partir de ello de manera reciente se propuso el modelo de bulbectomía olfatoria neonatal (OBXn) con la idea de producir un modelo de depresión infantil (Silva-Gómez 1998), no obstante los resultados conductuales hasta el momento encontrados, muestran que los roedores bulbectomizados no presentan alteraciones que pudieran ser relacionadas con la enfermedad. Estas diferencias se han explicado en relación al gran potencial que tiene el cerebro de ratas neonatas y juveniles de compensar o recuperarse de un daño, sin embargo, solo se tienen datos de ratas macho. Por todo lo anteriormente expuesto, resulta necesario tener información de los efectos de la OBXn en rata hembra, lo que permitirá aportar mayor información de las posibles diferencias relacionadas con el sexo en cuanto a plasticidad neuronal.

3. HIPOTESIS

La bulbectomía olfatoria neonatal, promueve alteraciones en la conducta locomotora, en el aprendizaje espacial y en la morfología neuronal de hipocampo y CE de la rata hembra.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la bulbectomía olfatoria neonatal en la actividad locomotora, en memoria espacial y en la morfología de neuronas de hipocampo y corteza entorrinal dorsal de ratas hembra.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la actividad locomotora en campo cerrado de ratas hembra postpuber que sufrieron bulbectomía olfatoria neonatal.

- Evaluar el aprendizaje y la memoria espacial de ratas hembras sometidas a OBXn.

- Analizar la longitud dendrítica apical y basolateral así como la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de hipocampo CA3 y CA1 y neuronas piramidales de corteza entorrinal dorsal en ratas hembras que sufrieron bulbectomía olfatoria neonatal.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se ocuparon 48 ratas hembras Wistar de 7 días de edad proporcionadas por el bioterio “Claude Bernad” de la BUAP, las cuales se mantuvieron en condiciones estándares de temperatura y humedad ($21 \pm 1^\circ\text{C} - 55\%$), con ciclos de luz oscuridad de 12 horas (7 am- 7 pm), y libre acceso a alimento y agua. Se formaron dos lotes de tres grupos cada uno: grupo 1: ratas bulbectomizadas en etapa neonatal (OBX), grupo 2: ratas SHAM (bulbos olfatorios expuestos pero sin remoción) y grupo 3: ratas CON (ratas intactas). A los 60 días (Sengupta 2013, Flores *et al.*, 2014) al primer lote de animales se les midió la actividad locomotora en campo cerrado y aprendizaje y memoria espacial mediante la prueba de laberinto acuático de Morris. En cuanto al segundo lote, se obtuvieron los cerebros para reportar la morfología neuronal de hipocampo dorsal y corteza entorrinal (Figura 6).

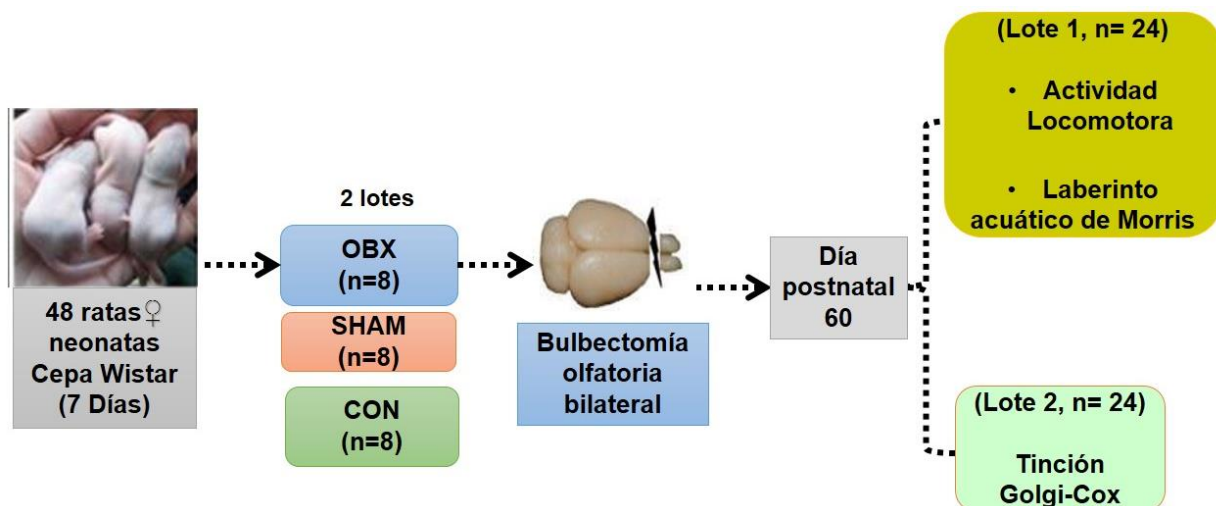


Figura 6. Diagrama general de trabajo.

5.2 PROTOCOLO DE ABLACIÓN DE BULBOS OLFATORIOS EN NEONATOS

La extracción de bulbos olfatorios en ratas neonatas se realizó a los 7 días de edad con ayuda de anestesia por hipotermia. Brevemente se colocaron las ratas de 15-20 minutos sobre hielo triturado para producir hipotermia (Flores et al., 2014). Una vez anestesiadas y bajo condiciones asépticas se realizó la incisión al nivel de lóbulo frontal, para exponer por craneotomía los bulbos olfatorios. Éstos fueron removidos por succión con una cánula adaptada a una jeringa. Durante este procedimiento se mantuvo húmeda el área de la incisión de piel con solución buffer pH7.4 frío (4°C) para evitar una hemorragia. Posteriormente la herida se limpió y se suturó con hilo seda tres ceros absorbible. Como analgésico a los animales se les aplicó xilocaina en gel al 2% (Skelin *et al.*, 2008).

Para la recuperación de la anestesia se colocaron bajo una lámpara y sobre un colchón térmico. Una vez que despertaron de la anestesia se volvieron a colocar con sus madres. Al grupo SHAM también se les realizó el mismo procedimiento, anestesia por hipotermia y la exposición de los bulbos olfatorios pero sin ser removidos. Mientras que los animales del grupo control fueron únicamente tomados por el experimentador (animales que no recibieron tratamiento quirúrgico).

Todos los animales fueron devueltos a sus madres y a los 26 días fueron destetados y agrupados de manera azarosa. Asimismo fueron visitados constantemente para verificar su cuidado y su supervivencia y tomados brevemente por el experimentador para que se acostumbraran al contacto hasta los 60 días que se iniciaron las pruebas de conducta o se realizó el sacrificio.

La cirugía y el cuidado de los animales fueron supervisados por el Dr. Carlos Escamilla con cédula profesional 1107143 y por el personal técnico del Bioterio.

5.3 PRUEBAS CONDUCTUALES

5.3.1 PRUEBA DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN CAMPO CERRADO

Esta prueba se realizó a la misma hora todos los días de prueba, y bajo las mismas condiciones de iluminación y temperatura. Los animales fueron trasladados al laboratorio de conducta 30 minutos antes para su relajación debido al traslado. El registro de la actividad locomotora de las ratas bulbectomizadas y sus respectivos controles consistió en introducir al animal en una cámara de actividad locomotora. Estas cajas son de acrílico negro y miden 30 cm de alto X 28 cm de ancho y de largo 55 cm.

Estas cajas tienen 8 fotodiodos instalados a lo largo y a una altura de 8 cm del piso de la caja. Las cajas se encuentran conectadas a una computadora (Figura 7) y cada vez que el animal deambula por la caja se produce la interrupción del haz de luz (imperceptible para el animal) entre los fotodiodos; dicha interrupción es cuantificada como un movimiento. El número de movimientos fue registrado por el programa RmotionSensor S4 2.0.1. (iDEC electrónica) durante 6 intervalos sucesivos de 10 minutos cada uno (registro total de 60 minutos).

Al finalizar la prueba, se tomó nota del número de movimientos por intervalo de tiempo (actividad locomotora no acumulada) y el número total (actividad locomotora acumulada) de cada animal.

Esta prueba es una de las pruebas más simples para determinar actividad locomotora en la rata y ha sido utilizada principalmente en la investigación farmacológica conductual (Kalivas & Pierce, 1997). Los programas automatizados consisten en conectar una malla de rayos infrarrojos que permiten analizar una gran variedad de variables del comportamiento locomotor, incluyendo la actividad horizontal y vertical, movimientos de lucha, distancia recorrida entre otras (Russell W. Brown, 2005).

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

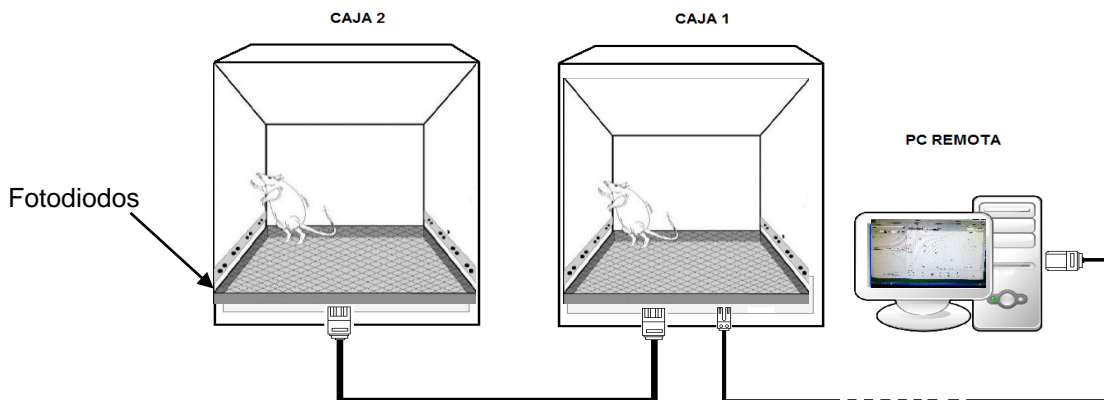


Figura 7. Esquematación del equipo de medición de la actividad motora. Las flechas indican la hilera de fotodiodos

5.3.2 PRUEBA DE LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

Para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial se realizó la prueba de laberinto acuático de Morris (Morris *et al.*, 1984). El procedimiento se realizó en una tina circular de 1.40 m de diámetro de entrada, 1.35 m de diámetro de la base y 80 cm de altura, la cual se divide en cuatro cuadrantes (Oeste, Este, Sur, Norte). Dentro de la tina se coloca una plataforma de escape de 40 cm de alto por 15 cm de diámetro al nivel de cuadrante Sur-Este. Esta tina se encuentra en un cuarto de conducta que tiene minimizado el ruido y en el cual hay señales extra-laberínticas para ayudar a la ubicación de la plataforma de escape (figura 8). Previamente los animales fueron trasladados del Bioterio “Claude Bernard” al cuarto de conducta donde permanecieron 20 minutos en reposo antes de iniciar la prueba para disminuir el estrés generado por el traslado. Los animales tuvieron que encontrar la plataforma escondida situada 2 cm por debajo de la superficie del agua teñida de color blanco con colorante no tóxico (dióxido de titanio). El número total de ensayos realizados por los animales fue de 24 en 6 días de prueba. El primer día se realizaron 4 ensayos que corresponden a la fase de habituación, que consistió en introducir al animal con el rostro orientado hacia la pared de la tina. Durante un lapso de tiempo de 120 segundos se le permitió el reconocimiento de la tina y si encontraba o no la plataforma se les colocó sobre la plataforma de escape por 30 segundos. Para cada ensayo el animal fue introducido a un cuadrante diferente. Se cuantificó la latencia de

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

escape en segundos (tiempo en que la rata encuentra la plataforma). En los días 2 al 5 se realizaron los siguientes 16 ensayos que corresponden a la fase de aprendizaje, se cuantificó nuevamente la latencia de escape, pero ya sin ser colocadas 30 segundos sobre la plataforma. Quince días después de la etapa de aprendizaje se realizaron los últimos 4 ensayos (día 6) correspondientes a la etapa de memoria, cuantificando también la latencia de escape. Durante los 6 días, la temperatura del agua se mantuvo a 22 ° C y en cada ensayo, los animales eran secados con una toalla. También entre ensayo y ensayo hubo un tiempo de 50 minutos para el descanso de los animales. Los animales fueron introducidos a la tina desde los puntos que refiere a los puntos cardinales.

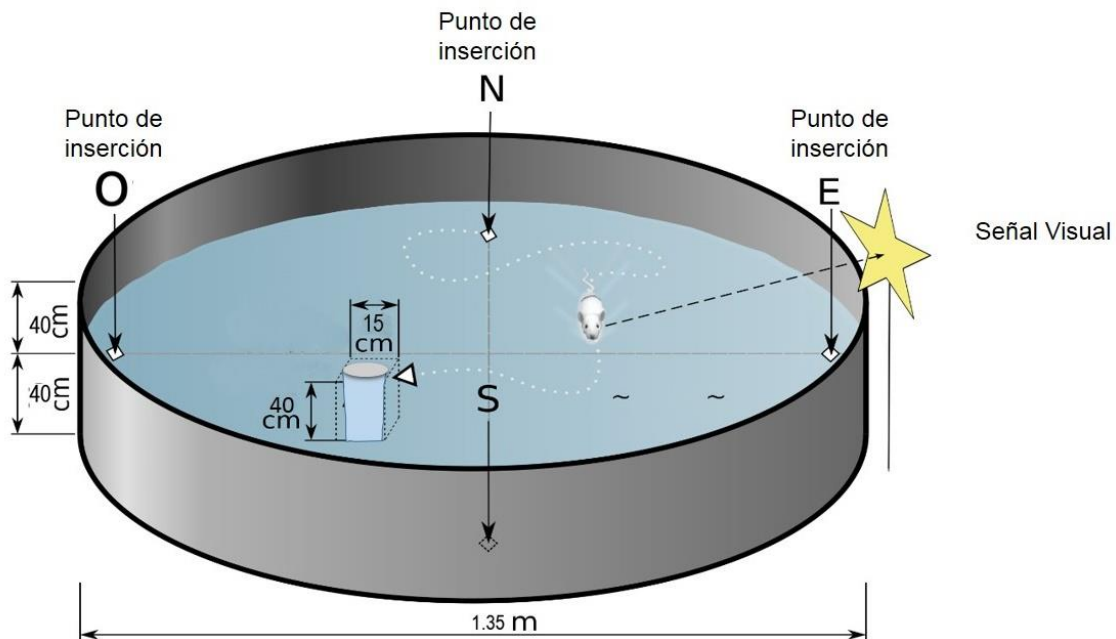


Figura 8. Esquema del laberinto acuático de Morris, se muestran las medidas de la tina y plataforma, señales extralaberínticas (estrella) que la rata puede tomar como referencia para ubicar y encontrar la plataforma y los cuadrantes donde se introduce el animal en cada ensayo.

5.4. MORFOLOGIA NEURONAL

Para analizar la morfología neuronal y la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales de hipocampo dorsal y corteza entorrinal los cerebros de las ratas del lote 2 se procesaron mediante el método de Golgi-Cox (Gibb & Kolb, 1997).

5.4.1 TINCIÓN DEL GOLGI-COX

Los grupos del lote 2 a los 60 días de edad fueron anestesiados con pentobarbital sódico (70mg/Kg) y se les realizó una perfusión cardiaca con NaCl 0.9% para extraer el cerebro limpio de sangre. Los cerebros extraídos se colocaron en 30 ml de solución de Golgi-Cox durante 14 días en completa obscuridad. Cumplidos los 14 días, los cerebros se cambiaron a una solución de sacarosa al 30% por 5 días para poder ser cortados. Los cortes fueron hechos con un vibrotomo (vibrotomo manual NVSL) de un grosor de 200 µm al nivel de hipocampo dorsal y corteza entorrinal. Los cortes fueron montados en laminillas previamente gelatinizadas al 2%, y se fijaron al vidrio haciendo presión sobre el portaobjetos con papel filtro. Las laminillas se mantuvieron en una cámara húmeda para evitar la desecación del tejido durante una noche. La tinción fue revelada con hidróxido de amonio (30 minutos) posteriormente un enjuague con agua destilada (1minuto) después se fijó con fijador Kodak seguido de un enjuague de agua destilada (1minuto) y a continuación la deshidratación del tejido con un tren creciente de soluciones porcentuales de alcohol de 70% y 90% durante 1 minuto cada uno y dos pasos de 5 minutos en alcohol al 100%. Por ultimo, 15 minutos en Xileno para que después se montara el cubreobjetos con resina sintética (Entellan). El secado fue en completa obscuridad para su posterior observación (Figura 9).

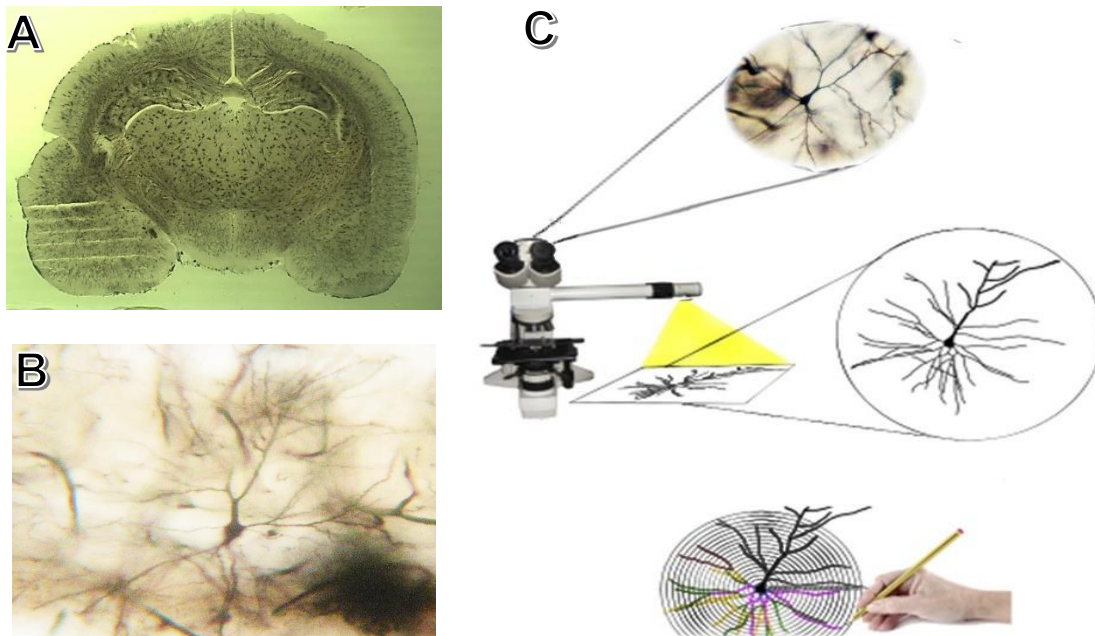


Figura 9. A) Fotografía de un corte (Hipocampo Dorsal), ya obtenidas las imágenes de las laminillas se procede a la observación al microscopio. B) Neuronas Piramidales de Hipocampo. C) Representación de la observación del microscopio y la proyección a la hoja para realizar el dibujo de la neurona que se observa. Ya obtenido el dibujo se procede al Análisis de Sholl

5.4.2 ANÁLISIS DE SHOLL

Una vez secas las laminillas después de 5 días de su preparación, se realizaron dibujos de neuronas para el análisis morfológico. Se utilizó un microscopio óptico marca Leica el cual tiene acoplada una cámara lucida; se hicieron dibujos en 2D de 30 neuronas por encéfalo, 10 de la región CA1, 10 de la región CA3, 10 de corteza entorrinal (5 neuronas del hemisferio derecho y 5 del hemisferio izquierdo de cada región). Solo se dibujaron aquellas neuronas que tenían buena impregnación de la tinción, completas y con soma piramidal, preferentemente aisladas, es decir, que no formaran parte de un cumulo de neuronas. Cada neurona fue dibujada con una amplificación de 400x.

Una vez reconstruida la neurona se calculó su longitud y la arborización dendrítica del árbol apical y basolateral. Se analizaron por medio de la técnica de análisis de Sholl, que consiste en lo siguiente: se pintan de diferentes colores las dendritas de acuerdo con su grado de ramificación, se consideran de primer orden las dendritas que surgen a partir

del soma hasta que se ramifican, estas ramificaciones se denominarán de segundo orden y así sucesivamente. Después se coloca una plantilla transparente de círculos concéntricos de 10 μm de separación sobre la reconstrucción de la neurona, el soma de la neurona se coloca en el centro de la plantilla y se cuenta el número de intersecciones dendríticas (árbol apical y basolateral por separado) en los círculos concéntricos (figura 6).

El análisis de Sholl antes descrito, nos permitió medir en cada neurona analizada: la longitud dendrítica total, que se refiere a la longitud del árbol dendrítico completo, y la densidad de la arborización dendrítica (Sholl, 1953).

La densidad de espinas dendríticas la calculamos en dibujos de segmentos de una dendrita de 3^{er} orden de al menos 10 μm de longitud.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La longitud dendrítica total y la densidad de espinas dendríticas fueron analizadas mediante una prueba de análisis de varianza de una vía y una prueba post-hoc de Tukey, considerando el tratamiento (bulbectomía olfatoria) como variable independiente. La arborización dendrítica se evaluó con un análisis de varianza de dos vías y una post-hoc de Tukey. Como variables independientes se consideraron al tratamiento (bulbectomía olfatoria) y al círculo concéntrico, y como variable dependiente al número de intersecciones dendríticas.

Para analizar los datos de actividad locomotora se consideró la bulbectomía olfatoria como variable independiente, se analizaron con un análisis de varianza de una vía con una prueba post-hoc de Tukey. Para el aprendizaje y la memoria se consideró el tratamiento como variable independiente y teniendo como variable dependiente el tiempo de exploración se analizaron con una ANOVA de una vía y una prueba post-Anova de Bonferroni.

Para los análisis se consideraron diferencias significativas cuando el valor de $P < 0.05$. Todo el procesamiento de datos se realizó en el programa GraphPad Prism versión 5.0.

6. RESULTADOS

6.1 MORFOLOGIA DE NEURONAS DE CORTEZA ENTORRINAL

En la figura 10 se muestran fotomicrográficas de neuronas de Corteza entorrinal, se observa el árbol basolateral y apical de cada neurona.

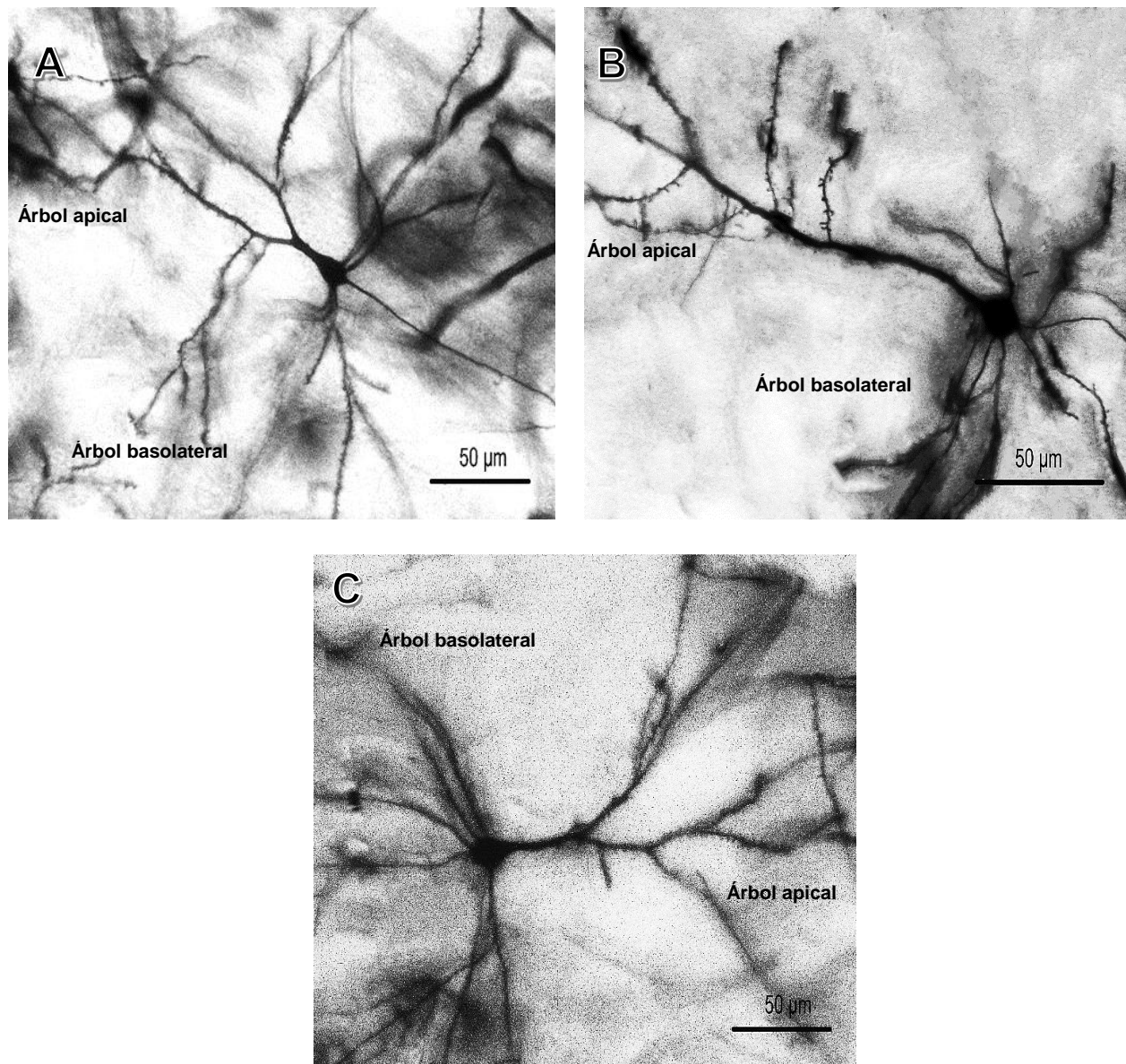


Figura 10. Neuronas piramidales de corteza entorrinal. (A) CON, (B) OBX y (C) SHAM.

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

Las neuronas de corteza entorrinal no muestran diferencias en la arborización dendrítica entre los grupos experimentales (figura 11). Tampoco en la longitud dendrítica total se observan diferencias respecto del tratamiento experimental (figura 12).

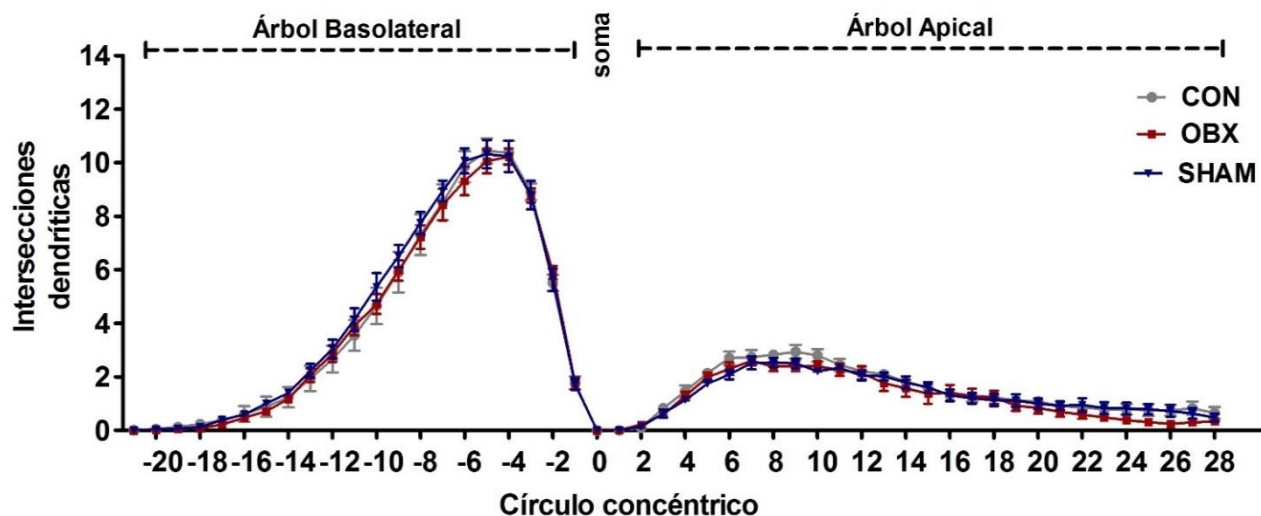


Figura 11. Arborización dendrítica de los grupos. El Árbol basolateral corresponde a la numeración negativa y la arborización apical corresponde a la numeración positiva.

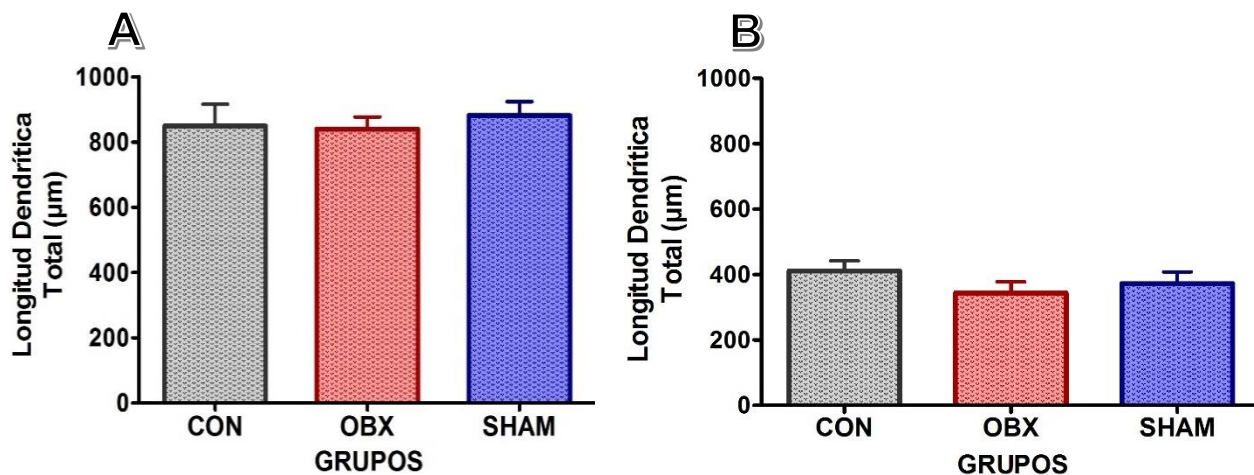


Figura 12. Longitud dendrítica total de neuronas de corteza entorrinal. (A) árbol basolateral y (B) árbol apical.

6.1.2 DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS DE CE

En la figura 13 se observan fotomicrográficas de segmentos de dendritas con espinas dendríticas del árbol basolateral y apical de neuronas de corteza entorrinal.

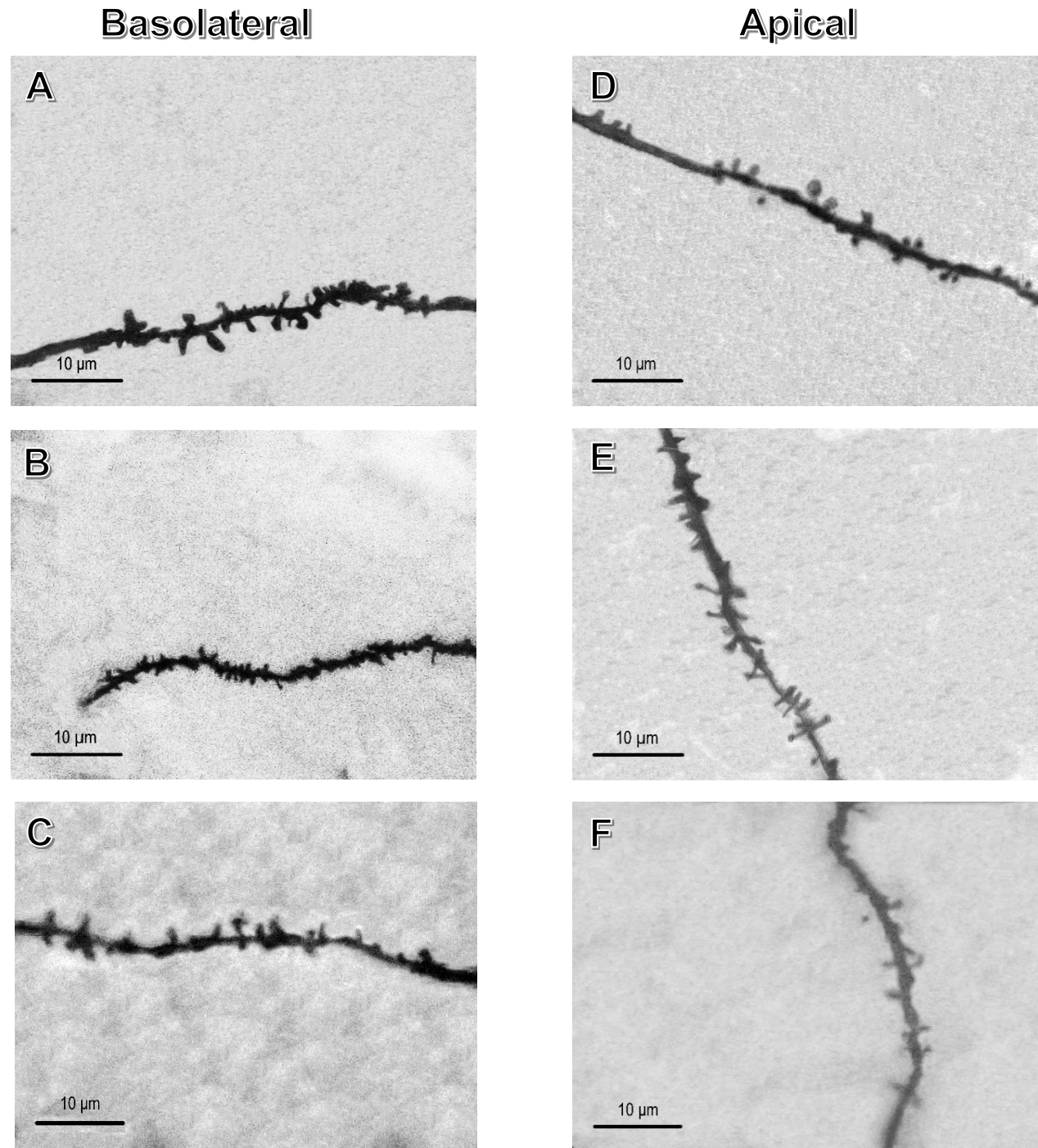


Figura 13. Fotomicrográficas de espinas dendríticas de neuronas de corteza entorrinal. Segmento dendrítico del árbol basolateral del (A) grupo CON, (B) grupo OBX, (C) grupo SHAM. En el lado derecho, segmentos dendríticos del árbol apical de las neuronas del (D) grupo CON, (E) grupo OBX y (F) grupo SHAM.

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

Los resultados muestran que el número de espinas dendríticas es similar entre los grupos experimentales tanto para el árbol basolateral (figura 14 A) como para el apical (figura 14 B).

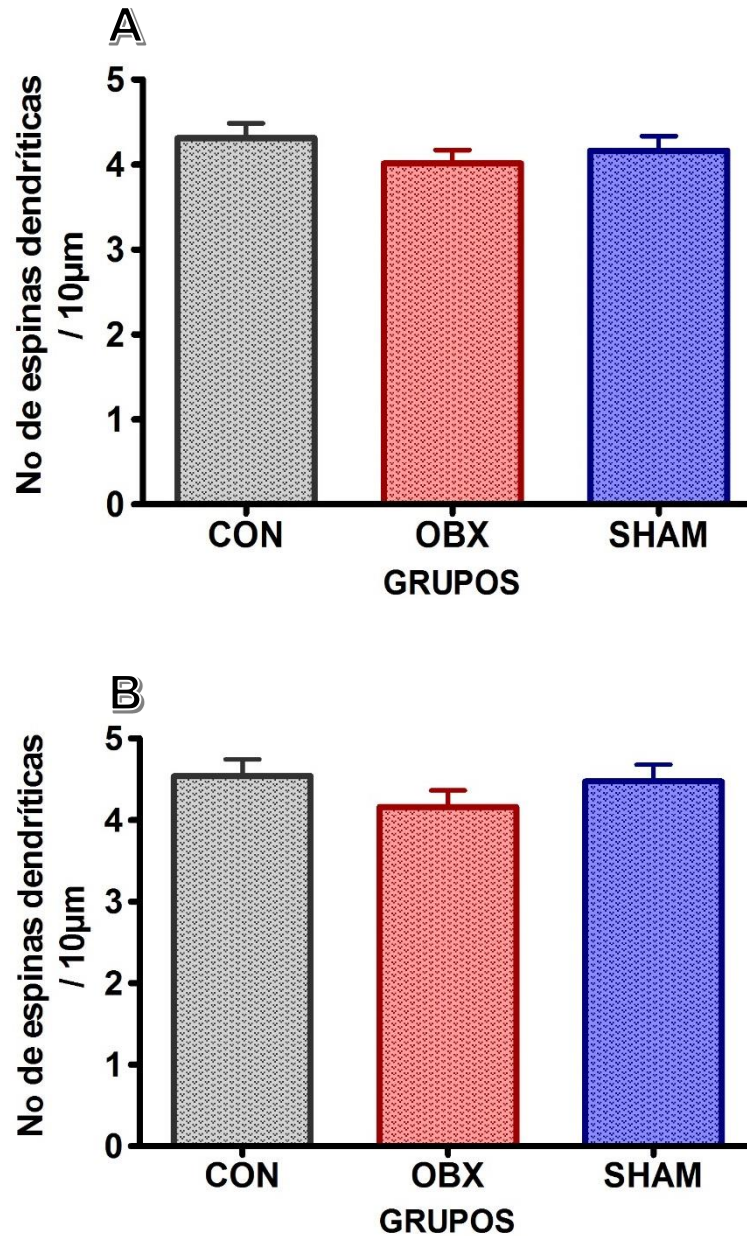


Figura 14. Densidad de espinas dendríticas del árbol apical de neuronas de corteza entorrinal. (A) Árbol basolateral, (B) árbol apical.

6.2 MORFOLOGIA DE NEURONAS CA3

En la figura 15 se muestran fotomicrográficas de neuronas CA3 de los grupos experimentales en las cuales se observa el árbol basolateral y el apical.

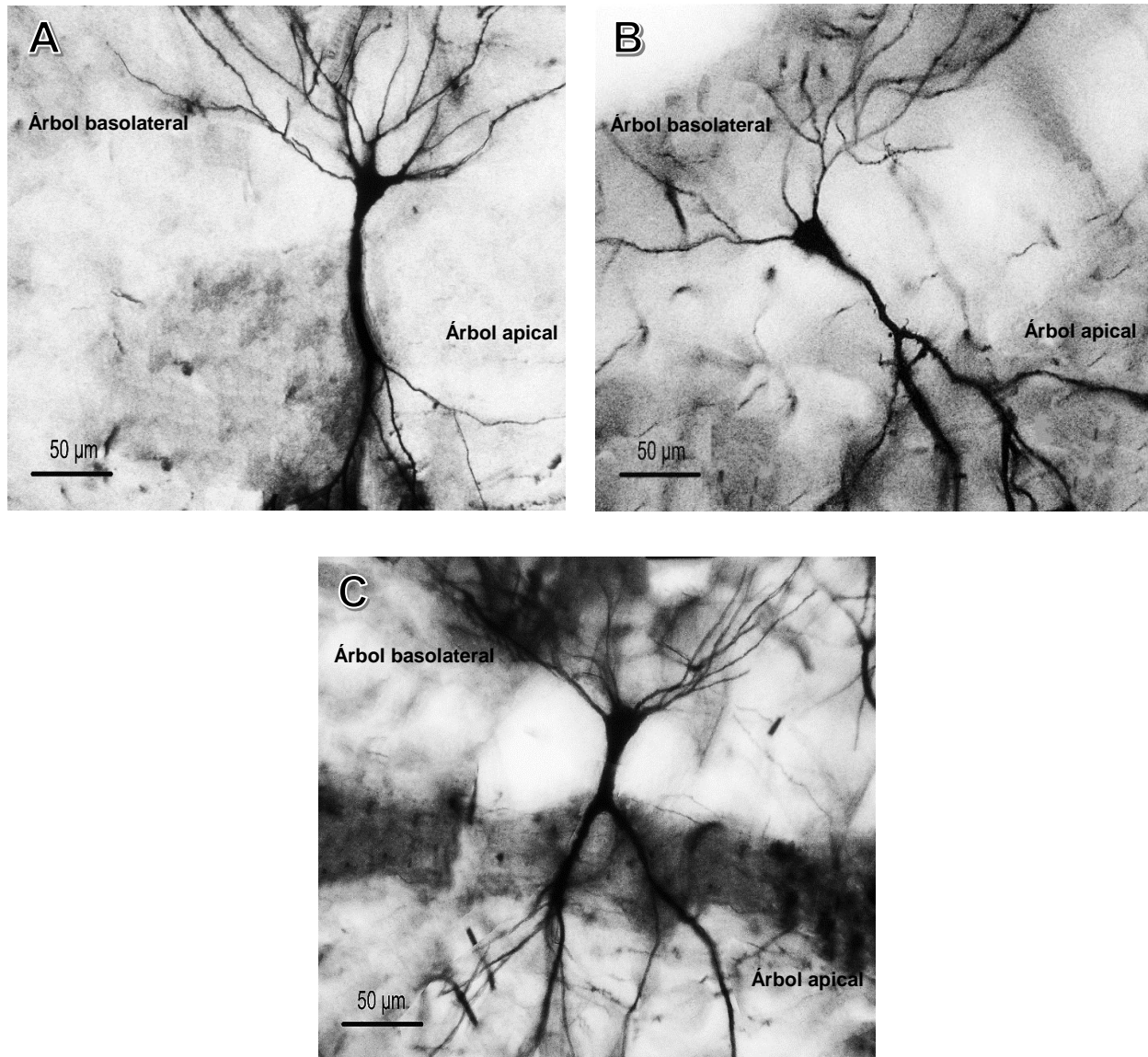


Figura 15. Neuronas piramidales CA3 de hipocampo dorsal. (A) Neurona CA3 del grupo CON, (B) neurona CA3 del grupo OBX, (C) neurona CA3 del grupo SHAM.

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

Los resultados de las neuronas CA3 no muestran diferencias en la arborización entre los grupos experimentales (Figura 16). En cuanto a la longitud dendrítica total de los arboles dendríticos basolaterales (Figura 17A) y apicales (Figura 17B) no se observan diferencias entre los grupos.

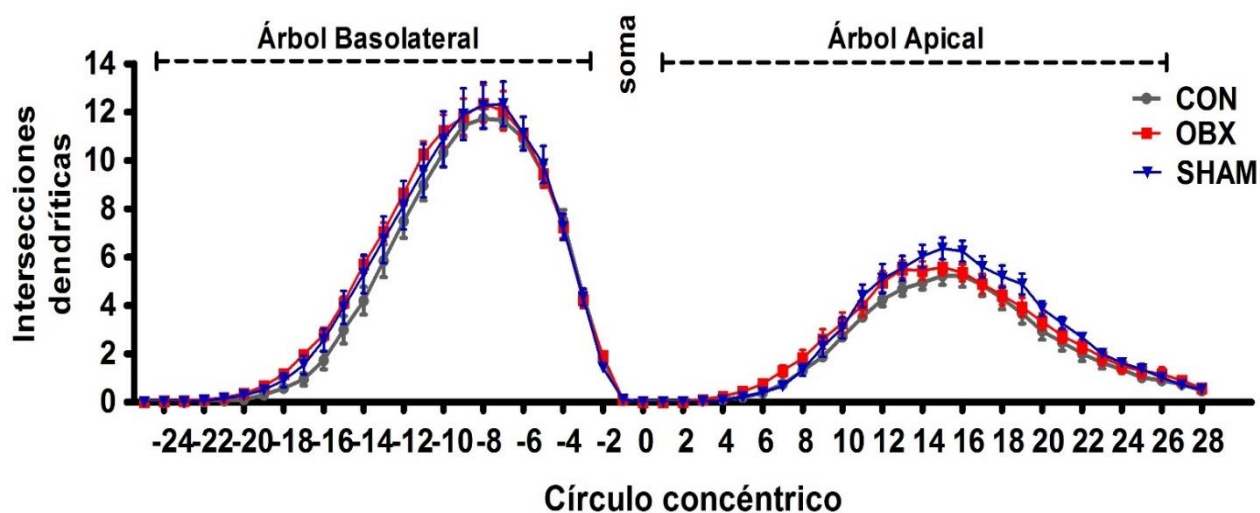


Figura 16. Arborización dendrítica de los grupos. El Árbol basolateral corresponde a la numeración negativa y la arborización apical corresponde a la numeración positiva.

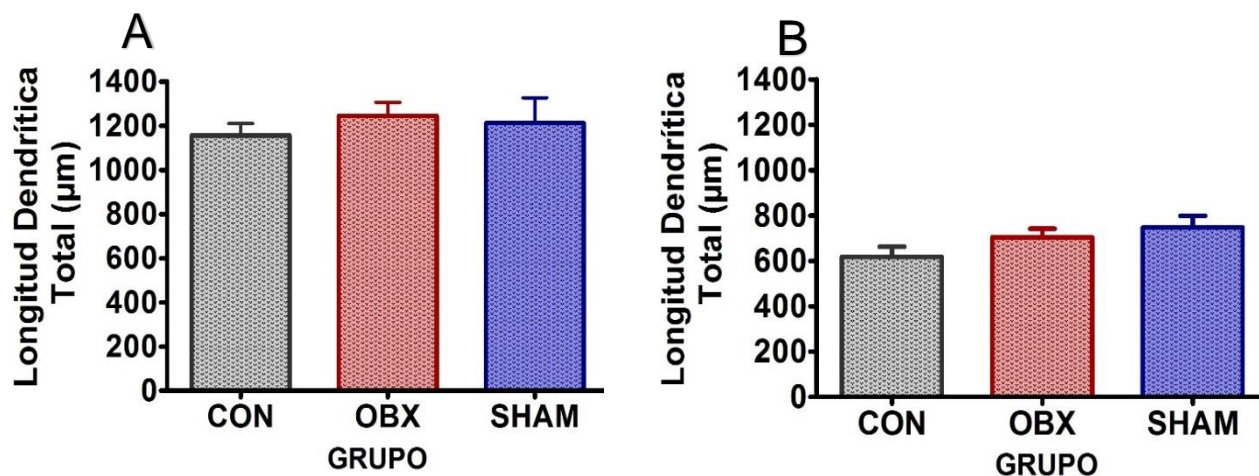


Figura 17. Longitud dendrítica total de neuronas CA3. Árbol basolateral (A) y árbol apical (B).

6.2.1 DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS

En la figura 18 se observan segmentos dendríticos con espinas dendríticas del árbol basolateral y apical de neuronas CA3 de hipocampo dorsal de los grupos experimentales.

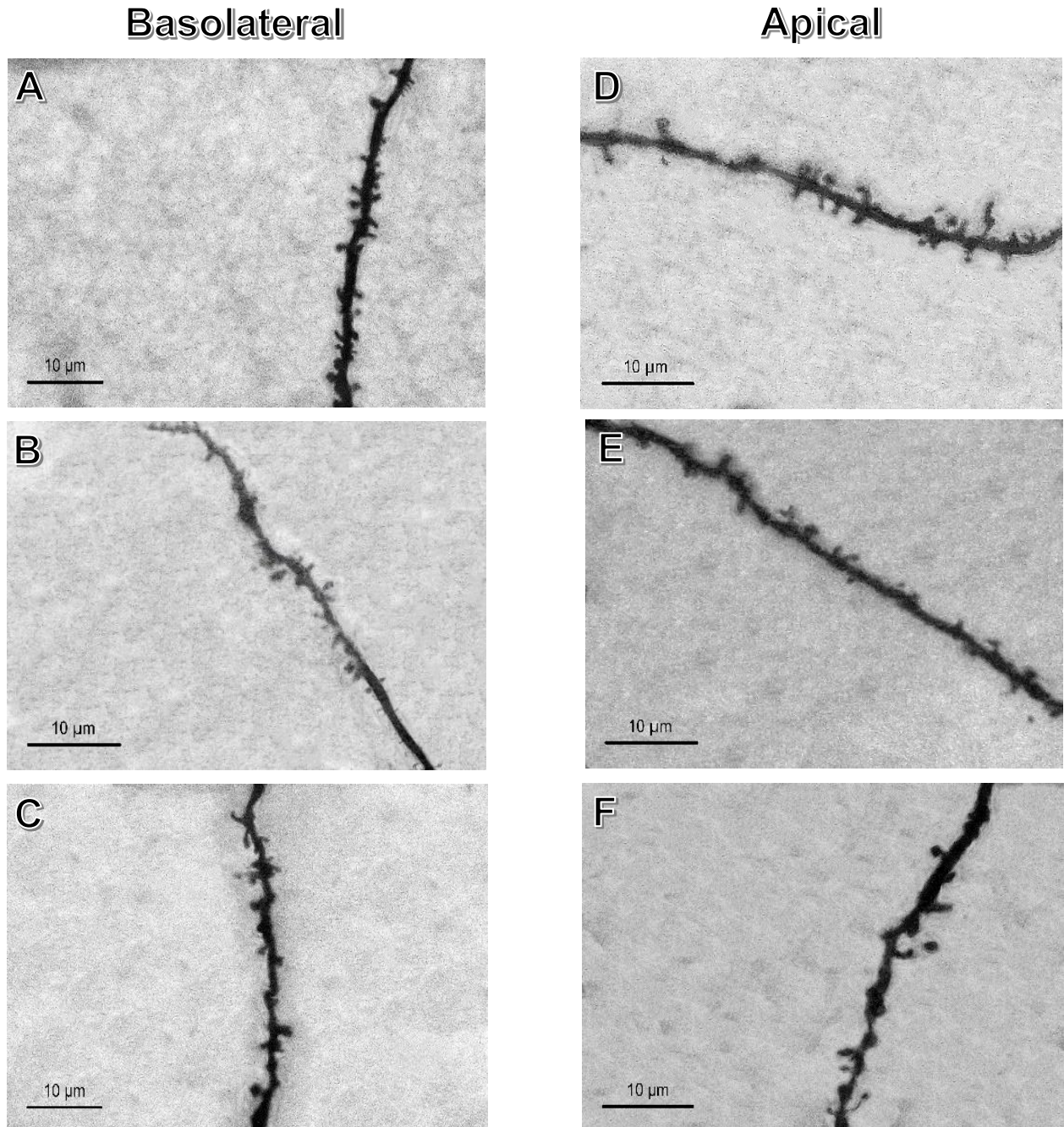


Figura 18. Fotomicrografías de espinas dendríticas del árbol basolateral y apical de neuronas CA3. Segmento de dendrita del árbol basal del grupo (A) CON, (B) grupo OBX, (C) grupo SHAM. En el lado derecho, segmentos dendríticos del árbol apical de neuronas del (D) grupo CON, (E) grupo OBX y (F) grupo SHAM.

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

Los resultados muestran que la densidad de espinas del árbol basolateral del grupo OBX es significativamente menor respecto del grupo CON y que el grupo SHAM muestra una diferencia significativa comparando con el grupo CON ($F_{2, 21} = 7.039$, $p = 0.0046$) (Figura 19A). La densidad de espinas en el árbol apical es significativamente diferente entre el grupo CON y el grupo OBX ($F_{2, 21} = 3.798$, $p = 0.0391$) (Figura 19B).

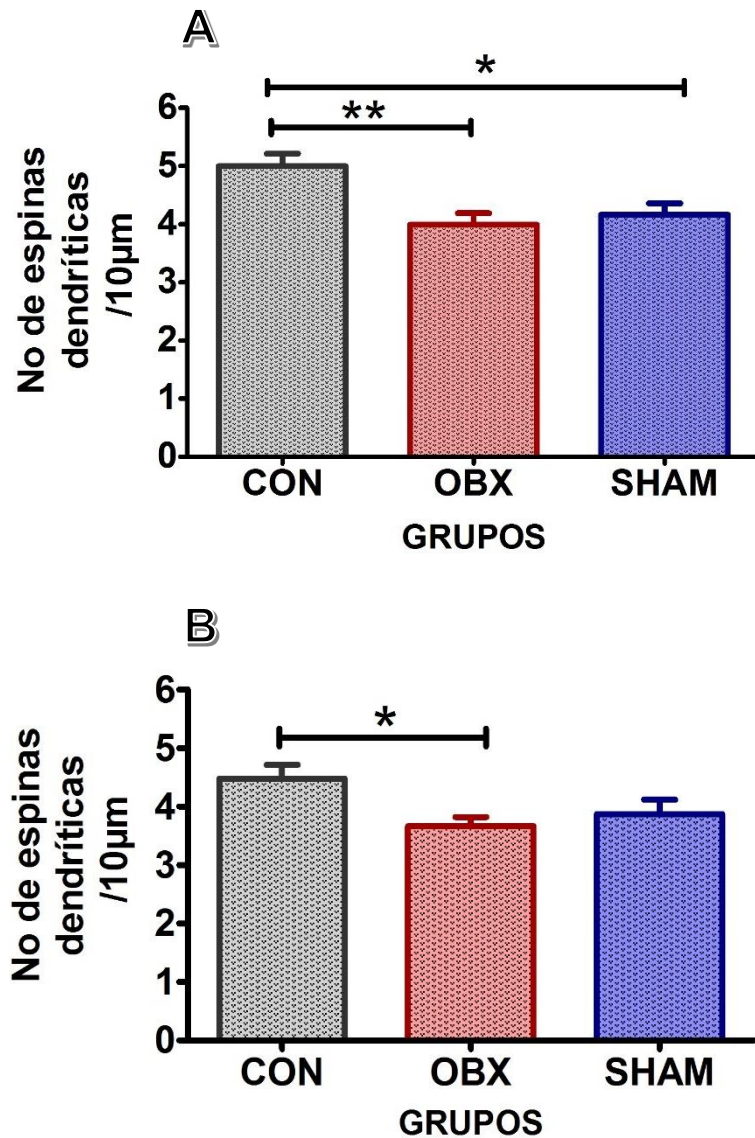


Figura 19. Densidad de espinas dendríticas de neuronas CA3. A) Árbol basolateral y (B) Árbol apical.

6.3 MORFOLOGIA DE NEURONAS CA1

En la figura 20 se muestran fotomicrográficas de neuronas CA1 de hipocampo de los grupos experimentales impregnadas con solución Golgi-Cox así mismo se observa el árbol basolateral y apical de cada neurona.

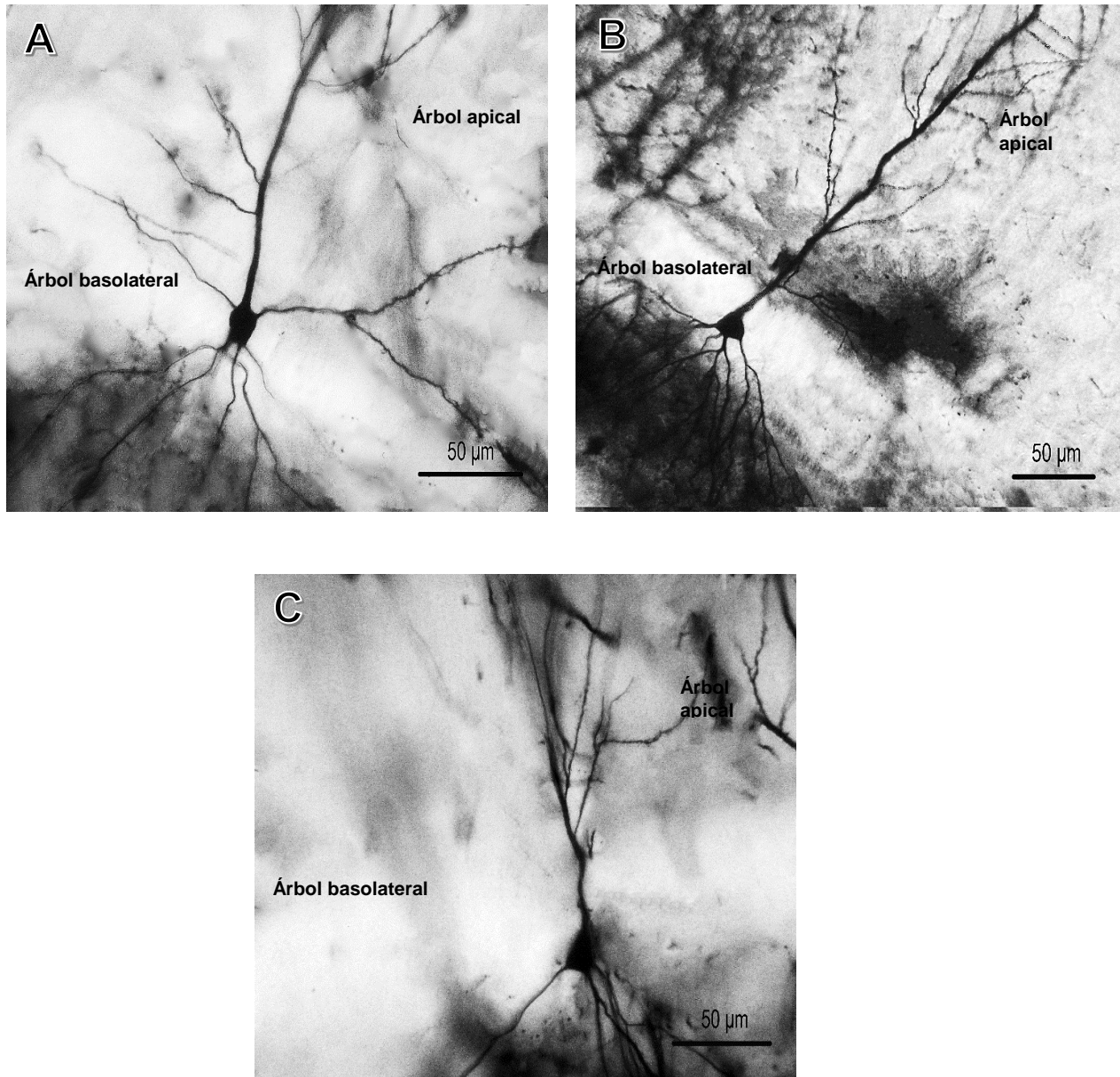


Figura 20. Neuronas piramidales CA1 de hipocampo dorsal. (A) Neurona CA1 del grupo CON, (B) OBX, (C) SHAM.

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

Los resultados de arborización dendrítica muestran que no hay cambios en la arborización dendrítica basolateral y apical, por efecto de la OBX o la cirugía SHAM (Figura 21). No se observan diferencias tampoco en cuanto a la longitud dendrítica total de los árboles (Figura 22 A y B).

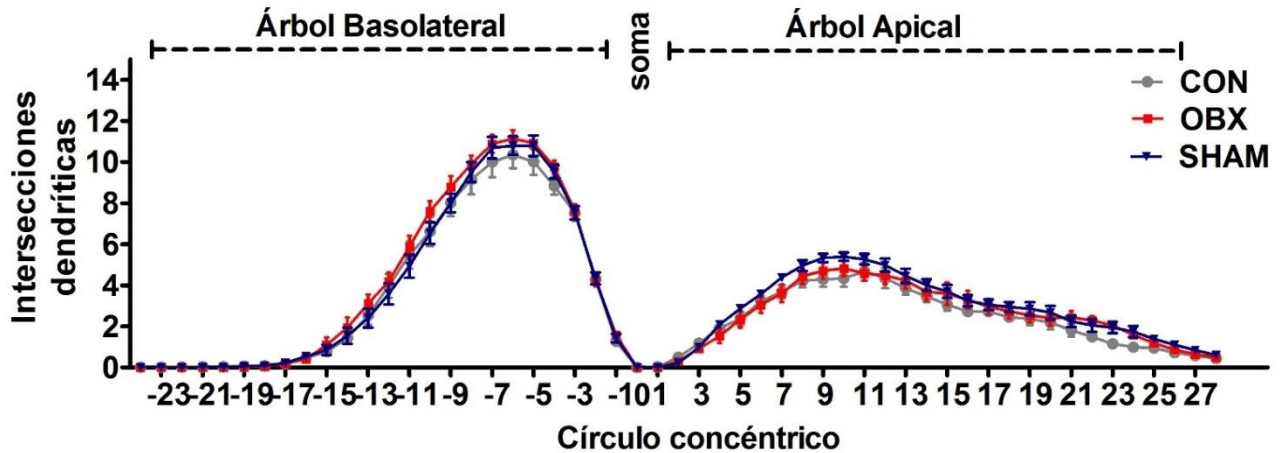


Figura 21. Arborización dendrítica de los grupos. El Árbol basolateral corresponde a la numeración negativa y la arborización apical corresponde a la numeración positiva.

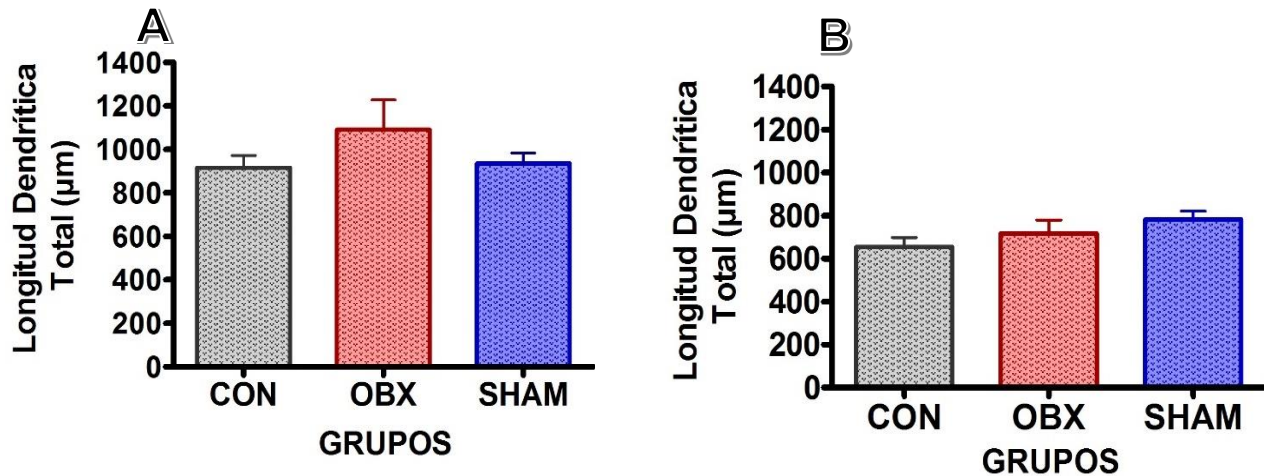


Figura 22. Longitud dendrítica total de neuronas CA1. (A) Longitud dendrítica total del árbol basolateral y Longitud dendrítica del árbol apical (B).

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

En la figura 23 se observan fotomicrográficas de segmentos dendríticos con espinas del árbol basolateral y apical de neuronas CA1 de hipocampo.

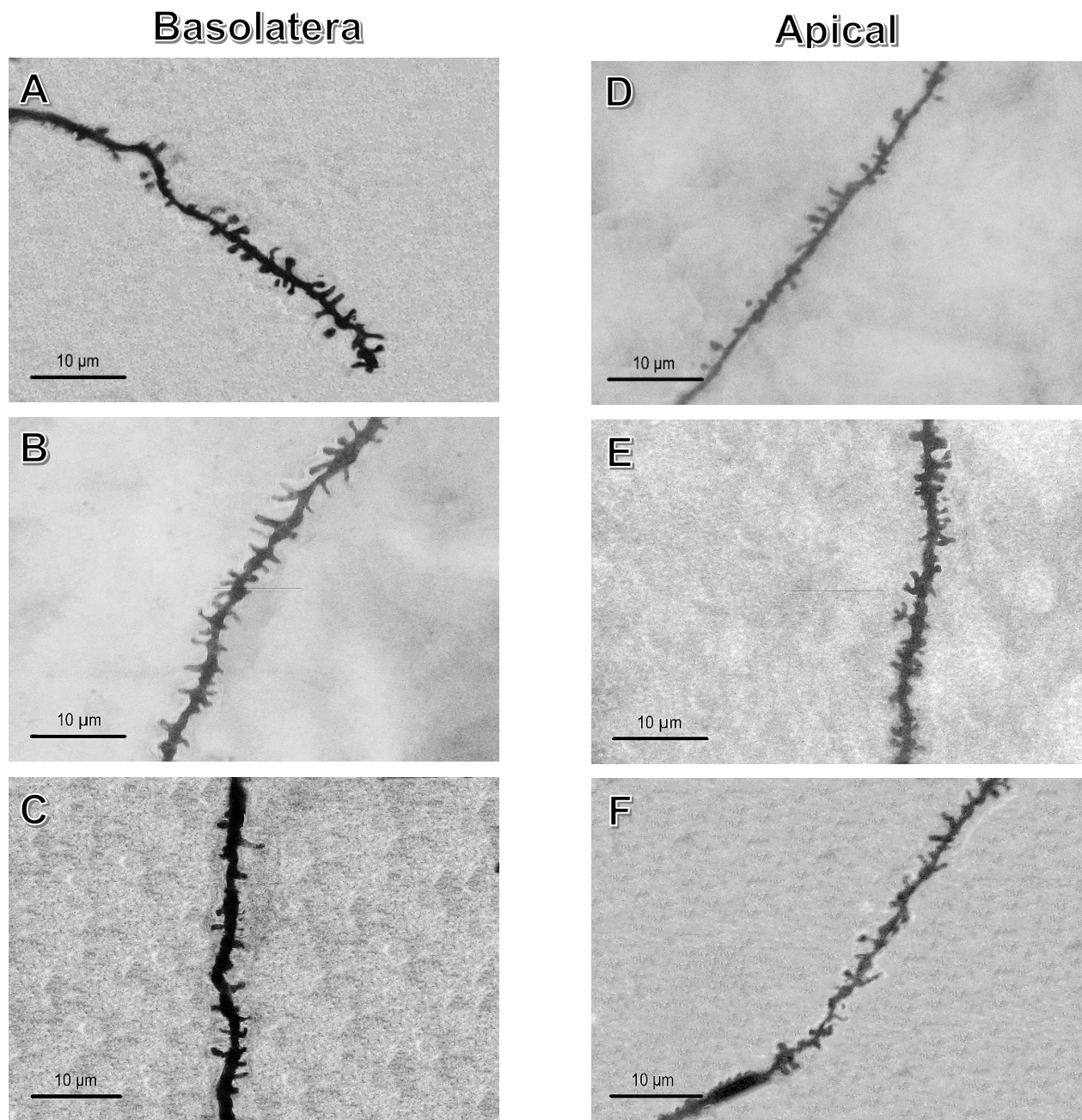


Figura 23. Fotomicrográficas de espinas dendríticas de neuronas CA1. Segmento de dendrita del árbol basal del (A) grupo CON, (B) grupo OBX, (C) grupo SHAM. En el lado derecho, segmento dendrítico del árbol apical de la neurona (D) del grupo CON, (E) del grupo OBX y (F) del grupo SHAM.

Tanto el árbol basolateral, (figura 24 A) como el apical (figura 24 B) de los grupos CON, OBX y SHAM tienen una densidad de espinas similar.

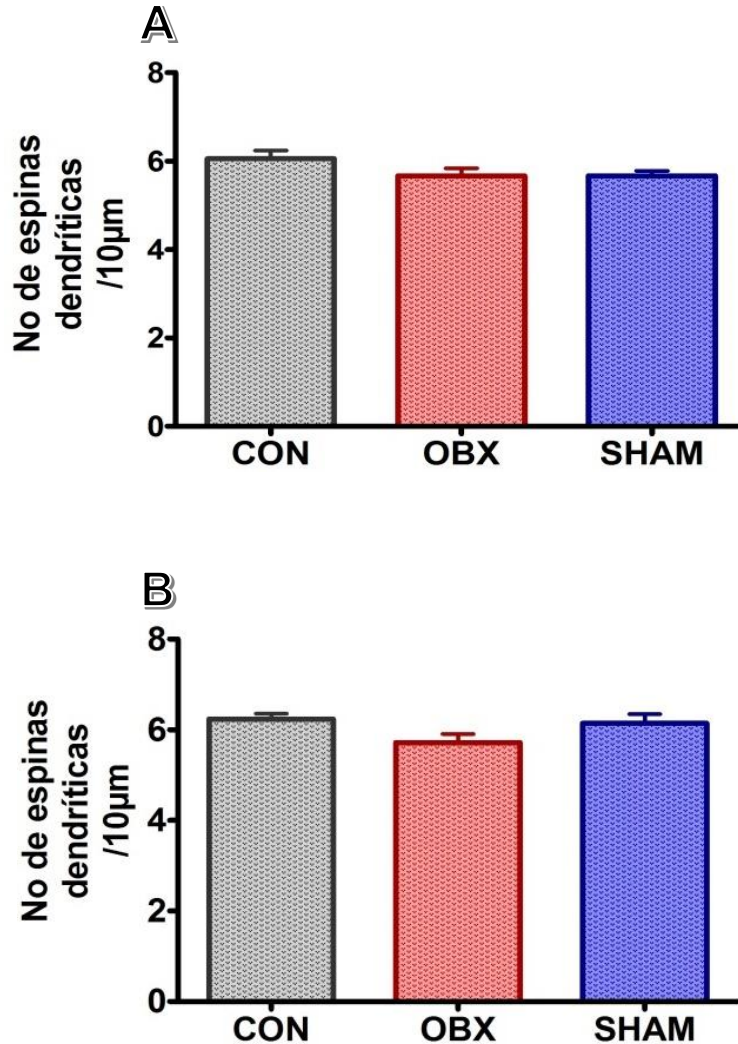


Figura 24. Densidad de espinas dendríticas de neuronas CA1 de los grupos experimentales. (A) Árbol basolateral y (B) árbol apical.

6.4 ACTIVIDAD LOCOMOTORA

No se observaron diferencias entre los grupos en la actividad locomotora, cuando se hizo el análisis por periodos de 10 minutos (figura 25) ni actividad locomotora acumulada (figura 26).

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

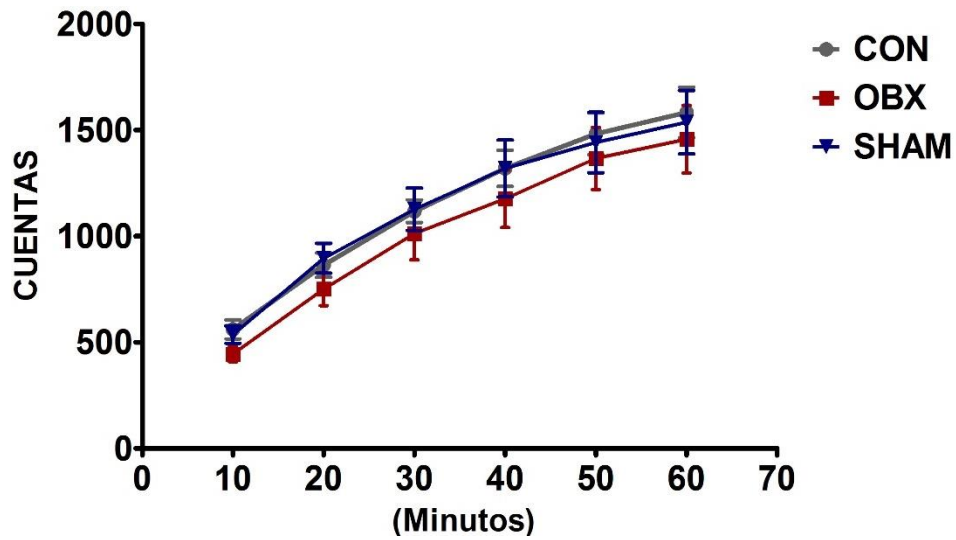


Figura 25. Actividad locomotora acumulada. Los valores indican la media de los desplazamientos acumulados por intervalos de tiempo de 10 minutos

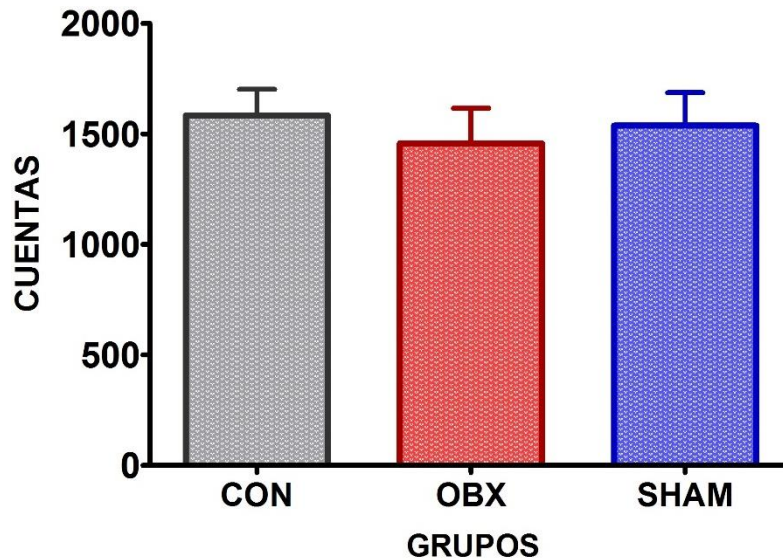


Figura 26. Actividad locomotora total. Los valores indican la media de los desplazamientos totales durante 60 minutos

6.5 LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

En la prueba de aprendizaje y memoria, no se vio efecto de la bulbectomía olfatoria. También se realizó la comparación de los promedios de los grupos por los días de pruebas y se encontró diferencias solo al inicio de la prueba de aprendizaje, el día dos entre el grupo CON y el grupo SHAM ($F_{5, 126}=56.96, p=0.0001$) (figura 27)

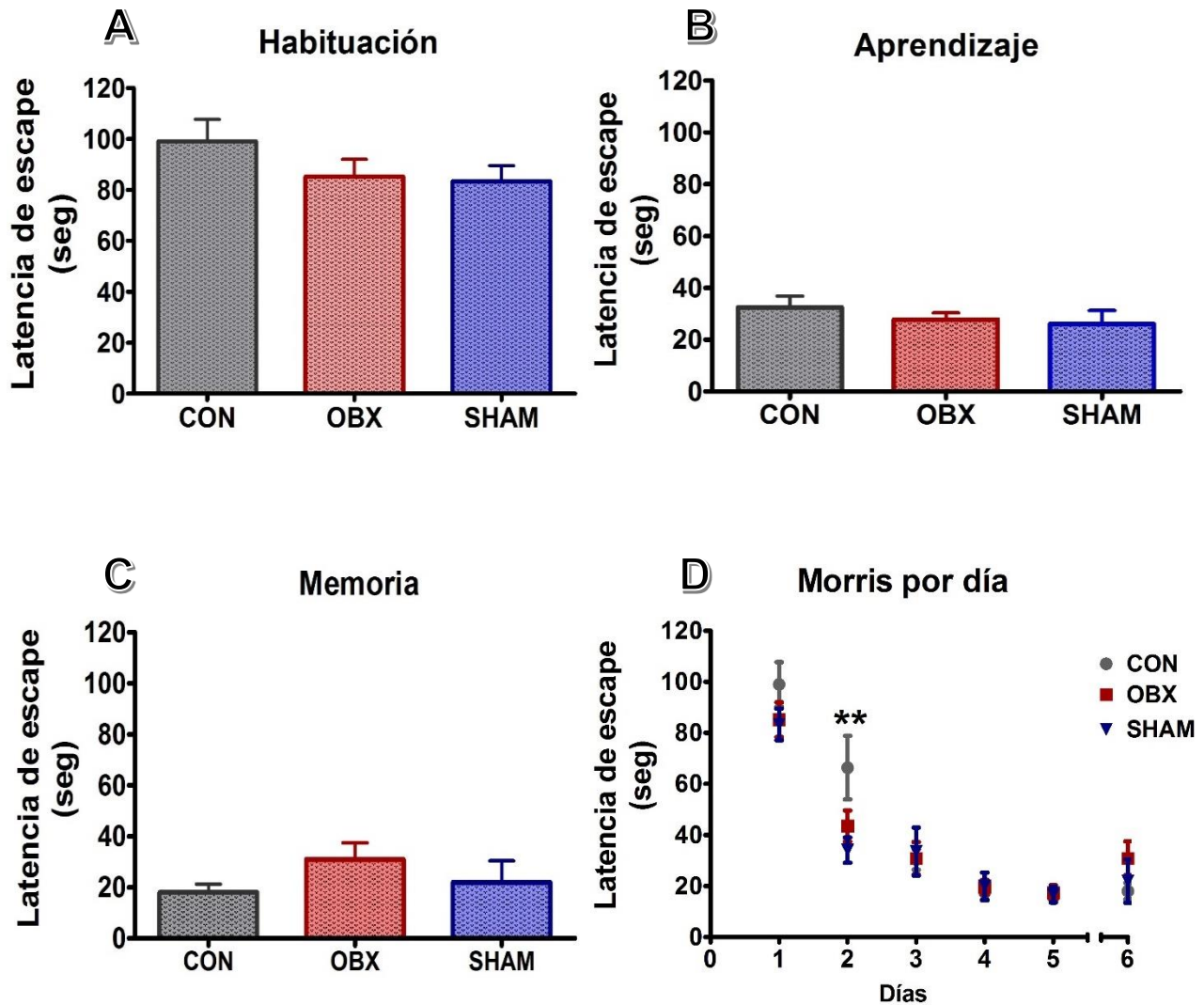
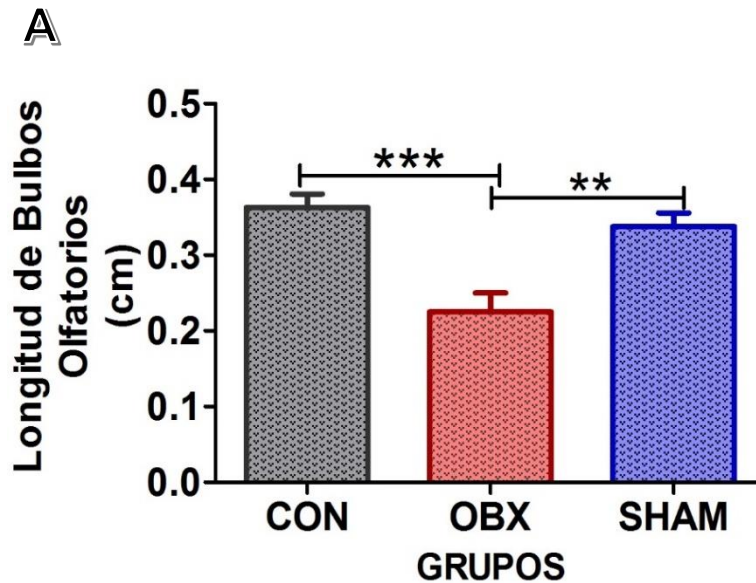


Figura 27. Aprendizaje y memoria en la prueba de laberinto acuático de Morris. Se observan los datos de latencia de escape. (A) Fase de Habitación, (B) Fase aprendizaje, (C) Fase de memoria, (D) Morris por día: Día 1=Habitación, Días de 2 al 5=Aprendizaje, Día 6=Memoria.

6.6 TAMAÑO DE BULBOS OLFATORIOS

Se analizó el tamaño de los bulbos olfatorios de las ratas bulbectomizadas a los 60 días de edad. En la figura 28 A se muestran los promedios de tamaño de los bulbos olfatorios y se observa que el tamaño de los bulbos del grupo OBX es significativamente menor comparado con el grupo SHAM y el CON ($F_{2, 21} = 12.43$, $p = 0.0003$).



B



Figura 28. Tamaño de bulbos olfatorios de los grupos. (A) Grafica del promedio de los bulbos olfatorios en (B) fotografía de un cerebro de cada uno de los grupos.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se analizó el efecto de la OBXn en ratas hembras sobre la conducta motora, el aprendizaje espacial y la morfología de las neuronas piramidales CA1 y CA3 de hipocampo dorsal así como las de CE.

La OBX en ratas adultas provoca un espectro de alteraciones de comportamiento y de remodelación dendrítica en áreas específicas del cerebro, semejantes a las observadas en cerebros post-mortem de sujetos que sufrieron depresión (Cotter et al., 2005; Hercher et al., 2009). Específicamente, las neuronas piramidales de CPir y de CE sufren cambios morfológicos ante la ausencia de los BO (Wang et al., 2007) ya que son estructuras que reciben conectividad directa de esas estructuras cerebrales (Morales-Medina *et al.*, 2013b). Otra de las estructuras que se afecta por la bulbectomía olfatoria es el hipocampo, se ha reportado atrofia neuronal en células CA1 (Morales-Medina et al., 2013a) y reducción de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas CA1, CA3 y del GD (Norrholm & Ouiment, 2001).

La OBXn en rata hembra, no provocó cambios en la arborización dendrítica ni en la densidad de espinas dendríticas en las neuronas de CE. Estos resultados difieren de los observados posterior a la OBx en rata macho adulta (Morales-Medina et al., 2013b) y a los encontrados por Torres de la Luz (2012) quien reportó alteraciones en la morfología de neuronas de CE de rata macho con OBXn. Las diferencias en el efecto de la bulbectomía olfatoria neonatal y la bulbectomía olfatoria en rata adulta, pueden deberse a que en los primeros siete días de vida, cualquier lesión o daño altera la neurogenesis y la gliogenesis (Kolb, 2005) que pueden llevar a un proceso de recuperación del sistema; mientras que las diferencias observadas con ratas macho bulbectomizados en la etapa neonatal, pueden deberse a las diferencias naturales que existen entre el cerebro masculino y el cerebro femenino que se relacionan principalmente con el volumen de núcleos específicos, la densidad de neuronas, la complejidad de arborización dendrítica y la expresión de neuropeptidos (LaCalle, 2006).

Por otro lado, un factor importante a considerar es la cepa de la rata, ya que existen diferencias en la respuesta que cada tipo de rata expresa ante un estímulo ambiental adverso al que son expuestas. Por ejemplo, existen diferencias en la sensibilidad al estrés

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

entre diferentes cepas de ratas, la cepa Wistar-Kyoto se considera hiperactiva a factores estresantes en comparación con las ratas Fisher y las ratas Wistar (Redei et al., 1994) y todas estas tienen diferentes perfiles de comportamiento en comparación con las ratas Sprague-Dawley (Zafar et al., 1997). Asimismo, las ratas Wistar por efecto de OBX desarrollan síntomas similares a la depresión, síntomas que no son observados en ratas Long Evans bulbectomizadas (Vieyra-Reyes et al. 2008). De acuerdo a esto, la mayoría de los estudios sobre efectos de la OBx en rata han utilizado como modelo biológico a la rata Sprague-Dawley (Morales-Medina et al., 2013a, 2013b).

En relación a los resultados observados de neuronas CA3 del hipocampo, los resultados concuerdan parcialmente con los observados por Torres de la Luz, (2012), ya que él reporta que las neuronas CA3 de la rata macho con OBXn no son afectadas ni en la arborización dendrítica ni en la densidad de espinas dendríticas, mientras que las neuronas CA3 de rata hembra con OBXn sufren una disminución de la densidad de espinas dendríticas (datos del presente estudio). Al respecto, varios factores como el tipo de estrés, la especie, el sexo y la duración del estrés influyen en la respuesta morfológica o fisiológica de la neurona. Por ejemplo se ha observado una disminución (Magariños *et al.*, 1995, Conrad *et al.*, 1999, Stewart *et al.*, 2005, Conrad *et al.*, 2012, Orlowski *et al.*, 2012), un aumento (Sunanda *et al.*, 1997, Sandi *et al.*, 2003) o ningún cambio (Magariños *et al.*, 1996) en la densidad de espinas dendríticas de las neuronas CA3 por diversos tipos de estrés.

Las espinas dendríticas son especializaciones estructurales y funcionales de las neuronas y están encargadas de recibir y procesar información aferente; son estructuras dinámicas que pueden cambiar en respuesta a señales ambientales o a la activación de receptores mediados por neurotransmisores (Spruston & McBain, 2007). El mecanismo descrito para generar atrofia neuronal implica un fenómeno de exitocitotoxicidad desencadenado por la entrada masiva de Ca^{2+} . Este flujo masivo de Ca^{2+} es el resultado de la activación de receptores NMDA y es el evento que modula la actividad de algunas proteínas y algunos complejos de unión a la actina, proteína del citoesqueleto que regula la motilidad, la estructura, la formación y/o la pérdida de las espinas dendríticas (Soria & Perez, 2012).

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

En el hipocampo las espinas dendríticas han mostrado regular el Ca^{2+} de manera independiente a la dendrita de origen (Gutherie et al, 1991), ya que el secuestro de Ca^{2+} se produce en el cuello de las espinas se regula el intercambio de Ca^{2+} entre la cabeza de la espina y la dendrita. Esto representa un efecto neuroprotector, pues previene de citotoxicidad a las dendritas y a las neuronas mediante la restricción de la entrada masiva de Ca^{2+} a de la región sináptica (Rutishauser et al., 1996).

Por otro lado, en la OBX existe un rasgo de comportamiento depresivo que es la hiperlocomoción que se asocia con la incapacidad de adaptarse a un ambiente novedoso (Kelly et al., 1997; Flores et al., 2005). Esta alteración es relacionada con cambios en algunos sistemas de neurotransmisión que implican un incremento en la innervación de fibras serotoninérgicas a la corteza frontal (Huether et al., 1997; Grecksch et al., 1997), lo que a su vez promueve una activación del sistema dopaminérgico y por lo tanto un incremento en la actividad locomotora. La OBXn en rata hembra no provoca cambios en la locomoción de ratas, resultado que es semejante a lo reportado por Flores et al (2014) y diferente a lo reportado por Torres de la Luz (2012) quien encontró que la OBXn en rata macho provoca hiperlocomoción a los 60 días postnatales. Esta diferencia es difícil de explicar ya que se ha mencionado que las ratas de manera natural son hiperactivas, esto mismo se ha observado cuando las ratas a se someten a la rueda para correr, a pruebas de campo abierto y a conductas neofóbicas (Waker et al., 2001; Vernotica & Morrell, 1998) no obstante puede deberse a la manera en la cual las hembras y los machos exploran su ambiente (Tropp & Markus, 2001; Alstott & Timberlake, 2009) o a que la reorganización del lóbulo frontal posterior a la bulbectomía olfatoria modifica la función de las cortezas motoras y premotoras (Hendricks et al., 1994).

En roedores y en humanos, el estrés y la depresión están asociados con déficits de aprendizaje y memoria (Castañeda et al., 2008; Hooge et al., 2001). Los animales adultos con OBX muestran deficiencias en la conducta de evitación pasiva, una condición asociada con las deficiencias de aprendizaje y relacionada con el hipocampo (Sieck, 1972; Kelly et al., 1997; Nakagawasai et al., 2003). Esta estructura se desarrolla y se diferencia hasta la edad posnatal y varios estudios de lesiones neonatales en ratas han demostrado deterioros en la memoria (Altaman & Bayer., 1990; Chambers et al., 1996;

Marquis et al., 2006). A diferencia de Torres de la Luz, (2012) quien demuestra que las ratas macho con OBXn presentan un ligero déficit en encontrar la plataforma de escape en el laberinto acuático de Morris durante las fases de habituación y aprendizaje, en el presente estudio no observamos efecto de la OBXn en el aprendizaje y la memoria espacial de las ratas hembra. Inicialmente, estas diferencias pueden relacionarse con el efecto de las hormonas gonadales de estas ratas, no obstante la capacidad de aprendizaje y la memoria espacial en cada etapa del ciclo estral no está directamente asociada con las diferencias hormonales del ciclo estral (Berry et al 1997) e incluso la remoción de estrógenos no previene el proceso de adquisición de la memoria (Leuner et al., 2004) por tanto es posible que la capacidad de recuperación de un daño y la habilidad para resolver una tarea se base en mecanismos diferentes.

La formación de memoria espacial en el hipocampo se produce a través de la potenciación a largo plazo (LTP) y la plasticidad sináptica en CA1 principalmente, por tanto el giro dentado y las neuronas CA3 tienen menos importancia (Tsien *et al.*, 1996, Chen & Tonegawa, 1997). Moriguchi (2008) y Fukunaga et al, (2009) exploraron como la bulbectomía olfatoria afecta la LTP en la región CA1 y ellos encontraron que la bulbectomía olfatoria aminora la LTP en esta región y en el giro dentado.

Es importante considerar que las consecuencias de la OBX en rata adulta y neonata son enteramente diferentes (Ráčeková & Orendáčová, 2007) aunque en los dos modelos se inducen mecanismos plasticos de regiones del cerebro asociadas a la olfacción o al procesamiento de emociones (Morales-Medina et al., 2013a). En la rata, el olfato es un componente importante en los sistemas quimiosensoriales que participan en la eliminación de señales olfativas para regular el comportamiento de alimentación. La OBX altera el patrón típico de alimentación del roedor o el patrón de mordisqueo persistente (Larue, 1975a; Larue & Le Magnen, 1971, 1972). En la rata adulta, en las primeras semanas posteriores a la cirugía, los animales pierden su capacidad para discriminar los diferentes alimentos (Le Magnen, 1969), incluyendo los alimentos muy apetecibles (Larue y Le Magnen de 1967, 1970, 1972; Primeaux et al, 2003). En este estudio las ratas hembras con OBXn no muestran cambios en su peso (Anexo A) por lo que sugerimos que la OBXn en rata hembra tiene poco o ningún efecto sobre el peso corporal o en la

ganancia de peso debido a que la remoción de los BO no produce anosmia total (Flores et al., 2014).

En ratas adultas la remoción de BO provoca que las recién formadas neuronas receptoras olfativas envíen sus axones a través de la placa cribosa hacia grandes neuronas o hacia otras estructuras del cerebro lo que permite que el nervio olfatorio penetre en el sistema nervioso central para hacer conexiones funcionales que apoyen la detección y la discriminación de olores. Por el contrario, la ablación de BO en roedores neonatos resulta en un marcado desplazamiento del lóbulo frontal para llenar la cavidad vacía por la bulbectomía (Graziadei et al., 1979; Hendricks et al., 1994; Slonick et al., 2004). No obstante, eso no implica necesariamente que las conexiones que existen entre el bulbo olfatorio regenerado y el sistema límbico sean conexiones eficientes y por tanto son necesarios más estudios al respecto.

Por otra parte, algunos estudios han demostrado que la exposición a estrés durante la segunda semana de gestación provoca una reducción en la densidad de espinas en la CMPF y un incremento de esta variable en Nacc, además la separación materna incrementa la densidad de espinas en la CPF, en la corteza olfatoria y en el núcleo accumbens lo que indica que el cerebro es susceptible a los efectos del estrés pre o postnatal (Liston et al., 2006; Muhammad & Kolb, 2011). De acuerdo a esto, el tipo de anestesia y el cuidado materno resulta de gran importancia para la pronta recuperación de los eventos estresantes durante la cirugía, en este aspecto el cuidado post-cirugía de los animales fue estricto por parte del experimentador, lo que permitió una supervivencia del 30%. Sin embargo resulta importante considerar que de por sí el tratamiento experimental es agresivo y por tanto alguno de los resultados pudieran ser explicados como efecto de la hipotermia ya que este tipo de anestesia no es un método totalmente libre de riesgos (Dannman & Mandrell 1997) y genera estrés ya que activa al eje HPA y por tanto se promueve el incremento en la liberación de glucocorticoides que han sido nombrados como responsables de la disminución en la densidad de espinas dendríticas en hipocampo (Alexander et al., 2014).

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

Los presentes resultados muestran datos que sugieren plasticidad neuronal ya que los mecanismos de neuroplasticidad son múltiples, desde modificaciones morfológicas extensas como la regeneración de axones y la formación de nuevas sinapsis, hasta sutiles cambios moleculares (Poch, 2001). Por ejemplo, una lesión cerebral altera la organización sináptica del cerebro, y cuando hay mejoría funcional después de la lesión, existe una reorganización de los circuitos neuronales. Estos eventos pueden ser influenciados por varios factores, tales como el factor hormonal (Kolb & Gibb, 2011) ya que el hipocampo responde a hormonas de las gónadas, de la tiroides y de las glándulas suprarrenales, para modular la formación de sinapsis y la estructura dendrítica y para regular el volumen del giro dentado durante el desarrollo y en la vida adulta (McEwen, 1999). Resulta de interés considerar para futuras investigación el papel de los estrógenos en el efecto de la bulbectomía olfatoria puesto que el alcance del presente proyecto no permite sugerir que hay un efecto hormonal en la expresión de la morfología neuronal. Sin embargo, ha sido claramente expuesto que el estradiol modula la respuesta del tejido nervioso ante una lesión y participa en la reorganización del tejido nervioso denervado (McEwen & Alves, 1999; García-Segura et al, 2001).

Adicionalmente, entre la edad en que se realizó la OBXn y la edad en que se midieron las pruebas hay un lapso de tiempo, en el que se podrían expresar mecanismos de recuperación de los daños generados por la lesión.

8. CONCLUSIÓN

- La OBXn en ratas hembras no provoca alteraciones en la actividad locomotora ni en el aprendizaje y memoria espacial.
- La OBXn en la rata hembra provoca alteraciones drásticas en la morfología dendrítica de neuronas de hipocampo ni de corteza entorrinal.
- La OBXn provoca una reducción de la densidad de espinas dendríticas en las neuronas CA3.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander Morales Rico, Anayeli López Mendoza, Dolores Adriana Bravo Durán, Héctor de la Luz Torres, Guadalupe Arias Mendoza, and Adriana Berenice Silva Gómez. (2014). The effects of chronic restraint on the morphology of ventral CA1 neurons in female Long Evans rats. *The International Journal on the Biology of Stress*. 18(1), 67-75.
- Altman, J., (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*. 137:433-457.
- Alstott, J., Timberlake, W. (2009). Effects of rat sex differences and lighting on locomotor exploration of a circular open field with free-standing central corners and without peripheral walls. *Behavioral Brain Research*. 196:214-219.
- Altman, S.A. Bayer. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *Journal of Comparative Neurology*. 301(3):365-381.
- Amaral, D.G. & Lavenex P. (2007). *The hippocampus Book*. Cap.3. Oxford University Press. Primera edición. 37-89.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'keefe, J. (2007). *The hippocampus Book*. Oxford Neuroscience.
- Bartesaghi R, Migliore M, Gessi T. (2006) Input-output relations in the entorhinal cortex-dentate-hippocampal system: evidence for a non-linear transfer of signals. *Neuroscience*. 142:247-265.
- Berry B, McMahan R, Gallagher M. (1997). Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. *Behavior Neuroscience*. 111:267-274.
- Borhegyi Z, Leranth C. (1997). Distinct substance P- and calretinin-containing projections from the supramammillary area to the hippocampus in rats; a species difference between rats and monkeys. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*. 115:369-374.
- Bovetti, S., Gribaudo, S., Puche, A.C., De Marchis, S., Fasolo, A., (2011). From progenitors to integrated neurons: role of neurotransmitters in adult olfactory neurogenesis. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 304 (42)-316.

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Briones T.L., Klintsova, A.Y., Greenough, W.T. (2004). Stability of synaptic plasticity in the adult rat visual cortex induced by complex environment exposure. *Brain Research*.1018, (1).130-135.
- Brown M.C., Suzuki,S., Jelks, A.B.K.,Wise, M.P.(2009). Estradiol is a potent protective, restorative, and trophic factor after brain injury. *Seminars in Reproductive Medicine*. 27(3): 240-249.
- Brunjes PC, Smith-Crafts LK, McCarty R (1985) Unilateral odor deprivation: effects on the development of olfactory bulb catecholamines and behavior. *Brain Research*. 354(1): 1-6.
- Burwell, R. D., and Amaral, D. G. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Journal Comparative Neurology*. 398:179-205.
- Bylund D.B, Reed A.L. (2007). Childhood and adolescent depression: Why do children and adults respond differently to antidepressant drugs? *Neurochemistry International*. 51, 246-253.
- Caín, D.P. (1974).The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. *Psychological Bulletin*. 81:654-671.
- Carboni, S., Melis, F., Pani, L., Hadjiconstantinou, M. & Rossetti Z.L. (1990).The noncompetitive NMDA-receptor antagonist MK-801 prevents the massive release of glutamate and aspartate from rat striatum induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+).*Neuroscience*.117 (1-2): 129-33.
- Castaneda, A. Tuulio-Henriksson, M. Marttunen, J. Suvisaari, J. Lonnqvist. (2008). A review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults, *Journal Affective Disorder*. 106 (1-27).
- Chamber, R.A., Moore, J.P., McEvoy, E.D. (1996).Cognitive effects of neonatal hippocampal lesions in rat model of schizophrenia.*Neuropsychopharmacology*.15 (6).587-594.
- Chehrehasa F., John St J. Key B. (2006).The sorting behavior of olfactory and vomeronasal axons during regeneration. *Journal of Molecular Histology*.36:427- 436.
- Chen, C., Tonegawa, S., (1997).Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning and memory in the mammalian brain. *Annual Review of Neuroscience*. 20:157-184.
- Chrobak, J.J. & Buzsáki, G.(1994).Selective activation of deep layer (V-VI) retro hippocampal cortical neurons during hippocampal sharp waves in the behaving rat *.Journal Neuroscience*. 61(10): 60-70.

EFEECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Chrobak, J.J., Lorincz, A., & Buzsáki, G. (2000). Physiological patterns in the hippocamp-entorhinal cortex system. *Hippocampus*.10 (4): 457-65.
- Conrad C. D., LeDoux J. E., Magariños A. M., McEwen B. S. (1999). Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behavioral Neuroscience*.113 (5):902-913.
- Conrad C. D., McLaughlin K. J., Huynh T. N., El-Ashmawy M., Sparks M. (2012). Chronic stress and a cyclic regimen of estradiol administration separately facilitate spatial memory: relationship with hippocampal CA1 spine density and dendritic complexity. *Behavioral Neuroscience*.126 (1):142-156.
- Cotter D., Hudson, L., Landau S. (2005). Evidence for orbitofrontal pathology in bipolar disorder and major depression, but not in schizophrenia. *Bipolar Disorders*. 7(4), 358-369.
- Cramer, S.C., Mriganka, S., Dobkin, H.B., Brien, C.O., Sanger, D.T., Trojanowski, Q.J., Rumsey, M. J., Hicks, R., Cameron, J., Chen, D., Chen, G.W., Cohen, G.L., Charms, C., Duffy, J.C., Eden, F.G., Eberhard, E.F., Filart, R., Freund, M., Grant, J.S., Suzanne Haber, S., Peter, W., Kalivas, B., Arthur, F., Kramer, Lynch, M., Helen., Mayberg, S., Patrick, S., McQuillen., Nitkin, R., Leone, A.P., Lorenz, P.R., Schiff, N., Sharma, A., Shekim, L., Stryker, M., Sullivan, V.E., Vinogradov, S. (2011). Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain a journal of neurology*. 134: 1591-1609.
- Czeh, B. E. Fuchs, O. Wiborg, M. Simon. (2015). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 64:293-31.
- Dannman P. J.; Mandrell T. D. (1997). Evaluation of Five Agents /Methods or Anesthesia of Neonatal Rats. *American Association for Laboratory Animal Science*. 47(4), 386-395.
- D'Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*. 36:60-90.
- D'Sa C, Duman RS. (2002). Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disorder*.4:183-194.
- Doty, R. L. (2009). The olfactory system and its disorders. *Seminars in Neurology*. 29: 74-81.
- Ernst M, Pine DS, Hardin M. (2006). Triadic model of the neurobiology of motivated behavior in adolescence. *Psychological Medicine*. 36 (3):299-312.
- Fanselow, M.S., Dong, H.W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures. *Neuron*. 65(1) 7-19.

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Fleming, A., Rosenblatt, J. S., (1974). Effects of Olfactory Bulb Removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 86(2):221-232.
- Flores. G., Ibañez S, A., Silva G, A, B., Camacho A, A., Rodriguez M., Morales M,J,C., (2014). Neonatal olfactory bulbectomy enhances locomotor activity, exploratory behavior and binding of NMDA receptors in pre-pubertal rats. *Neuroscience*. 259, 84-93.
- Flores, G, Alquicer G, Silva-Gomez AB, Zaldivar G, Stewart J, Quirion R, Srivastava LK. (2005). Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience*. 133:463-470.
- Franks. KH, Chuah MI, King AE and Vickers JC. (2015). Connectivity of Pathology: The Olfactory System as a Model for Network-Driven Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis *Frontier in Aging. Neuroscience*. 7:234.
- García-Segura LM, Chowen JA, Párducz A, Naftolin F.(1994). Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Progress in Neurobiology*. 44:279-307.
- García-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*. 63:29-60.
- Germroth, P., Schwerdtfeger, W.K. & Buhl, E.H. (1991). Ultrastructure and aspects of functional organization of pyramidal and nonpyramidal entorhinal projection neurons contributing to the perforant path. *Journal of Comparative Neurology*. 305(2):215-31.
- Gibb, R. & Kolb B. (1997). A method for vibratome sectioning Golgi-Cox stained whole rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*. 79:1-4.
- Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT.. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *Journal Neuroscience*, 16(14), 4491-500.
- Graziadei, P. P. C., & Monti Graziadei, A. G. (1978). Continuous nerve cell renewal in the olfactory system. In M. Jacobsons (Ed.), *Development of sensory system*. (55–82).
- Graziadei, P. P. C., Levine, R. R., & Monti Graziadei, G. A. (1979). Plasticity of connections of the olfactory sensory neurons: Regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neuroscience*. 4:713-727.

EFEECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Grecksh G., Zhou D. & Franke C. Influence of olfactory bulbectomy and subsequent imipramine treatment on serotonin presynapses in the rat frontal cortex. 1997. *Brain Journal Pharmacology*. 122:1725-1731.
- Guthrie PB, Segal M, Kater SB. (1991). Independent regulation of calcium revealed by imaging spines dendritics. *Science*. 354:76-80.
- Haberly, L. B., and Price, J. L. (1978). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex in the rat. I. Systems originating in the Piriform cortex and adjacent areas. *Journal of Comparative Neurology*. 178, 711-740.
- Heimer, L., Wilson, R., (1975). The subcortical projections of the allocortex: Similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex, and the neocortex. In: Santini, M. (Ed.), *Persepectives in Neurobiology, Golgi Centennial Symposium*. Raven Press, New York. 177-193.
- Hercher, C., Turecki, G., Mechawar, N., 2009. Through the looking glass: examining neuroanatomical evidence for cellular alterations in major depression. *Journal of Psychiatric Research*. 43, 947-961.
- Hendricks, K. R., Knott, J. N., Lee, M. E., Gooden, M. D., Evers, S. M., & Westrum, L. E. (1994). Recovery of olfactory behavior. I. Recovery after a complete olfactory bulb lesion correlates with patterns of olfactory nerve penetration. *Brain Research*. 648: 121-133.
- Hendriksen, S.M. Korte, B. Olivier, R.S. Oosting. (2015). The olfactory bulbectomy model in mice and rat: one story or two tails? *Eur. J. Pharmacol*. 753:105-113.
- Holubova, K. L. Kleteckova, M. Skurlova, J. Ricny, A. Stuchlik, K. Vales. (2016). Rapamycin blocks the antidepressant effect of ketamine in task-dependent manner. *Psychopharmacology*. 233(11):2077-97.
- Holtmaat A., & Svoboda K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews. Neuroscience*. 10(9): 64-658.
- Ho, Y-J., Liu T-M., Tai M-Y., Wen, Z-H., Chow, S.S., Tsai Y-F. & Wong C, S. (2001). Effects of olfactory bulbectomy on NMDA receptor density in the rat brain [H] MK-801 binding assay. *Brain*. 900: 2214-218.
- Huether G., Zhou D. & Ruther E. Long-term modulation of presynaptic serotonin input: experimentally induces changes in cortical serotonin transporter density tryptophan hydroxylase and serotonin innervations density. *Journal of Neural Transmission*. 1997.
- Insausti R, Amaral DG. (2008). Entorhinal cortex of the monkey: IV. Topographical and laminar organization of cortical afferents. *Journal of Comparative Neurology*. 509:608-641.

EFEECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Jaako, M, K., Zharkovsky, T., Pedersen, M, & Zharkovsky. (2006). Decreased Hippocampal Neurogenesis Followin Olfactory Bulbectomy Repeated Citalopram Administration. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 26:1559-1570.
- Jay TM. (2009). Cellular plasticity and the pathophysiology of depression. In: Costa e Silva JA, Macher JP, Olie JP. *Neuroplasticity: New Biochemical Mechanisms*. London: Springer 41-55.
- Juraska, J.M., (1991). Sex differences in “cognitive” regions of the rat brain. *Psychophysiology and neuroendocrinology*. 16:105-119.
- Kalivas, P.W., Pierce, R.C. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews*. 25:192-216.
- Kandel, E., Schwartz, J., Siegelbaum, S., Hudspeth (2013) .A perception in *Principles of Neural Sciences*. Fifth edition. McGraw Hill. pp.712-726.
- Kelly, J, P. Wrynn A.S. & Leonad B.E (1997). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacology*. 74:299-316.
- Kim, J, J., Diamond, D, M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memory. *Nature*. 3: 453-462.
- Kolb B. (2005) .*Neurological Models in the behavior of the laboratory rat*. Whishaw IQ and Kolb B. Eds Oxford University Press. 457-458.
- Kolb, B., Gibb, R. (2011). Brain Plasticity and Behaviour in the Developing Brain. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 20(4):265-276
- Kolb B, Stewart J (1991) Sex-related differences in dendritic branching of cells in the prefrontal cortex of rats. *Journal Neuroendocrinology*. 3:95-99.
- Kolb B, Forgie M, Gibb R, Gorny G, Rowntree S (1998) Age, experience, and the changing brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 22:143-159.
- Kole M.H., Costoli T., Koolhass J.M., Fuchs E. (2004). Bidirectional shift in the cornu ammonis 3 pyramidal dendritic organization following brief stress. *Neuroscience*. 125 (2):337-47.
- Larue C, Le Magnen J. Modifications des séquences alimentaires et de la régulation calorique après ablation des bulbes olfactifs chez le Rat. *C R Hebd Séane Acad Sci Paris*. 1971; 272:90-93.
- Larue C. (1975). Prandial drinking and the disruption of meal patterns in olfactory bulbectomized rats. *Physiology & Behavior*. 15:491- 493.

EFEECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Larue C, Le Magnen J. (1967). Réponses alimentaires du rat anosmique. *C R Soc Biol.* 161: 572-576.
- Larue C, Le Magnen J. Effect of the removal of olfactory bulbs upon hyperphagia and obesity induced in rats by V.M.H. lesion. 1970(5) :509-513.
- Larue CG, Le Magnen J. The olfactory control of meal pattern in rats. *Physiology & Behavior.* 1972; 9:817- 821.
- Kosel, K. C., Van Hoesen, G. W., and West, J. R. (1981). Olfactory bulb projections to the parahippocampal area of the rat. *Journal of Comparative Neurology.* 198, 467-482.
- Lacalle S. (2006). Estrogen effects on neuronal morphology. *Endocrine.* 29 (2), 445-56.
- Lambert, K.G., Bukelew.S.K., Staffiso- Sandoz,G., Gaffga,S., Carpenter,W., Fischer.J., Kinsley,C.H. (1998). Activity-Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal neurons in male rats. *Physiology and Behavior* 65 (1): 43-49.
- Lavenex P, Amaral DG. 2000. Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus.*10:420-430.
- Lavenex P, Suzuki WA, Amaral DG. (2002). Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: projections to the neocortex. *Journal of Comparative Neurology.* 447:394-420.
- Le Magnen J. (1969). Peripheral and systemic actions of food in the caloric regulation of intake. *Annals of the New York Academy of Sciences.*157:1126-1157.
- Leuner B, Mendolia-Loffredo S, Shors TJ. (2004). High levels of estrogen enhance associative memory formation in ovariectomized females. *Psychoneuroendocrinology,* 29 (7), 883-90.
- Liston C, Miller MM, Godwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR, McEwen BS. (2006).Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *Journal of Neuroscience.* 26:7870-7874.
- Magariños A. M., McEwen B. S., Flügge G., Fuchs E. (1996). Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *Journal of Neuroscience.*16 (10) :3534-3540.
- Magariños A. M., McEwen B. S. (1995).Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience.* 69 (1):83-88.

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Marquis, J.P., Goulet, S., Dore, F.Y. (2006). Neonatal lesions of the ventral hippocampus in rats lead to prefrontal cognitive deficits at two maturational stages. *Neuroscience*.140:759-767.
- Martin, J.H. (1989).The gustatory and olfactory system.In: Martin,J.H.ed. *Neuroanatomy*. Ed. Elsevier Science Publishing Co.Inc. USA.396-405.
- Masini, P, V. Holmes, K.G. Freeman, A.C. Maki, G.L. (2004) .Dopamine overflow is increased in olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study .*Physiology Behavior*.81: 111-119.
- McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews*. 20:279-307.
- McEwen, Frankfurt, B, S., Kuroda, M., Magarinos, Y., McKittrck, A,M., Watanabe, C,Y. (1994).Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in depressive illness: Interactions between antidepressant, glucocorticoids, serotonin and excitatory amino acid. *Critical issues in the treatment of affective disorder*.Switzerland.75-81.
- McEwen BS (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosciense*. 22:105-122.
- McCollum AT, Nasr P, Estus S. (2002). Calpain activates caspase-3 during UV-induced neuronal death but only calpain is necessary for death. *Journal of Neurochemistry*. 82:1208-1220.
- Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Arroyo-Jimenez MM, Artacho-Perula E, Insausti AM, Marcos P, Cebada-Sanchez S,Martinez-Ruiz J, Munoz M, Blaizot X, Martinez-Marcos A, Amaral DG, Insausti R. (2007). Topographical and laminar distribution of cortical input to the monkey entorhinal cortex.*Journal of Anathomy*. 211: 250-260.
- Mohedano-Moriano A, Martinez-Marcos A, Pro-Sistiaga P, Blaizot X, Arroyo-Jimenez MM, Marcos P, Artacho-Perula E,Insausti R. (2008). Convergence of unimodal and polymodal sensory input to the entorhinal cortex in the fascicularis monkey. *Neuroscience* 151:255-271.
- Morales-medina, J.C., Juárez, I., Venencio-García, E., Cabrera, S.N., Menard, W.Yu W.,Flores G.,Mechawar N.,Quirion R.(2013a).Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat.*Neuroscience*. 236:233-243.
- Morales-medina, J.C., Juarez, I., Iannitti, T., Flores. (2013b). Olfactory bulbectomy induces neuronal rearrangement in the entorhinal cortex in the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 52, 80-86.

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Morris, R.G.M. (1984).Development of a Water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*.11, 47- 60.
- Moriguchi, S. F. Han, N. Shioda, Y. Yamamoto, T. Nakajima, O. Nakagawasai, T. Tadano, J.Z. Yeh, T. Narahashi, K. Fukunaga. (2009). Nefiracetam activation of CaM kinase II and protein kinase C mediated by NMDA and metabotropic glutamate receptors in olfactory bulbectomized mice. *Journal Neurochemistry*. 110 (1). 70-181.
- Moriguchi, S.N. Shioda, F. Han, T. Narahashi, K. Fukunaga. (2008). CaM kinase II and protein kinase C activations mediate enhancement of long-term potentiation by nefiracetam in the rat hippocampal CA1 region, *Journal Neurochemistry*. 106 (3):1092-1103.
- Muhammad A, Kolb B. (2011). Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. *Behavioral Brain Research*. 223:7-16.
- Muhammad A., Mychasiuk R., Hosain S., Nakahash A., Carroll C., Gibb R., Kolb B.(2013). Training on motor and visual spatial learning tasks in early adulthood produces large changes in dendritic organization of prefrontal cortex and nucleus accumbens in rats nicotine prenatally. *Neuroscience*. 252:178-189.
- Nakagawasai O, Hozumi S, Tan-No K, Niijima F, Arai Y, Yasuhara H, Tadano T. (2003). Immunohistochemical fluorescence intensity reduction of brain somatostatin in the impairment of learning and memory-related behaviour induced by olfactory bulbectomy. *Behavioral Brain Research*.142:63-67.
- Norrholm S.D.,Ouiment C.C.(2001).Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment.*Synapse*. 42: 151-163.
- Orłowski D., Elfving B., Müller H. K., Wegener G., Bjarkam C. R. (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.
- Pothuizen, H.H.,Zhang,W.H., Longen- Relo,A.L.,Feldon,J., Yee,B.K. (2004).Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-task comparison of reference and working spatial memory. *European Journal of Neuroscience*.1:705-112.
- Poch, O.M.L. (2001).Neurobiología del desarrollo temprano. *Contextos Educativos*.4:79-94.
- Pittenger C, Duman RS. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 33:88-109.
- Prendergast, B.J. Onishi KG. Zucker I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience Biobehavior*. 40:1-5.

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Primeaux SD, Barnes MJ, Bray GA. (2007). Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. *Behavior Brain Sci.* 180:190-196.
- Purves, D., Augustine, G., (2007). Sensibilidad y procesamiento .En *Neurociencia* 3a edición Panamericana. 369-389.
- Racekova, E., Orendacova, J. (2007). An olfactory bulbectomy model to study plasticity of the nervous system in rat: a review focused on published data from the slovak republic. *Intern. Journal of Neuroscience.* 117, 1067-1090.
- Ramon y Cajal S. *Histology of nervous system*, (Swanson N. Swanson L, translators). New York. Oxford University Press. 1904. 1905: 34-65.
- Redei E, Pare WP, Aird F, Kluczynski J. (1994). Strain differences in hypothalamic-pituitary-adrenal activity and stress ulcer. *The American Journal of Physiology.* 266:53- 60.
- Reznikov LR, Fadel JR, Reagan LP. (2009). Glutamate-mediated neuroplasticity deficits in mood disorders. In: Costa e Silva JA, Macher JP, Olie JP., editors. *Neuroplasticity: new biochemical mechanisms*. London. Springer. 13-26.
- Russell W. Brown. (2005). Adolescence. En *the behavior of the laboratory rat* (278-286). New York: Oxford University Press, Inc.
- Rutishauser U, Landmesser L. (1996). Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends in Neurosciences.* 19:422-427.
- Sandi C., Davies H. A., Cordero M. I., Rodriguez J. J., Popov V. I., Stewart M. G. (2003). Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training. *European Journal of Neuroscience.* 17 (11):2447-2456.
- Sachar, E.J. (1985). Disorders of feeling: Affective diseases. Kandel, E.R. & J.H. Schwartz, eds. *Principles of neural science*. Elsevier Science Publishing Co., Inc. USA. Chap. 54. 717-725.
- Schwartz, S.P., Coleman, P.D. (1981). Neurons of origin of the perforant path. *Experimental Neurology.* 74:305-312.
- Stock HS, Ford K, Wilson MA. Gender and gonadal hormone effects in the olfactory bulbectomy animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 67:183-191.
- Segupta P. 2013. The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine.* 4: 624-630.

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Semjidsuren GU, Im GJ, Lee SH, Park SJ, Hwang HY, et al. (2008) Differential gene expression profiles of the olfactory bulb after nasal obstruction in neonatal rats. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 138(5): 648-654.
- Silva-Gómez A.B. Modelos animales de enfermedades Mentales: I Esquizofrenia. Lesión de hipocampo ventral y/o corteza media prefrontal. II Depresión infantil. Ablación de bulbos olfatorios. Tesis de Maestría en ciencias Fisiológicas, Instituto de Fisiología, Benemerita Universidad Autonoma de Puebla. 1998.
- Shipley, M.T., Ennis, M., & Puche, A.C. (2004). Olfactory system. Cap 29. The rat nervous system. Tercera edición. 923-939.
- Sholl DA. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices on the cat. *The Journal Anatomic.* 87:387-406.
- Sieck MH (1972). The role of the olfactory system in avoidance learning and activity. *Physiology & Behavior.* 8:705-710.
- Skelin, I., Sato, H., Diksic, M. (2008). Olfactory bulbectomy reduces cerebral glucose utilization: 2-[¹⁴C] deoxyglucose autoradiographic study. *Brain Research Bulletin.* 76 (5):485-492.
- Slotnick, B., Cockerham, R., & Pickett, E. (2004). Olfaction in olfactory bulbectomized rats. *The Journal of Neuroscience.* 24, 9195-9208.
- Soria C.F., M.I. Pérez Vega. (2012). Participación de las proteínas de unión a la actina y vías de señalización asociadas a la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas. *Neurología.* 27(7), 421-431.
- Spruston N, McBain C. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus Book.* New York: Oxford University Press; 2007. Structural and functional properties of hippocampal neurons.
- Song, C., Leonard, B, E (2005). The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neuroscience Biobehavior.* 29:627-647.
- Sunanda B.L., Meti, T.R. Raju. (1997). Entorhinal cortex lesioning protects hippocampal CA3 neurons from stress-induced damage. *Brain Research.* 770:302-30.
- Stewart M. G., Davies H. A., Sandi C., et al. (2005). Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: a three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience.* 131(1):43-54
- Torrealba F., Valdés JL. (2008). The parietal association cortex of the rat. *Biological Research,* 41(4), 369.

EFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Torres-de la Luz, H. Efecto de la bulbectomía olfatoria bilateral en ratas neonatas, sobre actividad locomotora, memoria espacial, y la morfología dendrítica de hipocampo y corteza entorrinal dorsal. Tesis de Licenciatura en Biología. Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2012.
- Tropp J, Markus EJ.(2001). Sex differences in the dynamics of cue utilization and exploratory behavior. *Behav Brain Res.*119:143-54.
- Tsien JZ, Huerta PT., Tonegawa, S., (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor- dependent synaptic in spatial memory .*Cell.* 87: 1327-1338.
- Suzuki WA, Amaral DG. (1994).Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. *Journal Neuroscience.*14:1856-1877.
- Van Hoesen G, Pandya DN. (1975). Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey.Temporal lobe afferents. *Brain Research.* 95:1-24.
- Van Hoesen GW, Pandya DN, Butters N. (1972). Cortical afferents to the entorhinal cortex of the Rhesus monkey. *Science.*175:1471-1473.
- Vernotica, E.M. & Morrell, J.I. (1998). Plasma cocaine levels and locomotor activity after systemic injection in virgin and in lactating maternal female rats. *Physiol. Behav.* 64 (3), 399-407.
- Vertes RP, McKenna JT. (2000). Proyecciones derivadas del núcleo supramammillary al tabique medial y el hipocampo. *Sinapsis.* 38: 281-293.
- Vieyra-Reyes P., Mineur Y. S., Picciotto M. R., Tunez I., Vidaltamayo R., Drucker-Colin R. (2008). Antidepressant-like effects of nicotine and transcranial magnetic stimulation in the olfactory bulbectomy rat model of depression. *Brain Research Bulletin.* 77:13-18.
- Walker, Q.D., Cabassa, J., Kaplan, K. A., Li, S-T., Haroon, J., Spohr, H. A & Kuhn, C.M. (2001). Sex differences in cocaine- stimulated motor behavior: disparate effects of gonadectomy. *Neuropsychopharmacology.*25:118-130.
- Wang D, Noda Y, Tsunekawa H, Zhou Y, Miyazaki M, Senzaki K, Nabeshima T. (2007) Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety. *Behavior Brain Research.*178:262-273.

EFFECTO DE LA BULBECTOMÍA OLFATORIA NEONATAL EN LA MORFOLOGÍA DENDRÍTICA DE HIPOCAMPO Y CORTEZA ENTORRINAL DE RATA HEMBRA

- Witter, M, P., & Amaral, D, G. (1991). Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *Journal of Comparative Neurology*. (3): 437-59.
- Willner, P., (1990) .Animal models of depression: an overview. *Pharmacology*. 45:425-455.
- Woolley, C.S., McEwen, B. S. (1993). Roles of estradiol hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *Journal Comparative Neurology*. 336, 293-306.
- Woolley, C.S., McEwen, B.S. (1994). Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *Journal Neuroscience*. 14, 7680-7687.
- YouRong Sophie Su, Anand Veeravagu, Gerald Grant. (2016). Chapter 8. Neuroplasticity after Traumatic Brain Injury. En *Translational Research in Traumatic Brain Injury* (163-179). USA: Boca Raton (FL).
- Zafar HM, Pare WP, Tejani-Butt SM. (1997). Effect of acute or repeated stress on behavior and brain norepinephrine system in Wistar-Kyoto (WKY) rats. *Brain Research Bulletin*. 44: 289-95.
- Zhang S.J., Ye J., Couey J.J., Witter M., Moser E.I., Moser M.B. (2013). Functional connectivity of the entorhinal-hippocampal space circuit. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 369 (1635).
- Zueger, M. A. Urani, S. Chourbaji, C. Zacher, M. Roche, A. Harkin, P. Gass. (2005). Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. *Neuroscience Letters*. 374 (2). 142-146.

ANEXO A

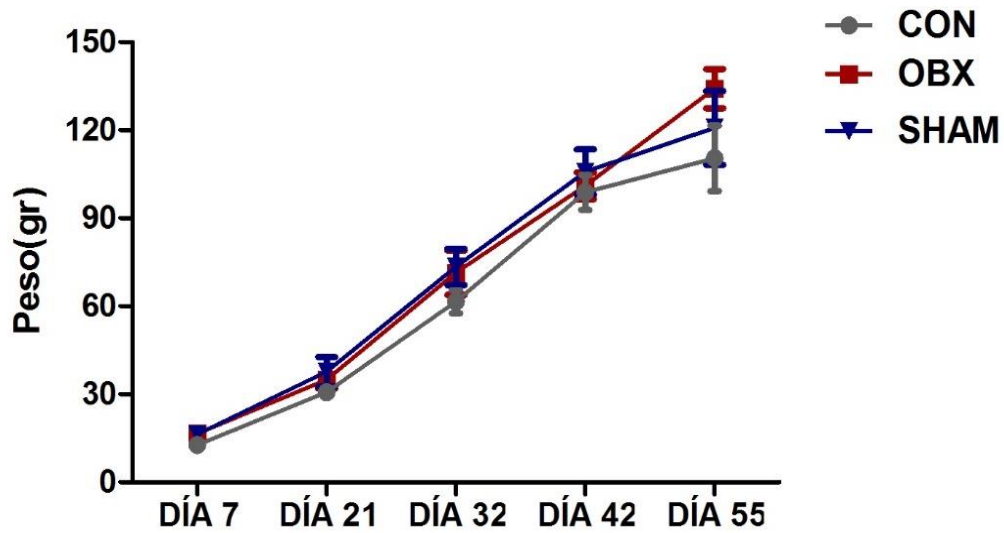


Figura 29. Pesos de ratas hembra con OBXn. En la gráfica se muestran los pesos de los grupos en diferentes días postnales