



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS

Estudio de la morfología neuronal de la región CA3 dorsal y CA3 ventral de hipocampo de ratas sometidas a estrés crónico por restricción de movimiento: posible dimorfismo sexual.

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGA

PRESENTA:

Guadalupe Arias Mendoza

Directora:

Dra. Adriana Berenice Silva Gómez



JUNIO 2015

Dedicatoria

Dedico esta tesis al amigo cálido que con sus brazos me abrigaba, al amigo callado que en silencio y con atención me escuchaba, aquél que con una sonrisa tan sincera me alegraba; al amigo tierno y fiel que con el corazón siempre su cariño me entregaba, aquél que sabía estar en el lugar indicado, a la hora precisa para decir las palabras correctas en momentos de duras penas. Aquel amigo que extraño su presencia por que a diario mi alma sufre su ausencia física y que aun con su ausencia física sigue estando presnete.....

¡¡¡Al amigo que fue mi todo y confió en mí!!!

Alan González Osorio

Agradecimientos

*En primer lugar quiero agradecerle al pilar de mi vida; a la que algunas veces es mi amiga, otras mi confidente, pero siempre mi **Madre**; gracias por tu apoyo incondicional, por todas esas desveladas que pasabas conmigo y por todas esas tazas de café... por todas esas palabras de fortaleza cuando ya no podía, por hacer que no renunciara a este sueño y siguiera hasta el final, por tu amor, gracias por TODO, sabes que sin ti jamás lo hubiera logrado. Gracias **Isa**.*

*A los Arias Rojas: A **Adriano** que en todo momento a estado con migo y que aun con esos silencios sé que tengo tu apoyo incondicional; A mi cuñada **Liz**, por esas develadas de acompañamiento, por su interés y su apoyo en toda esta etapa; por darme ánimos. Al niño de mis ojos: **Santi** que siendo tan pequeño y con tan sola unas horas de nacido me robo el corazón, por devolverle la alegría a mi vida, y por todas esas sonrisas...A **Ale**: por esas esas ocurrencias tan únicas de ella.*

*A mi sobrina **Mónica**: que siempre está presente a pesar de la distancia.*

*A los Arias Sánchez: A mi hermano **Enrique** y mi cuñada **Isela** por su cariño y apoyo.*

*A **Miguel MG**: por todo su apoyo*

*A la **Dra. Berenice Silva Gómez**: muchas gracias Profa. por toda la confianza, paciencia, orientación y por el gran apoyo para poder lograr todo esto. Un ejemplo digno a seguir tanto como mujer como profesionalista.*

*A la **M. en C. Montserrat Vázquez Balbuena**: gracias Profa. por todas esas buenas observaciones para esta tesis, por su buena enseñanza y sus consejos.*

*A la **Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna**: por su tiempo, sus observaciones y su disposición para esta tesis.*

*A todos aquellos biólogos que coincidimos en clases y en este sueño, en especial a **Ana Lilia BN**: por su apoyo cuando más lo necesité y por darme los ánimos que necesitaba y hacerme saber que seguía viva... y a **Francisco HR** de los cuales me llevo una amistad incondicional.*

*A la que siempre a esta ahí con su amistad y apoyo incondicional. **Fátima** y por aguantar mis ausencias en fiestas, cafés, etc....*

*A todos los chav@s de laboratorio de neurofisiología experimental: por todas sus observaciones, su apoyo y compañía pero especialmente a **Adriana Bravo**: por su apoyo, su disposición y por su aporte a esto con sus conocimientos. Sin tu ayuda me hubiera vuelto loca Adry....*

Índice

Glosario de abreviaturas	1
Resumen	3
Introducción	4
Hipocampo	4
División de hipocampo dorsal y ventral	5
Circuito trisináptico del hipocampo	6
Células piramidales CA1	10
Células piramidales CA3	10
Dendritas apicales	11
Dendritas basales	12
Espinas dendríticas.....	12
Estrés.....	13
Efectos del estrés al nivel de SNC.....	14
Efectos del estrés en la morfología de neuronas CA3.....	15
Aprendizaje y memoria espacial	16
Efectos del estrés en el aprendizaje y memoria espacial.....	18
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivo General	21
Objetivos particulares	21
Material y métodos	22
Experimento1	22
Material biológico	22
Estrés por restricción de movimiento	22
Obtención de tejido y tinción de Golgi-Cox.	23
Análisis morfológico	24
Análisis estadístico.	25
Experimento 2	26
Aprendizaje y memoria espacial	26
Análisis estadístico	27

Resultados	28
Experimento 1	28
Neuronas CA3 de hipocampo dorsal.....	28
• Árbol dendrítico basolateral	30
• Árbol dendrítico Apical.....	32
Neuronas CA3 del hipocampo ventral	34
• Árbol dendrítico basolateral	36
• Árbol dendrítico Apical.....	38
Experimento 2	40
Aprendizaje y Memoria.....	40
Discusión	44
Conclusiones	49
Bibliografía	50
ANEXO 1	62
Tabla 1	62
Tabla 2	63

Glosario de abreviaturas

- ACTH: hormona corticotropina
- CRH: hormona liberadora de corticotropina
- DG: giro dentado
- E: este
- GC: receptores de glucocorticoides
- HC: hembra control
- HE: hembra estresada
- HPA: hipotálamo-pituitario-adrenocortical
- MC: macho control
- ME: macho estresado
- MR: receptores de mineralocorticoides
- N: norte
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- O: oeste
- PVN: núcleo para ventricular
- POMC: proopiomelanocortina
- S: sur
- SO: estrato oriens

- SLM: estrato lacunosum-moleculare
- SR: estrato radiatum
- SP: estrato piramidal
- LC:Locus Coeruleus
- LAM: Laberinto Acuático de Morris
- SNS:sistema nervioso simpático

Resumen

Se entiende por estrés toda demanda física o psicológica inhabitual que provoca un estado de ansiedad. Estudios en roedores han demostrado que el estrés induce remodelación dendrítica de las neuronas piramidales CA3 del hipocampo dorsal, que se caracteriza por el acortamiento reversible y la desramificación de las dendritas apicales; además el estrés promueve una disminución de la neurogénesis del giro dentado. En este trabajo se analizó la morfología de neuronas CA3 de hipocampo dorsal y ventral y la memoria espacial de ratas sometidas a estrés crónico por restricción de movimiento. Se utilizaron 24 ratas adultas (lote 1), 12 machos y 12 hembras con las cuales se formaron 4 grupos: 1. MC (machos control), 2. ME (machos estresados), 3. HC (hembras control) y 4. HE (hembra estresada) con una n=6 cada grupo. Las ratas de los grupos ME y HE fueron introducidas en cajas de restricción de movimiento por 6 horas diarias, durante 21 días, para inducir estrés crónico; los grupos control no sufrieron ninguna manipulación. Para la prueba de aprendizaje y memoria espacial, se utilizaron también 24 ratas adultas (lote 2), divididas y manipuladas de la misma forma descrita arriba. Un día después del periodo de restricción, los animales del lote 1 fueron anestesiados para extraer el cerebro el cual permaneció en solución Golgi-Cox por 14 días en obscuridad absoluta, después se cambió la solución por sacarosa al 30%, donde permanecieron por 2 días. Se hicieron cortes coronales de 200 μm los cuales fueron revelados y fijados con resina. De la región CA3 dorsal y CA3 ventral se obtuvieron dibujos de las neuronas piramidales con ayuda de una cámara lucida y un microscopio DME Leica. A los dibujos se les aplicó el análisis de Sholl para medir la arborización y la longitud dendrítica, también se midió la densidad de espinas dendríticas. A los animales del segundo lote, se les aplicó la prueba de aprendizaje y memoria espacial mediante el laberinto acuático de Morris después del periodo de restricción. Se observó que el árbol dendrítico basolateral de las neuronas CA3 de hipocampo dorsal e hipocampo ventral de ratas hembra estresadas es afectado con una disminución en su longitud. Estas mismas ratas mostraron déficit en el aprendizaje espacial. Los machos no mostraron cambios ni en la morfología ni en la prueba de memoria espacial.

Introducción

Hipocampo

El hipocampo es el tejido cerebral que ha mostrado poseer una gran plasticidad neuronal. Es un área relacionada con la corteza cerebral que se ubica al interior del lóbulo temporal. Se le considera una invaginación de la arquicorteza, producida por la formación de la fisura del hipocampo, la que empuja a la arquicorteza (hipocampo) para que haga una prominencia en el piso del cuerno inferior (figura 1). Tiene una longitud de aproximadamente 3.5 a 4 cm. Se han identificado dos grandes regiones dentro del hipocampo. La región dorsal que se encuentra hacia la parte frontal del cerebro y la región ventral que se ubica en la parte media y hacia la región caudal del cerebro. Las funciones regionales específicas del hipocampo se asocian con el tipo de evento; el hipocampo ventral se ha relacionado con la memoria de miedo y el aprendizaje de rechazo, mientras que el hipocampo dorsal cumple con un papel crítico en el aprendizaje y en la memoria del entorno (Ziegler y Herman, 2002; Calfa *et al.*, 2007).

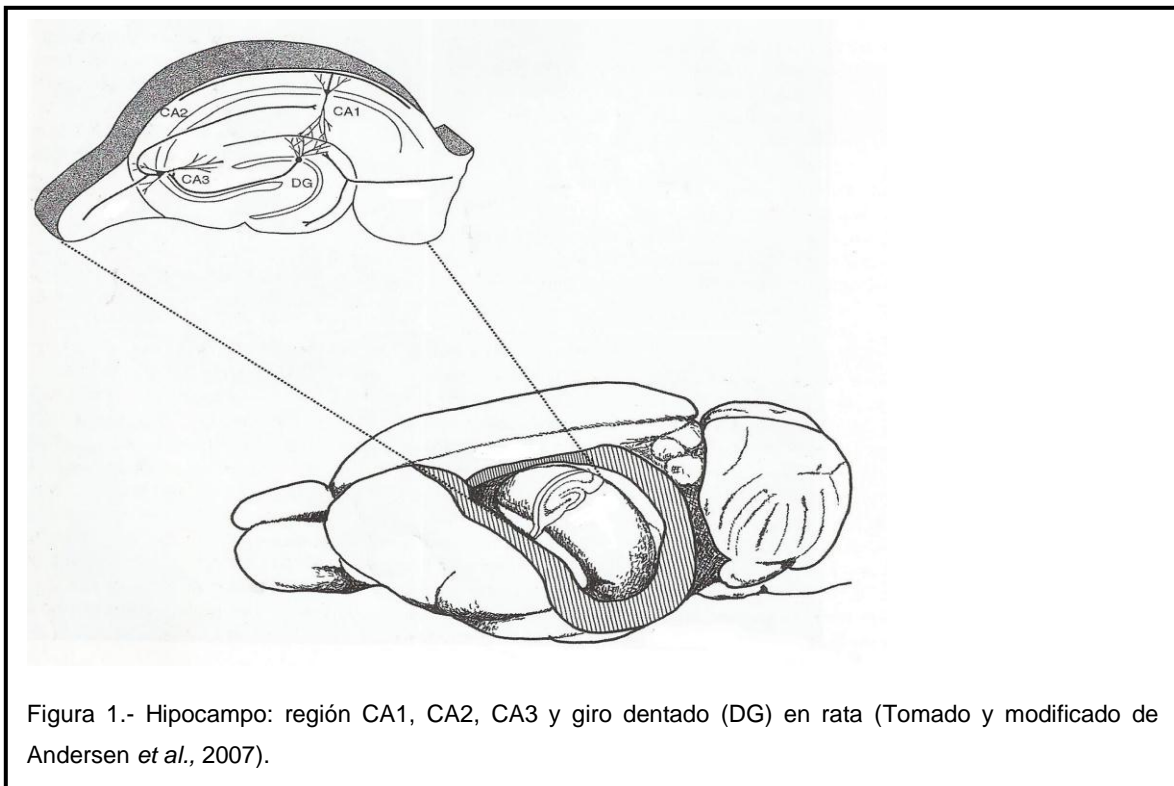
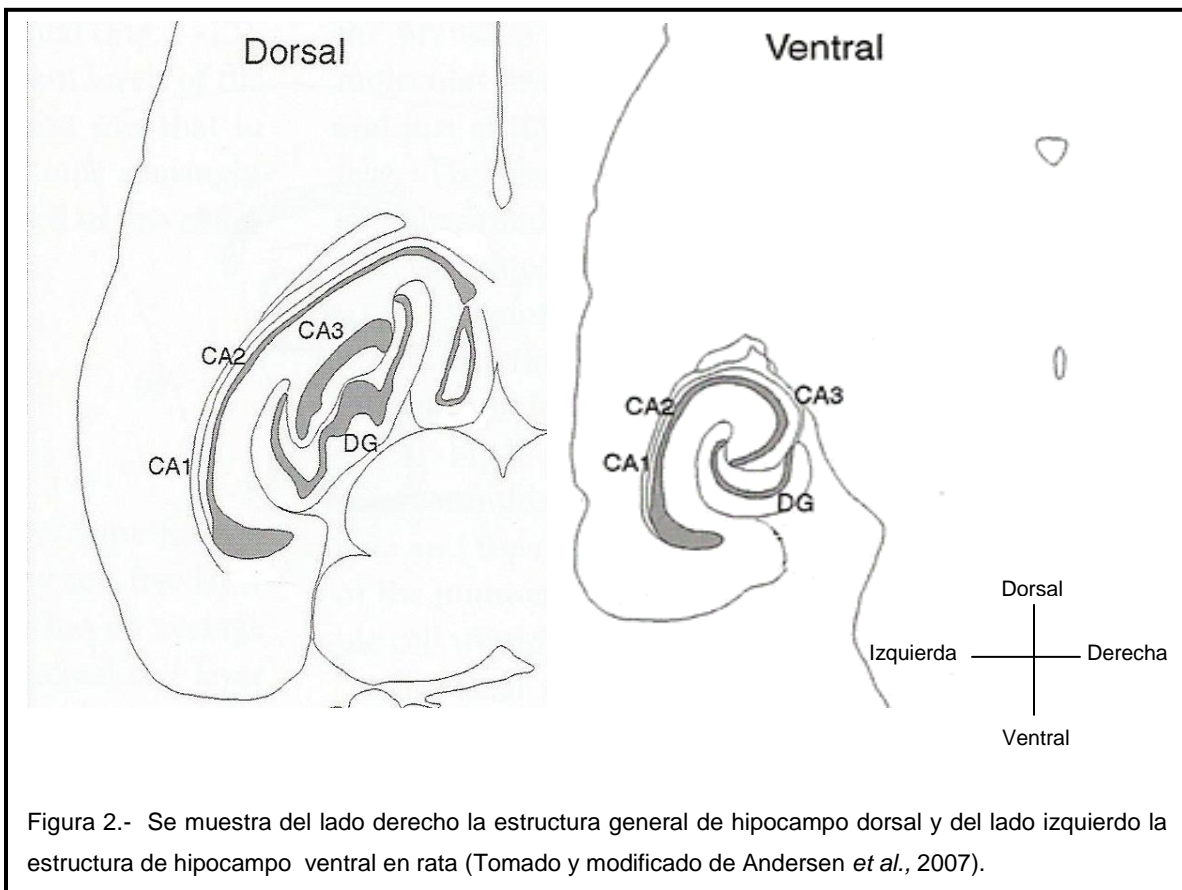


Figura 1.- Hipocampo: región CA1, CA2, CA3 y giro dentado (DG) en rata (Tomado y modificado de Andersen *et al.*, 2007).

División de hipocampo dorsal y ventral

Las proyecciones aferentes y eferentes del hipocampo se encuentran organizadas en el eje longitudinal (figura 2). La principal aferencia, la corteza entorrinal, inerva con su banda dorso-lateral al hipocampo dorsal y la banda ventro-medial a la región ventral del hipocampo (Amaral y Witter, 1989).



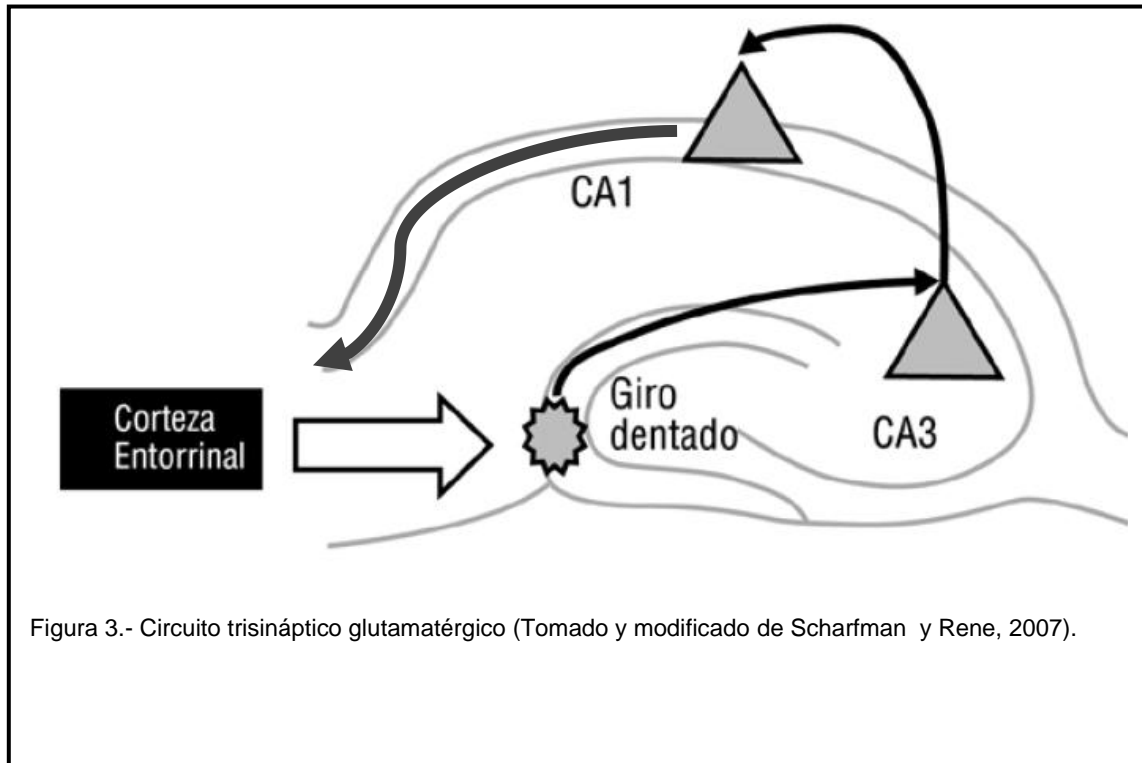
Estas bandas presentan diferente conectividad: mientras que la región que proyecta al hipocampo dorsal recibe proyecciones de la neocorteza, la región que proyecta al hipocampo ventral recibe aferentes de núcleos subcorticales, como la amígdala (Dolorfo y Amaral, 1998a; Dolorfo y Amaral, 1998b). También hay conexiones directas entre el hipocampo ventral y la corteza prefrontal, la amígdala, el hipotálamo y otros núcleos subcorticales, que son ausentes en la región más dorsal del hipocampo (Verwer *et al.*, 1997; Pitkanen *et al.*, 2000; Kishi *et al.*, 2006;

Cenquizca y Swanson, 2006) lo cual contribuye a la marcada diferencia anatómica y funcional que caracteriza al eje longitudinal del hipocampo.

De acuerdo con la segregación estructural mencionada previamente, el hipocampo se diferencia funcionalmente en su eje longitudinal, siendo la región dorsal la más involucrada en el procesamiento espacial y la región ventral en los procesos de ansiedad y control inhibitorio del comportamiento (Bast y Feldon, 2003; Bannerman *et al.*, 2004). Estas diferencias favorecen la idea de una segregación funcional, con posibilidad de múltiples representaciones de un mismo evento a lo largo del eje dorso-ventral. La capacidad de codificar diferentes estímulos con una única representación topográfica a lo largo del eje longitudinal del hipocampo proporciona un re-acceso a las diferentes regiones de la neocorteza asociadas con cada estímulo *a posteriori*. Esto sugiere que el hipocampo podría actuar como una zona de convergencia de datos codificados en zonas anatómicamente distantes en la neocorteza, contribuyendo a su activa asociación.

Circuito trisináptico del hipocampo

El circuito principal del hipocampo se origina en la corteza entorrinal, que proyecta a través de la vía perforante al giro dentado. Desde allí, los axones de las células granulosas contactan con las neuronas piramidales de CA3 y éstas a su vez con las de CA1 finalizando el circuito en la corteza entorrinal. Este circuito, mediado fundamentalmente por el glutamato, regula las funciones cognitivas como el aprendizaje, memoria y emoción (figura 3) de los individuos.



El hipocampo también se divide en diferentes áreas, las cuales son: CA1, CA2, CA3 y CA4, y en las cuales se expresan neuronas piramidales denominadas de acuerdo a la región en la que se encuentran.

El hipocampo ha sido dividido en zonas y áreas de las cuales se han llegado a describir 7 capas o estratos celulares (Issason, 1982; Amaral *et al*, 2007):

❖ Estrato Piramidal (SP)

Está constituido por células piramidales grandes y pequeñas. De acuerdo al tamaño de las neuronas piramidales existe un estrato denso que es el más superior y que está formado por neuronas piramidales de pequeño tamaño y un estrato menos denso, que está ubicado un nivel más abajo y de neuronas piramidales de mayor tamaño. Solamente las neuronas de este estrato envían sus prolongaciones fuera del hipocampo, de tal manera que las únicas neuronas que están respondiendo a los estímulos que llegan al hipocampo son ellas. Sus

axones van a constituir el álveo y la fimbria, por lo tanto se puede decir que la célula piramidal es una neurona principal o extrínseca, en cambio, las neuronas de los otros dos estratos son neuronas intrínsecas, por el hecho de que sus axones van a dirigirse a hacer sinapsis con las prolongaciones y con las dendritas de las células piramidales, formándoles una especie de canasta alrededor, cuyo papel es liberar un neurotransmisor inhibitorio.

❖ **Estrato oriens (SO)**

Es la región infrapiramidal en la que hay algunas de las conexiones asociativas de CA3 a CA3 y de CA3 a CA1

❖ **Estratum lucidum (SL)**

Está localizado en la parte superior de CA3, pero no sobre CA1 y CA2; es una zona a celular estrecha, presenta un engrosamiento en su extremo distal, donde por lo menos a nivel septal del hipocampo, las fibras musgosas se curvean temporalmente y viajan en sentido longitudinal. Marca la frontera entre CA3 y CA2.

❖ **Estrato radiatum (SR)**

Definido como la región supra piramidal en donde se pueden encontrar conexiones asociativas de CA3 a CA3 y de CA3 a CA1, además de conexiones que involucran las colaterales de Schaffer.

❖ **Estrato lacunosum- moleculare (SLM)**

Es la capa más superficial del hipocampo, en esta capa es donde las fibras de la corteza entorrinal terminan. Aferencias de otras regiones como el núcleo reuniens de la línea media del hipotálamo también alcanzan como punto final en esta capa.

❖ **Alveus**

En su mayor parte es de materia blanca de los axones de las células piramidales profundas del hipocampo y de otras regiones.

❖ Zona epitelial

Es la capa que se extiende a lo largo de los ventrículos para separarlos del hipocampo.

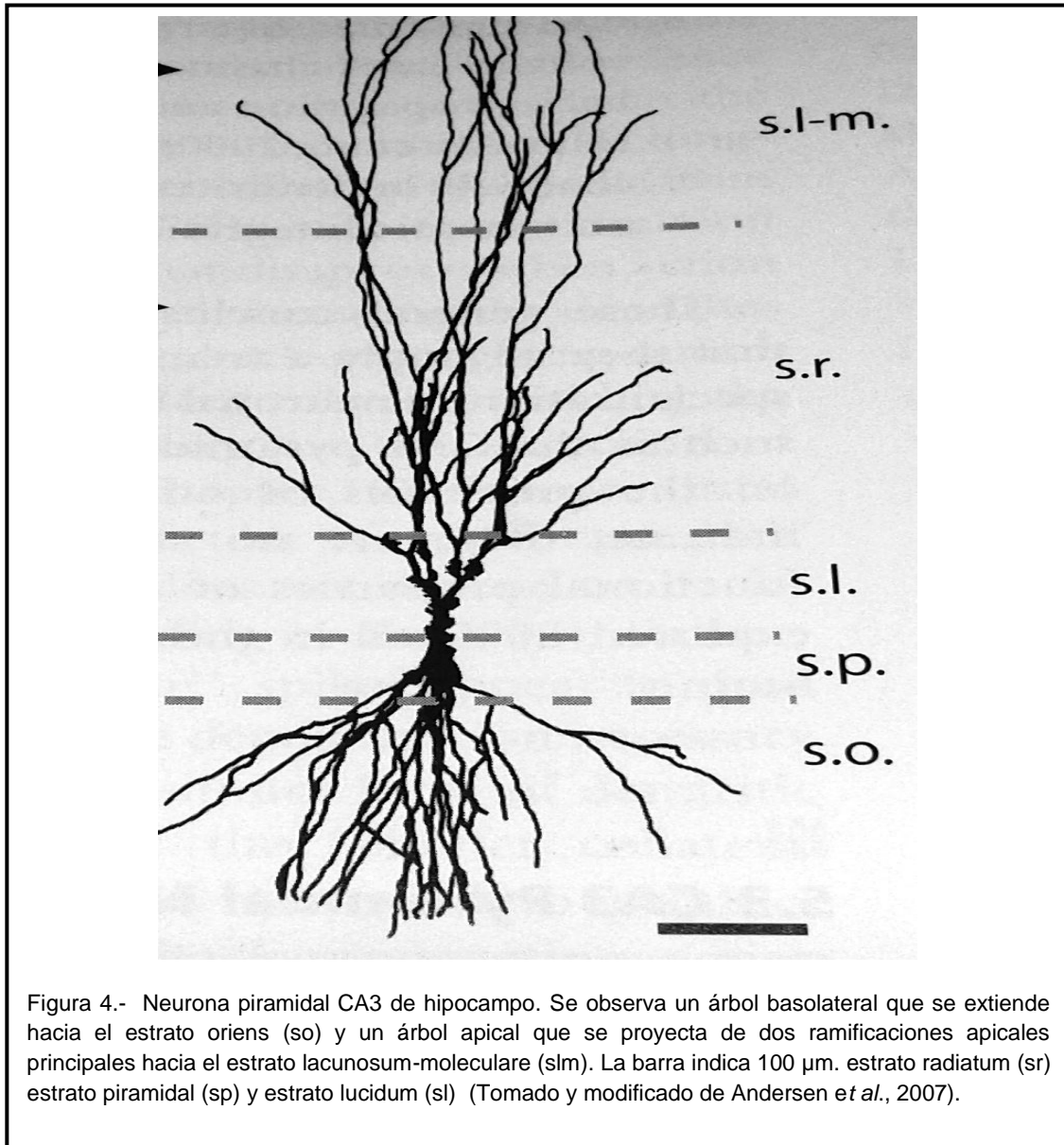


Figura 4.- Neurona piramidal CA3 de hipocampo. Se observa un árbol basolateral que se extiende hacia el estrato oriens (so) y un árbol apical que se proyecta de dos ramificaciones apicales principales hacia el estrato lacunosum-moleculare (slm). La barra indica 100 µm. estrato radiatum (sr) estrato piramidal (sp) y estrato lucidum (sl) (Tomado y modificado de Andersen *et al.*, 2007).

El hipocampo también se divide en diferentes áreas, las cuales son: CA1, CA2, CA3 y CA4 (figura 1), y en las cuales se expresan neuronas piramidales denominadas de acuerdo a la región en la que se encuentran.

Células piramidales CA1

Estas neuronas piramidales tienen un soma en forma de pirámide del cual emergen un árbol dendrítico apical y un árbol dendrítico basolateral; estos dos árboles ocupan un volumen cónico. El tamaño de estos árboles depende de la edad y la especie. La longitud combinada de todas las ramas dendríticas de CA1 es de alrededor de 12.0 y 13.5 mm. Las dendritas basolaterales se encuentran en el estrato oriens y las dendritas apicales se localizan en el estrato lacunosum-moleculare. En rata las dendritas basolaterales representan alrededor del 40%, y las dendritas apicales alrededor del 24% del volumen dendrítico total. (Bannister y Larkman, 1995; Isisuka *et al.*, 1995; Trommald *et al.*, 1997; Megias *et al* 2001.)

Células piramidales CA3

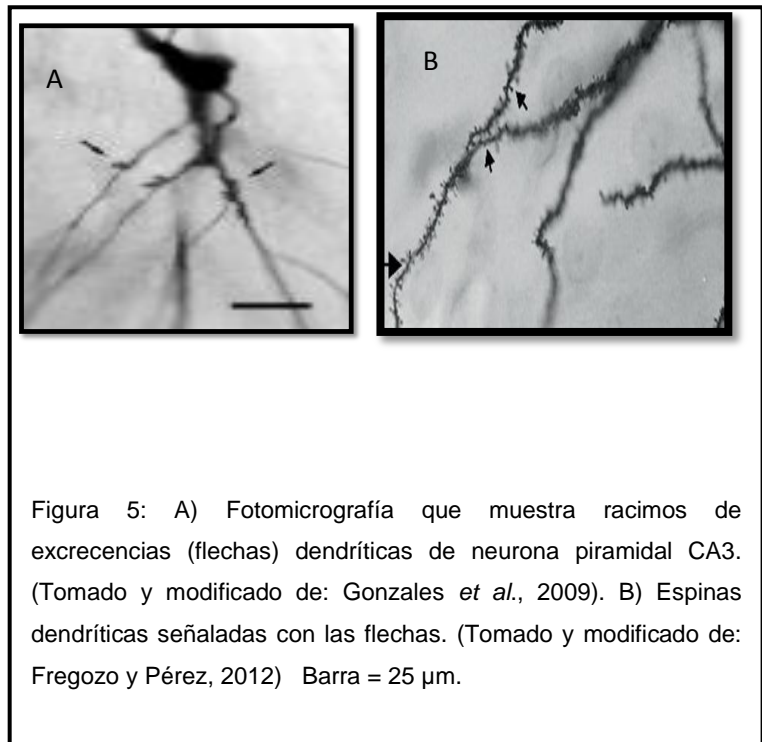
Las células piramidales tienen un árbol dendrítico basal que se extiende a la fisura del hipocampo (Ishizuka *et al.*, 1995). La longitud dendrítica y la organización de las células piramidales CA3 son bastante variables.

Las células más pequeñas, con un soma de 300 μm o 20 μm de diámetro, se encuentran en los miembros de la circunvolución dentada y tienen una longitud dendrítica total de 8 a 10 mm. Las células más grandes, con un tamaño de soma de alrededor de 700 μm de diámetro, tienen longitudes dendríticas totales de 16 a 18 mm. La distribución de los árboles dendríticos de las células piramidales CA3 situadas en las extremidades de la circunvalación dentada, por ejemplo, tiene pocas o ninguna de sus dendritas que se extienden en el estrato lacunosum-

moleculare (figura 4) y por lo tanto estas células reciben poca o ninguna entrada directa desde la corteza entorrinal. Sin embargo, las células reciben mayor número de terminales de fibras musgosas sobre sus árboles dendríticos apical y basal y están por lo tanto bajo una mayor influencia de las células granulares.

Las neuronas poseen espinas dendríticas, en las neuronas piramidales CA3 se encuentran dos tipos de espinas (figura 5)

1. Excrecencias: las cuales se encuentran en el estrato lucidum.
2. Espinas dendríticas que se encuentran sobre todas las dendritas y son más densas en la parte apical.



Dendritas apicales

Una sola dendrita apical emerge desde el vértice del soma piramidal. En la mayoría de los casos la dendrita apical primaria se extiende por varios cientos de micras antes de ramificarse para formar un penacho apical, que consta de las dendritas que se ramifican un par de veces antes de terminar. En algunos casos la dendrita apical primaria se bifurca para formar dos dendritas apicales principales. Las dendritas apicales primarias dan origen a varias ramas oblicuas,

que normalmente se ramifican una o dos veces. En algunos casos la dendrita apical primaria se bifurca más cerca del soma, dando lugar a dendritas apicales dobles, cada uno dando lugar a varias ramas oblicuas.

Las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo reciben entradas de fibras musgosas, que forman sinapsis con las excrescencias; mientras que las fibras de la corteza entorrinal y fibras de la comisura forman sinapsis en las partes distales de las dendritas apicales (Ishisuka *et al.*, 1995).

Dendritas basales

Las dendritas basales reciben aportaciones de ramas colaterales de fibras musgosas (Frotscher 1985; Moore 1975; O'Keefe, 1978). Visto desde abajo, el árbol dendrítico basal parece muy similar en su forma a una neurona estrellada (Elston y Rosa, 1998). Una dendrita principal basal emerge desde el vértice del soma piramidal.

Espinas dendríticas.

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias espinosas sobre las dendritas, cuya función principal es ampliar la entrada sináptica de las neuronas del hipocampo, la corteza cerebral y otras regiones (Sunanda *et al.*, 1995). La densidad de excrescencias y el área ocupada por ellas están sujetas a cambios dependientes de una variedad de factores tales como la desnutrición (Schoreiter *et al.*, 2000), las hormonas (Mohapel *et al.*, 1997), el estrés (Sterkubg *et al.*, 1988) y el aprendizaje.

La forma de las espinas está vinculada con el arreglo de actina dentro de los microfilamentos de las fibras del citoesqueleto (Callard y Chan, 1975). Las espinas

dendríticas y las excrescencias son afectadas por los glucocorticoides y por el estrés, lo que produce la activación de los receptores tipo NMDA (N-metil-D-asparta) que inician los cambios en la proteína actina para cambiar la estructura del citoesqueleto, que estabiliza la sinapsis (Butler *et al.*, 1969).

Las espinas dendríticas tienen como propósito constituir el principal *locus* de las modificaciones sinápticas a largo plazo asociadas con la plasticidad funcional en el hipocampo (Tzintli y Jacinto, 2009). Estas espinas sufren un cambio reversible a diferentes efectores como lo es el estrés.

Estrés

En el lenguaje común, el estrés se asocia con tensión, nerviosismo, irritabilidad, mal dormir, angustia, depresión, etc. Sin embargo, el término estrés proviene de la física y corresponde a la capacidad que tiene un cuerpo de volver a su condición inicial una vez que ha sido deformado; es la elasticidad la que le permite superar el estiramiento o recuperarse de la compresión a la cual ha sido sometido. Algo semejante ocurre con los seres vivos, quienes están expuestos permanentemente a diversos estímulos tanto del medio interno como externo que los obliga a expresar mecanismos de adaptación para recuperar el equilibrio u homeostasis (Carvajal, 2005).

Selye introdujo el concepto de estrés en la fisiología en 1956 y lo definió como aquella respuesta inespecífica que ocurre frente a diversos agentes nocivos como el frío, una lesión quirúrgica, una intoxicación, el ejercicio muscular brusco u otros y que se expresará en diversas respuestas del organismo.

Se requiere de características importantes para que pueda considerarse estrés como tal: en primer lugar, para que una situación se considere estresante para un individuo, éste debe percibirla como una experiencia alarmante o fuera de lo común. Sin embargo, este primer requerimiento puede ser también un componente de experiencias placenteras. Por lo que la segunda condición se refiere a que el individuo considere a la circunstancia de un modo hostil y, por

ende, trate de modificar o evitar ese estado. El tercer componente es la capacidad del individuo para controlar la situación de estrés. De este modo, los sujetos capaces de mantener el control durante experiencias adversas, logran atenuar las consecuencias perjudiciales del estrés en mayor medida que los individuos que no logran reaccionar favorablemente ante el mismo estímulo (Kim y Diamond, 2002).

Efectos del estrés al nivel de SNC

El estrés se considera un factor ambiental que tiene un profundo efecto sobre la morfología de diversas estructuras del SNC (Olivares et al., 2008). La respuesta de estrés es mediada por estructuras del SNC y por órganos periféricos. Los tres componentes principales del sistema de estrés son, el sistema *Locus Coeruleus* (sistema-LC), el sistema nervioso simpático (SNS-médula adrenal) y el eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA). Estos componentes interaccionan entre sí para lograr que el organismo alcance un estado de equilibrio necesario para su supervivencia (Habib et al., 2001; Charmandari et al., 2005). El sistema de estrés recibe e integra diversas señales cognitivas, emocionales, neurosensoriales y periféricas que llegan a través de diferentes vías (Charmandari et al., 2005). El estrés induce alteraciones conductuales (incremento en la vigilia, estado de alerta, cognición, supresión del apetito y del eje reproductivo) y físicas (incremento de la presión sanguínea, aumento en el ritmo cardiaco, incremento en la tasa respiratoria) al igual que alteraciones morfológicas en hipocampo, amígdala y corteza prefrontal, estructuras que están relacionadas con el aprendizaje, memoria y respuestas emocionales.

Estudios en roedores, demuestran que la organización final del sistema nervioso depende de factores genéticos y que factores estresantes tales como la desnutrición, el deterioro del medio ambiente o la supresión de estímulos visuales pueden provocar efectos deletéreos sobre la morfología y la función del SNC (Soto et al., 1999).

Efectos del estrés en la morfología de neuronas CA3

Al nivel de neuronas CA3, algunos estudios en modelos animales de estrés crónico han demostrado que el estrés induce remodelación dendrítica de las neuronas, que se caracteriza por un acortamiento reversible, la desramificación de las dendritas apicales, la disminución de la neurogénesis en el giro dentado y la reducción del volumen hipocampal total (Conrad *et al.*, 1996; McEwen. 1999; Czeh *et al.*, 2001; Magariños *et al.*, 1995). Beylin y Short (1998), encontraron que el estrés crónico induce el decremento en la complejidad del árbol dendrítico lo cual ocurre en conjunto con el decremento de la densidad de excrescencias y de espinas dendríticas en el hipocampo dorsal; por su parte Joels *et al.*(1996), observan que el estrés crónico produce una drástica remodelación en el árbol dendrítico apical de neuronas CA3. Vyas *et al.*, (2002) encontraron que el estrés crónico producido por restricción de movimiento produce una significativa disminución de la longitud de ramas dendríticas basales y apicales en las neuronas piramidales CA3. De modo contrario, Ishisuka *et al.* (1995) encontraron un aumento significativo en la densidad de las espinas de las células piramidales CA3 en hipocampo en ratas machos. En diferentes trabajos se ha demostrado que el estrés puede producir atrofia de las espinas dendríticas en neuronas CA3. Sin embargo, Sumanda *et al.* (1995) han demostrado que el estrés crónico por inmovilización induce un aumento en el número de excrescencias. Es importante recalcar que estos estudios describen únicamente el efecto del estrés en las neuronas CA3 del hipocampo dorsal y muy poca información se tiene del efecto del estrés en el hipocampo ventral.

El estrés esta mediado en gran parte por el eje HPA (hipotálamo-pituitario-adrenocortical) que presenta diferencias relacionadas con el sexo; estas diferencias son evidentes en los niveles de secreciones; las hembras tienen niveles más altos de corticosterona (CORT) (Critchlow *et al.*, 1963). Un cambio inducido por el estrés es el aumento de los glucocorticoides (GC). En comparación

con los machos, las ratas hembras tienen niveles más altos de GC después de un periodo de estrés (Critchlow *et al.*, 1963; Galea *et al.*, 1997; Handa *et al.*, 1994). Las diferencias de sexo están presentes además en el control del HPA a la respuesta al estrés, en respuestas conductuales (Beck y Luine, 1999, 2002; Bowman *et al.*, 2001; Luine, 1994) y morfológicas (Galea *et al.*, 1997, Watanabe *et al.*, 1992 a, b). Actualmente hay poca información con respecto a la morfología neuronal en ratas hembras.

Aprendizaje y memoria espacial

El aprendizaje se describe como un proceso continuo por el cual los organismos modifican su conducta, y en el que intervienen factores internos y externos. Consiste en la adquisición de conocimientos que permiten al individuo adaptarse mejor al medio que lo rodea (Morgado, 2005). Existen dos tipos de aprendizaje no asociativo que se caracteriza por un cambio en la conducta como resultado de la experiencia continua de un único estímulo: la habituación (disminución de la respuesta conductual a un estímulo repetido, no nocivo) y la sensibilización (aumento de la respuesta a un estímulo repetido, nocivo o peligroso).

La memoria está definida como el proceso de almacenamiento y recuperación de la información en el cerebro que permite, conservar y recuperar información o experiencias (ideas, imágenes, acontecimientos, sentimientos, etc.), es decir, mantiene los conocimientos adquiridos para que puedan ser recordados posteriormente (Klauer *et al.*, 2000). Existen dos tipos de memoria: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo.

- Memoria a corto plazo: se da cuando entra información al cerebro, misma que persiste por unos cuantos segundos o minutos. Este tipo de memoria se basa en respuestas eléctricas o moleculares efímeras en las redes neurales implicadas (Morgado, 2005).
- Memoria a largo plazo: se da cuando la experiencia aprendida se repite, la maquinaria celular se activa, ocasionando que los cambios anteriormente

mencionados continúen y cambien la morfología neuronal de manera permanente (Engert y Bonhoeffer, 1999), incrementando el número de receptores, la cantidad de neurotransmisor liberado y el número de contactos sinápticos.

Fisiológicamente, los recuerdos se producen por variaciones de la sensibilidad de transmisión sináptica de una neurona a otra neurona; estas variaciones permiten generar nuevas vías facilitadoras de transmisión de señales por los circuitos neuronales; estas vías se llaman huellas de memoria y son de importancia porque una vez establecidas, la mente puede activarlas para reproducir los recuerdos (Guyton ,2001.)

Particularmente la memoria espacial consiste en múltiples mecanismos que se encargan de codificar, almacenar y recuperar información de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales (Kessels *et al.*, 2001). Por lo tanto el aprendizaje y la memoria son procesos interrelacionados ya que si no hay aprendizaje no hay memoria (Morgado, 2005).

En el aprendizaje y la memoria se ha involucrado el mecanismo de plasticidad sináptica, que es la capacidad de las neuronas de modificar sus sinapsis remplazándolas, disminuyéndolas o aumentándolas en respuesta a determinados estímulos ambientales (Hebb, 1949; Hebb, 1976; Neves *et al.*, 2008; Johansen *et al.*, 2011) y que dan como resultado cambios en el patrón de conectividad sináptica (Wood *et al.*, 2001). Unas de las pruebas comúnmente utilizadas para medir memoria y aprendizaje en ratas es el laberinto acuático de Morris (LAM). En este laberinto los animales tienen que nadar en una piscina circular hasta localizar una plataforma de escape oculta. Los animales se guían por claves extra laberínticas que se localizan en torno al mismo y se requiere de pocos ensayos para aprender la prueba (Vicens *et al.*, 2003). Los ensayos pueden distribuirse en distintas sesiones de aprendizaje y en días consecutivos. Conforme se repiten las pruebas, el tiempo empleado para encontrar la plataforma (latencia de escape)

disminuye, observándose una curva progresiva de aprendizaje, que se caracteriza por latencias progresivamente menores. En el LAM las ratas tienden a aproximarse a la plataforma sumergida desde una dirección conocida, lo que sugiere la utilización de representaciones específicas para reconocer su localización, esto implica establecer relaciones entre distintos estímulos (Wang y Spelke, 2002).

Efectos del estrés en el aprendizaje y memoria espacial

Se ha reportado que el hipocampo (principalmente el área CA3) participa en la formación de la memoria declarativa en humanos (Scoville y Milner, 1957; Squire y Zola-Morgan, 1991; Gabrielli, 1998; Eichenbaum, 2000). En roedores, está implicada en la formación de la memoria de tipo espacial. O'Keefe y Dostrovsky (1971) descubrieron que las neuronas del hipocampo, se activan preferentemente cuando el roedor se encuentra en una localización espacial específica (Fox y Ranck, 1975; Muller, 1996; Shen *et al.*, 1997).

Varios autores (Mc Ewen *et al.*, 1968; de Koehlet *et al.*, 1999; Lupien y Lepage, 2001; Diamond *et al.*, 2005; Joëls *et al.*, 2006; Shors, 2006) coinciden con la idea de que el estrés es un potente modulador del aprendizaje y la memoria ya que se considera que deteriora las funciones cognitivas o que facilita las funciones neurales y la cognición (De Kloet *et al.*, 1999, Fujioka *et al.*, 2001; Fujioka *et al.*, 2006).

Justificación

Existen investigaciones de las cuales se sabe que el estrés crónico induce remodelación y atrofia dendrítica de las neuronas piramidales CA3 de hipocampo dorsal (Conrad *et al.*, 1996; McEwen *et al.*, 1999; Czeh *et al.*, 2001; Magariño *et al.*, 1995; Beylin y Short, 1998, Vyas *et al.*, 2002, Mc Ewen, 2000). Sin embargo no hay estudios que describan el efecto del estrés crónico en las células piramidales CA3 de hipocampo ventral, por lo cual fue de interés para el presente trabajo analizar el efecto del estrés crónico por restricción de movimiento en la morfología neuronal de CA3 ventral y saber si existen diferencias en el efecto del estrés entre neuronas CA3 de hipocampo dorsal y neuronas CA3 de hipocampo ventral.

Así mismo, es necesario señalar que la mayoría de los estudios sobre el efecto del estrés en la morfología neuronal han sido realizados en rata macho y poca información se tiene respecto de rata hembra. Debido a que se ha sugerido que en ratas hembras el estrés puede desencadenar varias patologías como depresión y pérdida de la capacidad de aprendizaje y memoria es importante realizar estudios tanto en ratas hembra como en ratas macho y determinar posibles diferencias relacionadas con el sexo, tal cual se ha observado de las secreciones del eje HPA ante eventos estresantes (Rachel *et al.*, 2002).

Hipótesis

El estrés crónico inducido por restricción de movimiento provocará una disminución en la longitud dendrítica y en la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales CA3 de hipocampo ventral al igual que un déficit de memoria espacial de rata machos y rata hembra, siendo los diferentes los efectos por sexo.

Objetivo General

- ❖ Analizar el efecto del estrés crónico por restricción de movimiento en la arborización dendrítica de neuronas CA3 de hipocampo dorsal e hipocampo ventral así como la capacidad de aprendizaje y memoria espacial de ratas estresadas.

Objetivos particulares

- ❖ Analizar el efecto de estrés crónico en la longitud dendrítica apical y basolateral de neuronas piramidales CA3 de hipocampo dorsal e hipocampo ventral de ratas macho y ratas hembra.
- ❖ Analizar el efecto del estrés crónico en la densidad de espinas dendríticas apicales y basolaterales de neuronas piramidales CA3 de hipocampo dorsal y ventral de ratas macho y ratas hembra.
- ❖ Analizar la capacidad de aprendizaje y memoria espacial de ratas macho y ratas hembra sometidas a estrés crónico.

Material y métodos

Experimento 1

Material biológico

Se utilizaron 24 ratas de la cepa *Long Evans* de 59 días de edad para el desarrollo del experimento, 12 machos y 12 hembras. Las ratas fueron separadas al azar en 4 grupos: grupo 1: machos control (MC, n=6); grupo 2: machos estresados (ME, n=6); grupo 3: hembras control (HC, n=6) y grupo 4: hembras estresadas (HE, n=6). Las ratas se mantuvieron en condiciones estándar de cuidado animal en el Bioterio Claude Bernad de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con ciclos de luz-oscuridad 12:12 horas y con alimento y agua *ad libitum*.

Estrés por restricción de movimiento

Las ratas ME y HE, fueron introducidas en cajas de restricción de polipropileno (figura 6) por 6 horas diarias (8:00-14:00 horas) durante 21 días para inducir estrés crónico. Estas ratas no tuvieron acceso a ningún estímulo proveniente de comida y agua; sin embargo, fuera de ese tiempo y estando en sus cajas familiares el resto del día se mantuvieron con libre acceso al alimento y al agua.

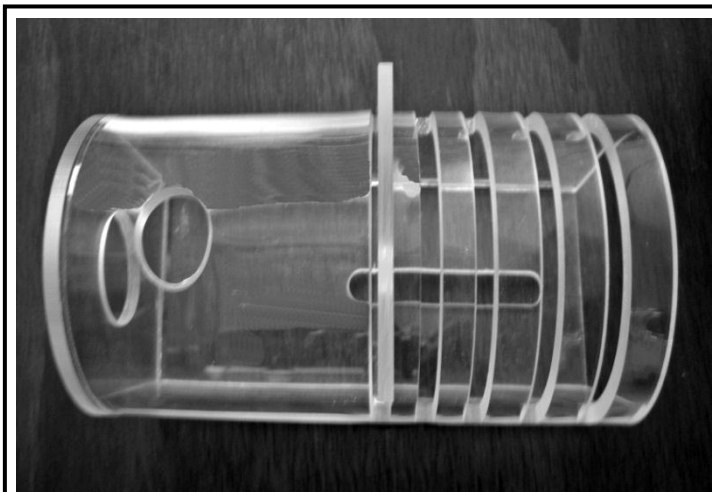


Figura 6.- Caja de restricción con la cual se indujo estrés crónico a los animales.

Obtención de tejido y tinción de Golgi-Cox.

Un día después de concluir el periodo de restricción, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (v.i.p) con una dosis de 1.2 mg/kg. Una vez anestesiados profundamente, se perfundieron por vía intracardiaca 100 ml de solución salina con la finalidad de eliminar la sangre del cerebro. Éste se extrajo rápidamente y se almacenó en solución Golgi-Cox por 14 días en oscuridad absoluta, pasados estos días la solución se cambió por sacarosa al 30% por 2 días antes de ser seccionados.

Posteriormente de los encéfalos se obtuvieron cortes coronales de 200 μm de grosor con ayuda de un vibrotomo (figura 7A) al nivel de la región dorsal y ventral del hipocampo y de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998). Los cortes fueron colocados en laminillas previamente gelatinizadas al 2% y se fueron fijando al portaobjetos con papel filtro y un poco de presión. Estas laminillas fueron colocadas en una cámara húmeda para evitar la posible desecación del tejido, por una noche.

El siguiente paso consistió en revelar la tinción mediante el siguiente procedimiento: las laminillas se enjuagaron en agua destilada durante un minuto. Inmediatamente fueron sumergidas en hidróxido de amonio durante 30 minutos. Se procedió a enjuagar nuevamente en agua destilada por un minuto. Posteriormente se sumergieron en fijador rápido de Kodak durante 30 minutos. Se enjuagaron en agua destilada por un min más y se procedió a la deshidratación del tejido en alcoholes (etanol)

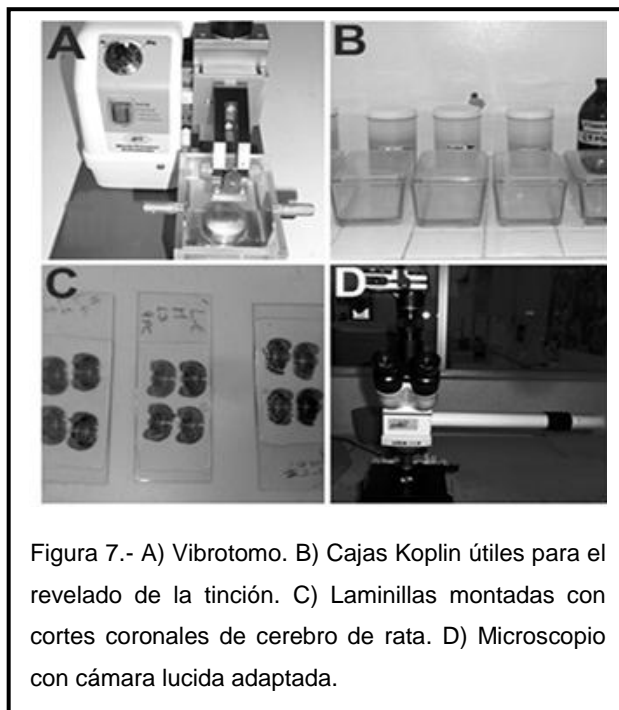


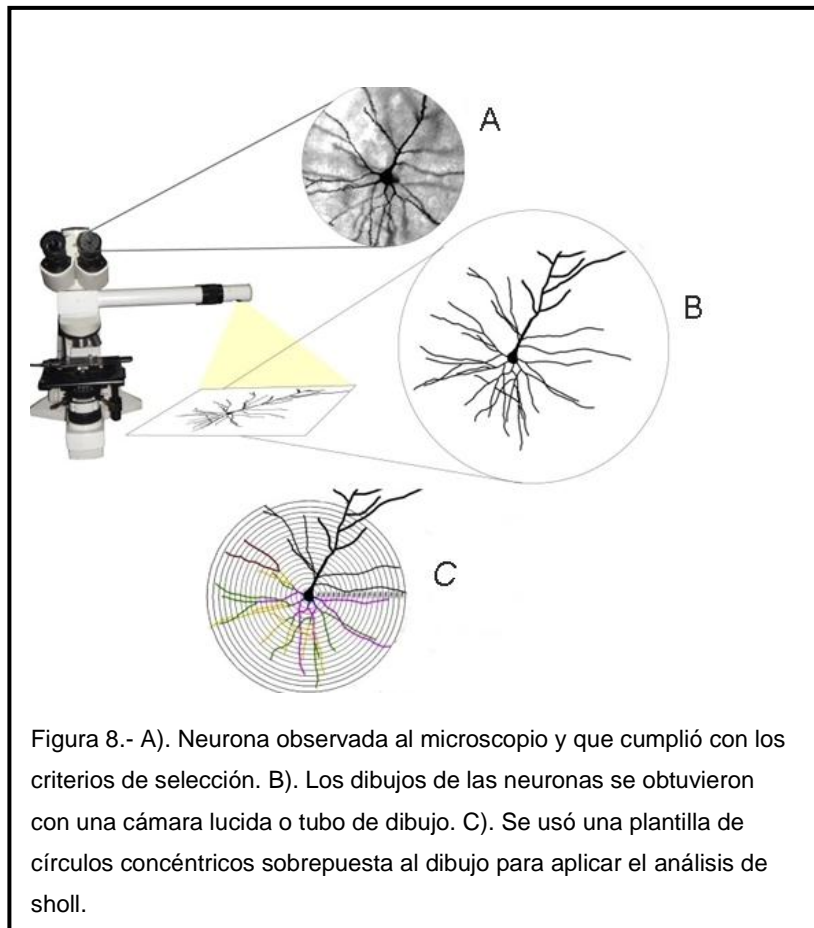
Figura 7.- A) Vibrotomo. B) Cajas Koplín útiles para el revelado de la tinción. C) Laminillas montadas con cortes coronales de cerebro de rata. D) Microscopio con cámara lucida adaptada.

ascendentes: al 50% por un minuto, al 70% por 1 minuto, al 95% por 1 minuto, seguido de dos pasos de etanol absoluto al 100% de 5 minutos cada uno. Para finalizar se aclararon en xileno durante 15 minutos, todos estos pasos se realizaron en cajas koplín (figura 7B) y se procedió a montar los cortes (figura 7C) con resina sintética (Entellan), dejándolas secar por 3 días para poder observarlas al microscopio óptico que tienen adaptada una cámara lucida o tubo de dibujo (figura 7D).

Análisis morfológico

Con la ayuda de una cámara lucida montada en un microscopio DME Leica, se dibujaron 10 neuronas de la región CA3 de hipocampo ventral y 10 neuronas de la región CA3 de hipocampo dorsal.

Las neuronas seleccionadas para su representación gráfica fueron aquellas que cumplieron los siguientes parámetros: buena tinción, típica morfología de neurona piramidal, con 3 dendritas basolaterales de primer orden por lo menos (figura 8A) y somas ubicados en la región CA3 del



hipocampo dorsal e hipocampo ventral.

Los dibujos de las neuronas se hicieron a una amplificación de 400X (Figura 8B). Se dibujaron además las espinas basolaterales y apicales a una amplificación de 1000X y al nivel de dendritas de tercer orden de ramificación.

La longitud del árbol dendrítico de las neuronas se calculó después de aplicar el análisis de Sholl, el cual consiste en cuantificar el número de intersecciones dendríticas en círculos concéntricos que fueron colocados sobre el dibujo de la neurona dibujada previamente (figura 8C).

Para obtener la densidad de espinas dendríticas se dibujó un segmento de al menos 10 μm de longitud de dendritas de tercer orden de ramificación y sobre el cual se cuantificó el número de espinas dendríticas.

Análisis estadístico.

Los datos de arborización dendrítica, longitud dendrítica total y densidad de espinas fueron analizados estadísticamente mediante una ANOVA de 2 vías seguida de una post-ANOVA de comparaciones múltiples de Bonferroni considerando el tratamiento (estrés crónico) y el sexo como variables independientes. Se consideró como significativa la diferencia cuando $p < 0.05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism 3.0 para hacer el análisis estadístico.

Experimento 2

Aprendizaje y memoria espacial

Se utilizaron otras 24 ratas, divididas en los mismos grupos antes mencionados y mantenidas bajo las mismas condiciones de Bioterio previamente mencionadas.

Después de las seis horas de restricción de los primeros 5 días de tratamiento los 4 grupos (ME, MC, HE y HC) fueron trasladados a las instalaciones del Laboratorio de Neurofarmacología de la facultad de CsQs de la BUAP donde se encuentra el laberinto acuático de Morris para ser sometidas a la prueba de aprendizaje espacial. Se dejaron reposar durante 20 min antes de iniciar la prueba para disminuir el estrés generado por el traslado. Se introdujeron en una tina de 150 cm de diámetro de entrada, 135 cm de base y 80 cm de altura (figura 9A) llena

con agua a temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y teñida con dióxido de titanio, esto para evitar que la rata pudiera visualizar donde se encontraba la plataforma. La tina se dividió en 4 cuadrantes imaginarios tomando como referencia los puntos cardinales. Dentro de la tina se colocó una plataforma de escape cilíndrica de 40 cm de alto por 15 cm de diámetro al nivel del cuadrante SO (figura 9B). Esta tina se encuentra en un cuarto de conducta que tiene minimizado el ruido y en

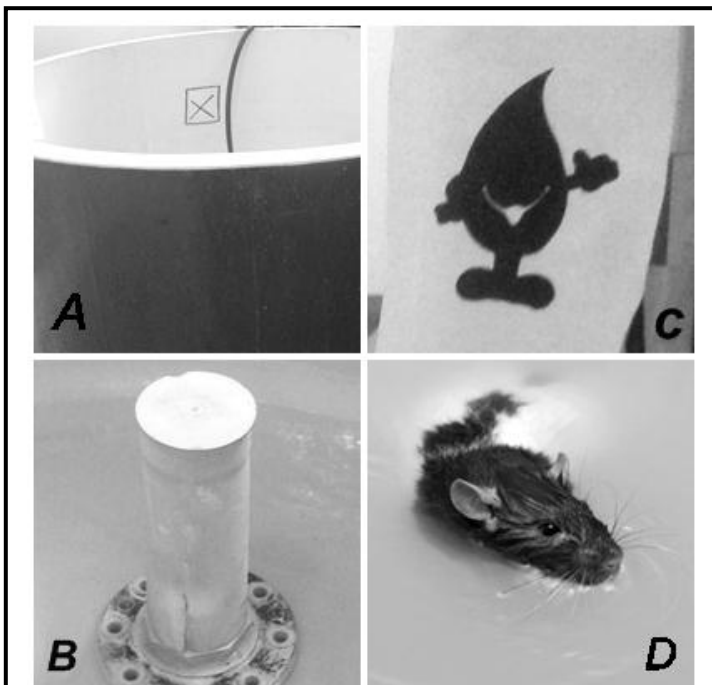


Figura 9.- A) Se muestra la tina que se utilizó para la prueba de aprendizaje y memoria espacial. B) señales extra laberínticas utilizadas durante la prueba de aprendizaje y memoria. C) Se muestra la plataforma de escape. D) Rata dentro de la tina, buscando la plataforma de escape.

el cual se colocan señales extra laberínticas (figura 9 C), la prueba consistió en colocar dentro de la tina a las ratas mirando hacia la pared del laberinto, desde cada uno de los puntos cardinales según el siguiente orden O, S, E, N.

Los animales nadaron libremente y tuvieron un máximo de 120 segundos para encontrar la plataforma de escape. Durante los primeros 4 ensayos (día 1, etapa de habituación) a las ratas se les permitió permanecer 30 segundos sobre la plataforma una vez que la habían encontrado. Si no la encontraban una vez transcurridos 120 segundos se les colocaba manualmente sobre ella, con el objetivo de que ubicaran la posición de la plataforma en relación a las señales extra laberínticas.

Los grupos se sometieron a 4 ensayos por día durante 4 días más con un intervalo de 50 minutos entre cada ensayo. Se cuantificó la latencia de escape (en segundos) es decir, el tiempo que tardaron en encontrar la plataforma de escape y subirse a ella. La etapa de aprendizaje corresponde a la ejecución de la prueba durante los ensayos quinto al vigésimo (segundo a quinto día de prueba). Terminando los días de aprendizaje, los grupos ME y HE, se siguieron sometiendo a estrés por restricción de movimiento por 6 horas diarias, mientras que los grupos MC y HC se mantuvieron en sus jaulas familiares. Al día siguiente de haber terminado el tratamiento de restricción se les aplicó la prueba de memoria en el laberinto acuático de Morris, esta prueba se realizó con la plataforma presente, de igual manera se cuantificó la latencia de escape únicamente.

Análisis estadístico

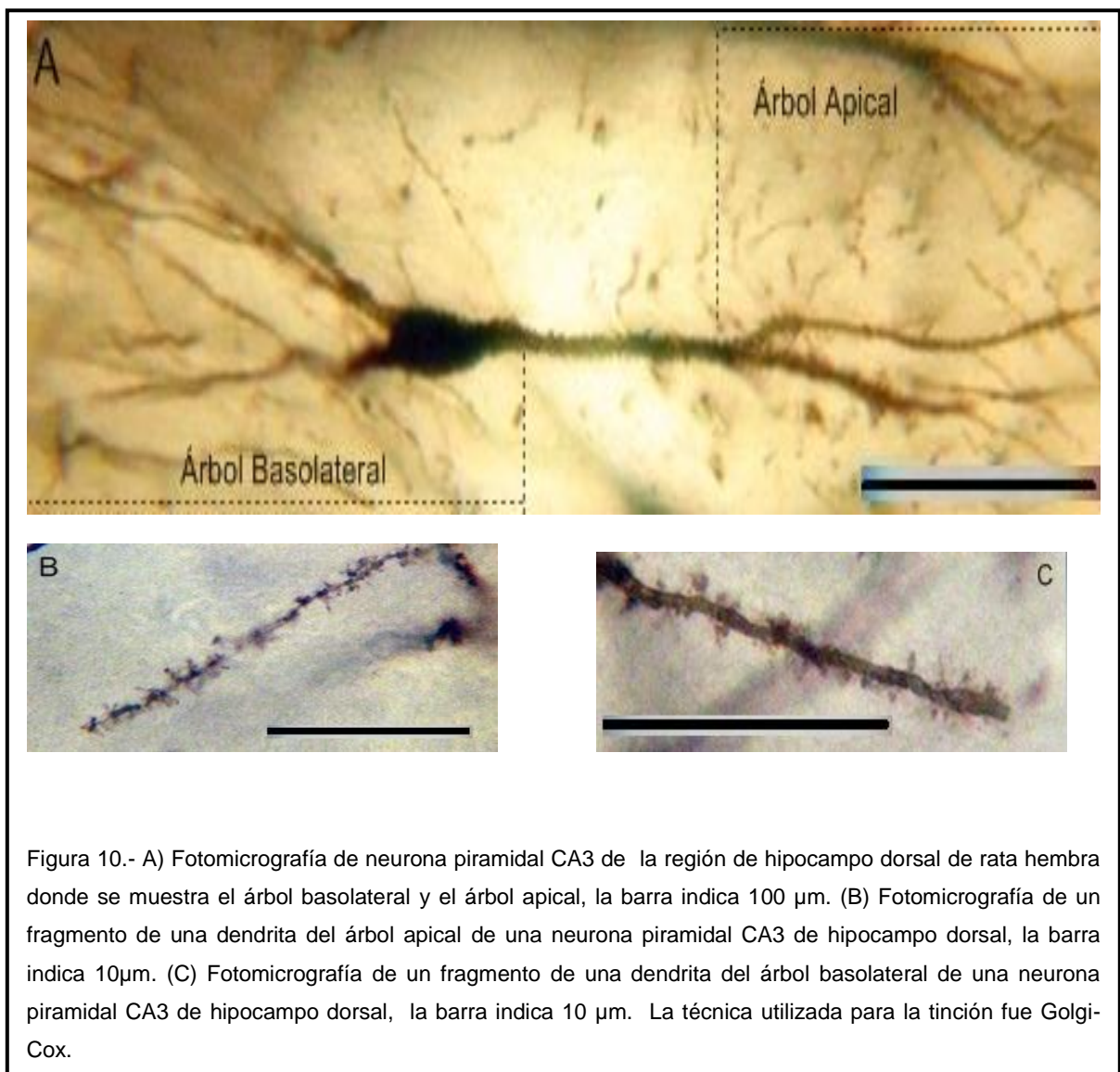
El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa Graph Pad Prism 3.0 y una prueba de ANOVA de 2 vías seguida de una post-ANOVA de comparaciones múltiples de Bonferroni considerando el sexo y el tratamiento (estrés por restricción de movimiento) como variables independientes. Se consideró como significativa la diferencia cuando $p < 0.05$.

Resultados

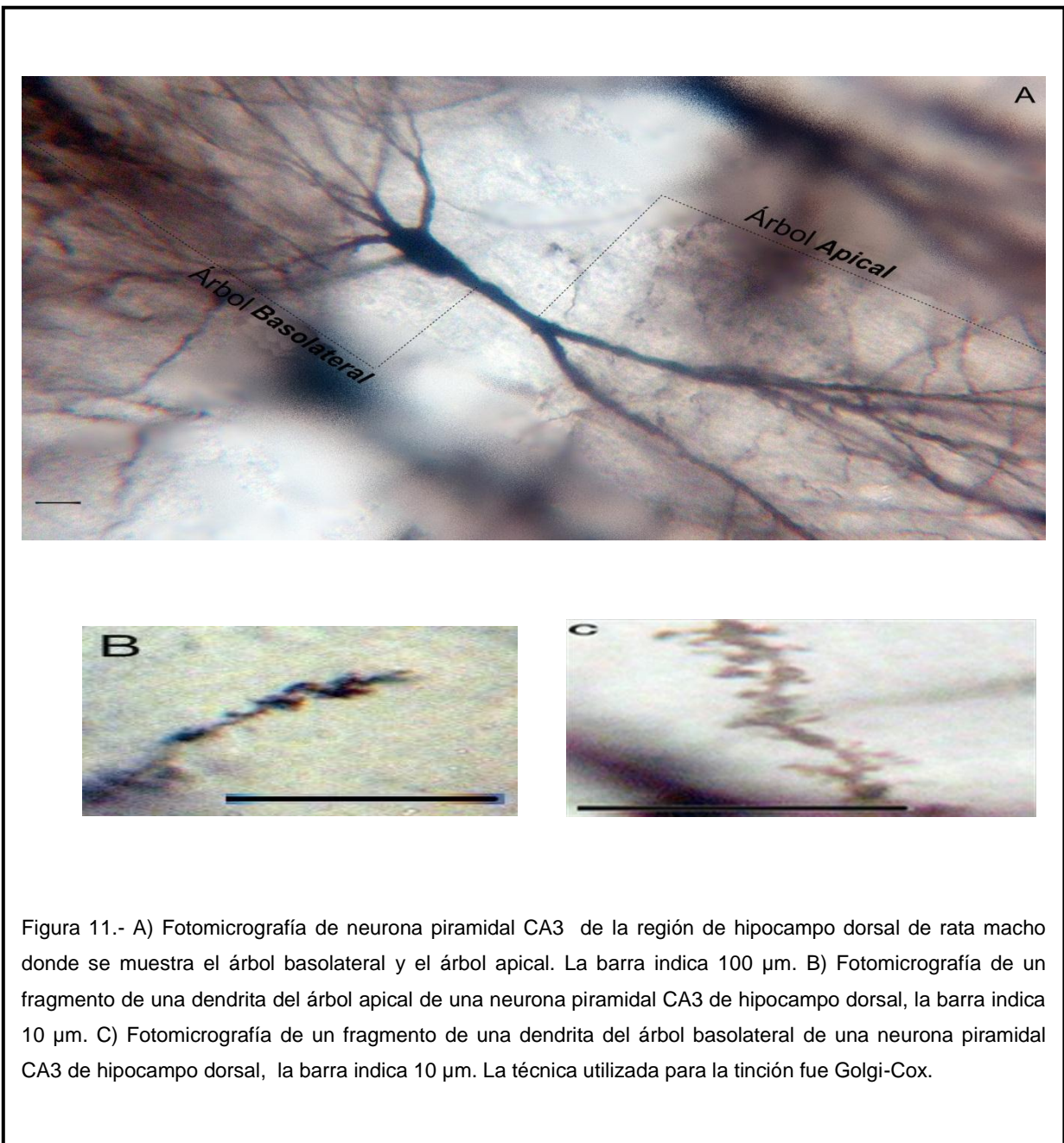
Experimento 1

Neuronas CA3 de hipocampo dorsal

Se muestra una fotomicrografía de una neurona CA3 de rata hembra representativa de hipocampo dorsal (10A). Así mismo se muestra un segmento dendrítico apical (10B) y uno basolateral (10C) en los cuales se observan espinas dendríticas.



Se muestra una fotomicrografía de una neurona CA3 de rata macho representativa de hipocampo dorsal (11A). Así mismo se muestra un segmento dendrítico apical (11B) y uno basolateral (1 C) en los cuales se observan espinas dendríticas.



Árbol dendrítico basolateral

Los datos obtenidos del análisis de Sholl del árbol dendrítico basolateral muestran cambios en cuanto al número de intersecciones dendríticas. Estos cambios refieren una disminución en el número de intersecciones dendríticas de neuronas de ratas HE al nivel del círculo concéntrico 8 con respecto de ratas HC (figura 12A) [tratamiento $F_{1, 240}=43.86$, $P<0.05$; círculo concéntrico $F_{23, 240}=243.0$, $P<0.05$], las ratas ME no muestran cambios en la arborización dendrítica por efecto del estrés (figura 12B).

La longitud dendrítica total del árbol dendrítico basolateral de neuronas CA3 de hipocampo dorsal de ratas HE es significativamente más pequeña que la de neuronas CA3 de ratas HC (tratamiento $F_{1, 20}=5.847$, $P=0.0253$). Sin embargo las ratas ME no mostraron diferencias en la longitud dendrítica total respecto de ratas MC (figura 12C). La densidad de espinas dendríticas de neuronas CA3 de hipocampo dorsal no fue afectada por el estrés crónico por restricción de movimiento ni en ratas hembra ni en ratas macho (figura 12D).

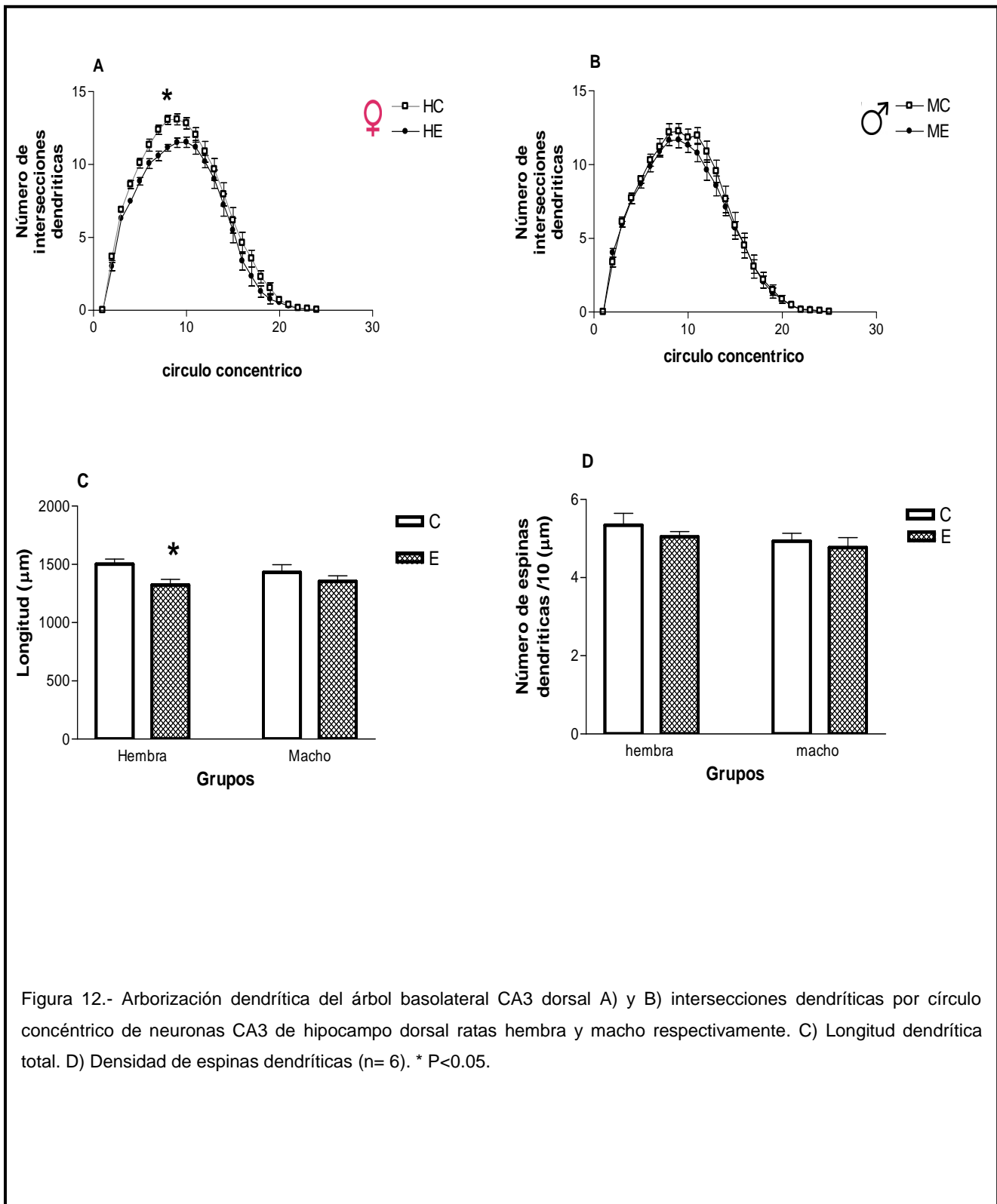


Figura 12.- Arborización dendrítica del árbol basolateral CA3 dorsal A) y B) intersecciones dendríticas por círculo concéntrico de neuronas CA3 de hipocampo dorsal ratas hembra y macho respectivamente. C) Longitud dendrítica total. D) Densidad de espinas dendríticas (n= 6). * P<0.05.

Árbol dendrítico Apical

Los datos del análisis de sholl del árbol dendrítico apical de neuronas CA3 de hipocampo dorsal muestran cambios en cuanto al número de intersecciones dendríticas. Estos cambios refieren un aumento en el número de intersecciones dendríticas de ratas HE al nivel del círculo concéntrico 21 con respecto a HC (figura 13A); [tratamiento $F_{1, 280} = 31.75$ $P < 0.0001$; círculo concéntrico $F_{27, 280} = 102.9$ $P < 0.05$] mientras que en los ME no se observaron cambios significativos respecto de las ratas MC (figura 13B).

Con respecto a la longitud dendrítica total (figura 13C) y la densidad de espinas dendríticas (figura 13D) del árbol apical de neuronas CA3 de hipocampo dorsal no se observaron cambios por efecto del estrés.

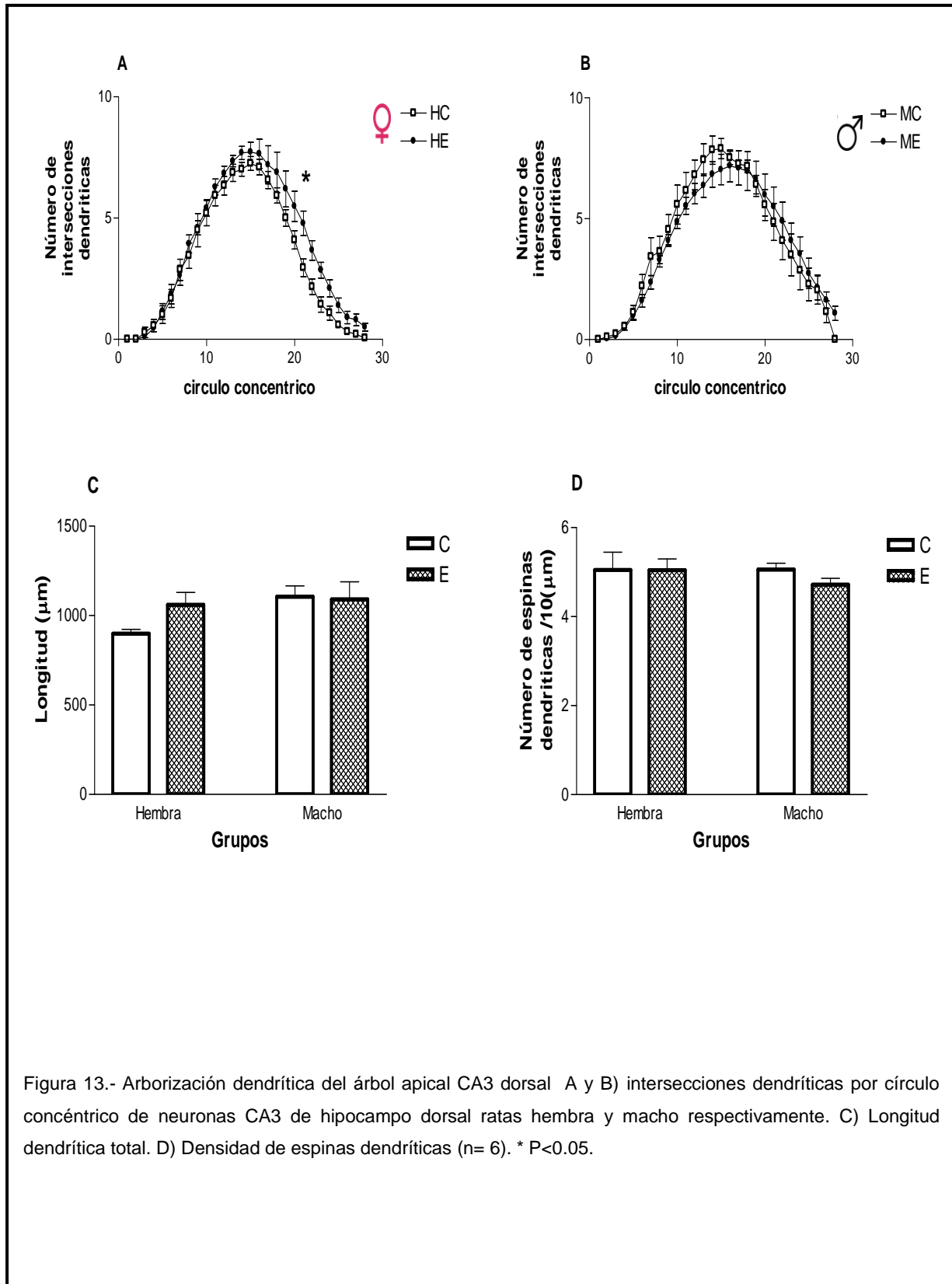
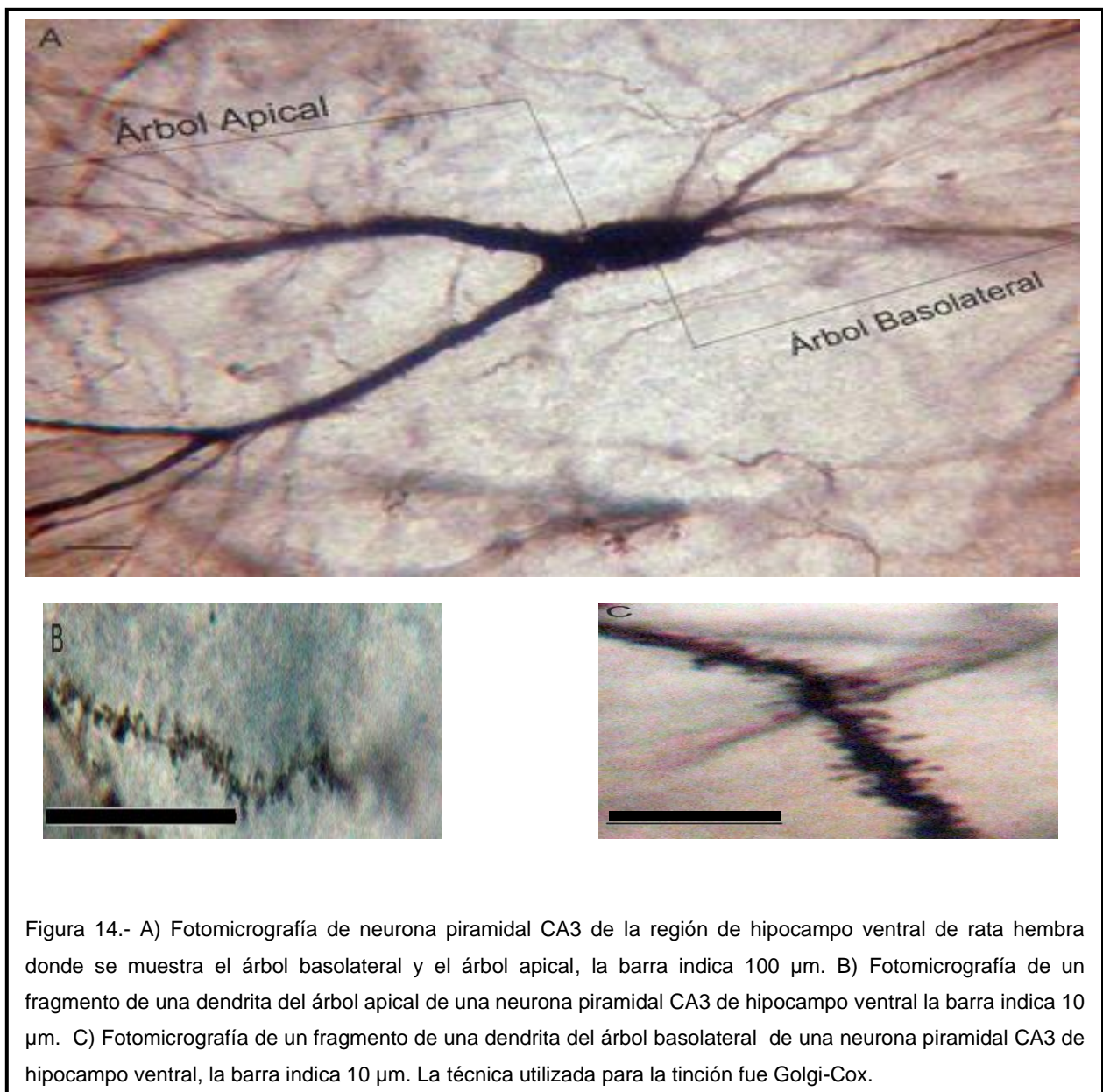


Figura 13.- Arborización dendrítica del árbol apical CA3 dorsal A y B) intersecciones dendríticas por círculo concéntrico de neuronas CA3 de hipocampo dorsal ratas hembra y macho respectivamente. C) Longitud dendrítica total. D) Densidad de espinas dendríticas (n= 6). * P<0.05.

Neuronas CA3 del hipocampo ventral

Se muestra una fotomicrografía de una neurona CA3 de rata hembra representativa de hipocampo ventral (14A). Así mismo se muestra un segmento dendrítico apical (14B) y uno basolateral (14C) en el cual se observan espinas dendríticas.



Se muestra una fotomicrografía de una neurona CA3 de rata macho representativa de hipocampo ventral (15A). Así mismo se muestra un segmento dendrítico apical (15B) y uno basolateral (15C) en el cual se observan espinas dendríticas.

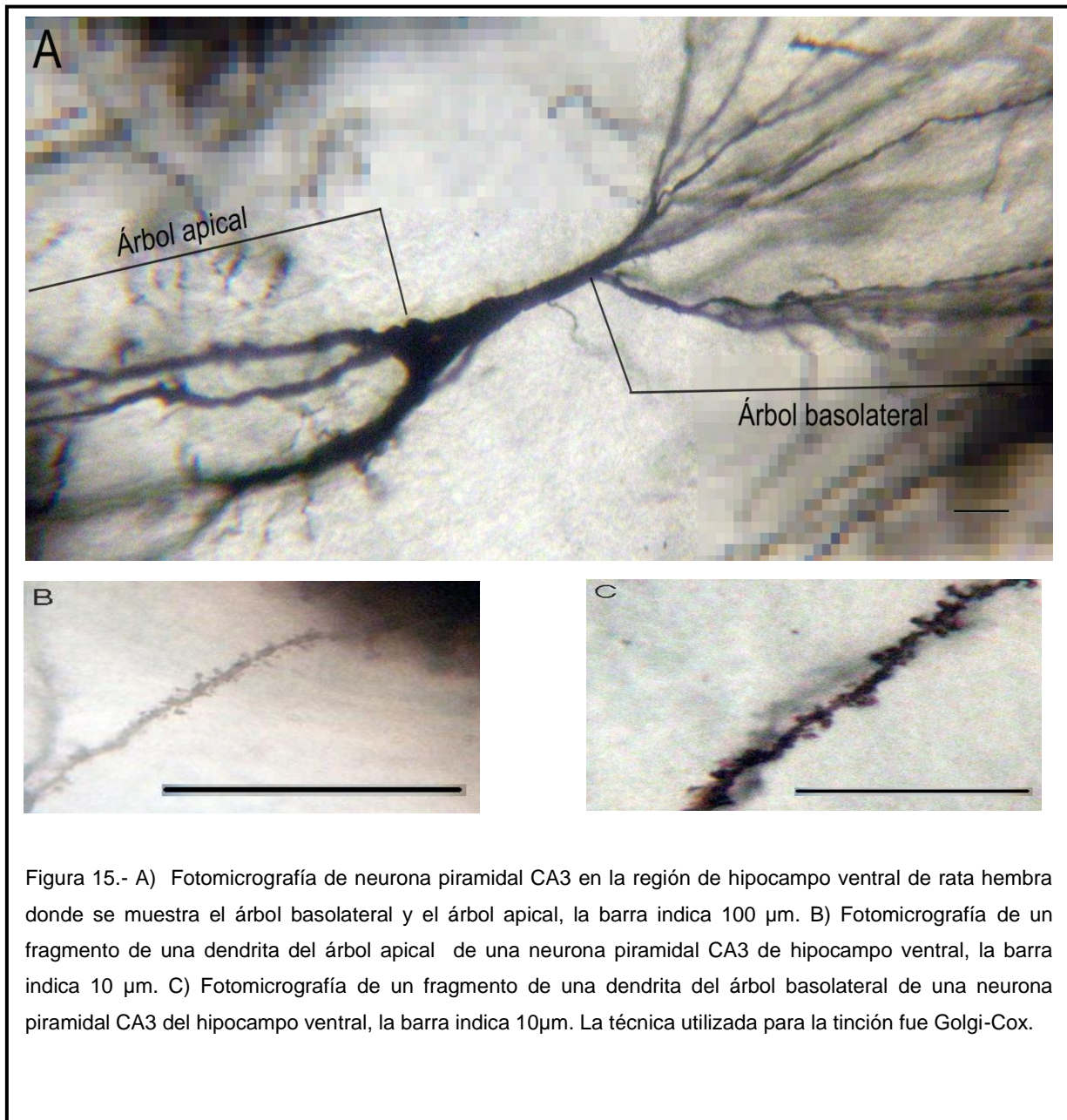


Figura 15.- A) Fotomicrografía de neurona piramidal CA3 en la región de hipocampo ventral de rata hembra donde se muestra el árbol basolateral y el árbol apical, la barra indica 100 μm . B) Fotomicrografía de un fragmento de una dendrita del árbol apical de una neurona piramidal CA3 de hipocampo ventral, la barra indica 10 μm . C) Fotomicrografía de un fragmento de una dendrita del árbol basolateral de una neurona piramidal CA3 del hipocampo ventral, la barra indica 10 μm . La técnica utilizada para la tinción fue Golgi-Cox.

Árbol dendrítico basolateral

Los datos obtenidos del análisis de Sholl del árbol dendrítico basolateral muestran cambios en cuanto al número de intersecciones dendríticas. Estos cambios refieren una disminución en el número de intersecciones dendríticas al nivel del círculo concéntrico 5, 6, 7,8 y 12 de neuronas de ratas HE con respecto a neuronas HC (figura 16A) [tratamiento $F_{1,280}=60.37P<0.0001$; círculo concéntrico $F_{27,280}= 266.0P<0.0001$]. En las ratas ME no se observaron diferencias en la arborizaciones dendrítica (figura 16B) respecto a las ratas MC.

La longitud total (figura 16C) y la densidad de espinas dendríticas (figura 16D) del árbol basolateral de neuronas CA3 de hipocampo ventral no muestran cambios por efecto del estrés.

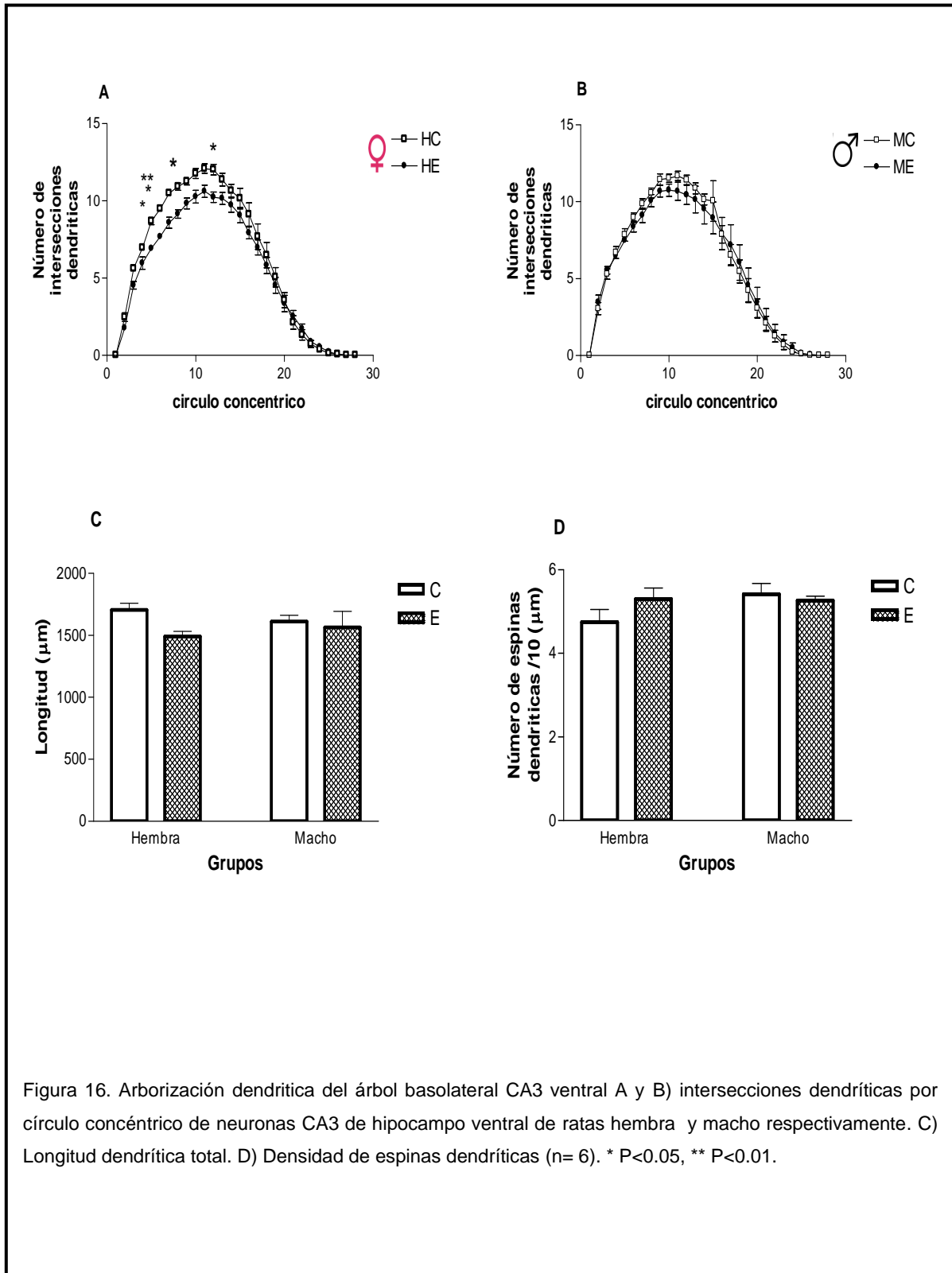


Figura 16. Arborización dendrítica del árbol basolateral CA3 ventral A y B) intersecciones dendríticas por círculo concéntrico de neuronas CA3 de hipocampo ventral de ratas hembra y macho respectivamente. C) Longitud dendrítica total. D) Densidad de espinas dendríticas (n= 6). * P<0.05, ** P<0.01.

Árbol dendrítico Apical

El análisis de Sholl del árbol dendrítico apical de neuronas CA3 de hipocampo ventral muestra que no hay cambios en cuanto al número de intersecciones dendríticas del grupo de ratas HE con respecto a las ratas HC (figura 17A) ni del grupo ME respecto de las ratas MC (figura 17B). La longitud dendrítica total (figura 17C) y la densidad de espinas dendríticas (figura 17D) del árbol apical de neuronas CA3 de hipocampo ventral no se modifica por efecto del estrés crónico.

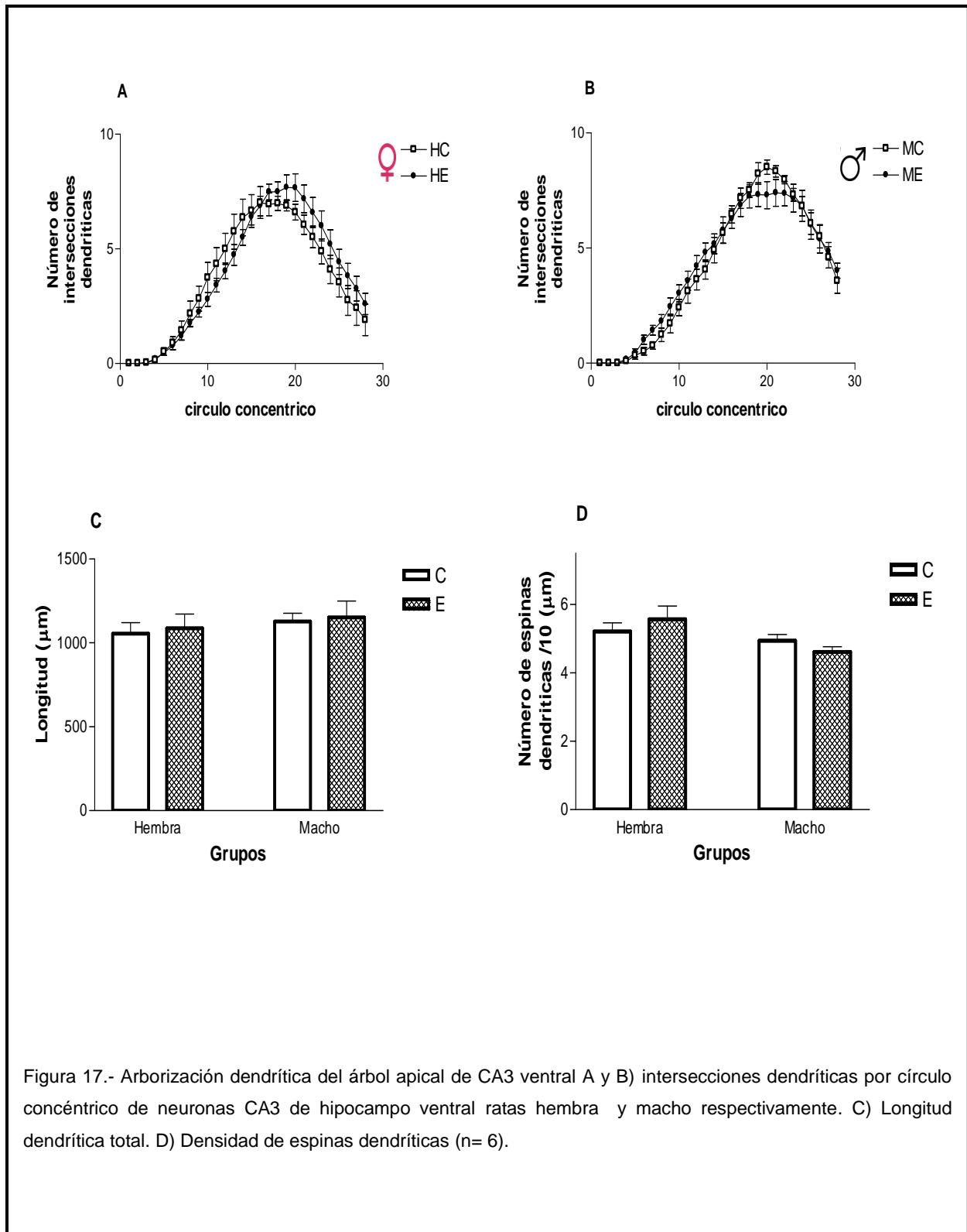


Figura 17.- Arborización dendrítica del árbol apical de CA3 ventral A y B) intersecciones dendríticas por círculo concéntrico de neuronas CA3 de hipocampo ventral ratas hembra y macho respectivamente. C) Longitud dendrítica total. D) Densidad de espinas dendríticas (n= 6).

Experimento 2

Aprendizaje y Memoria

Se observan los resultados de la prueba de aprendizaje y memoria de ratas hembras estresadas (figura 18 A) y de ratas macho estresados (figura 18 B). Las ratas HE presentaron una mayor latencia de escape con respecto a las ratas HC; mientras que entre los animales ME y MC no se observan diferencias.

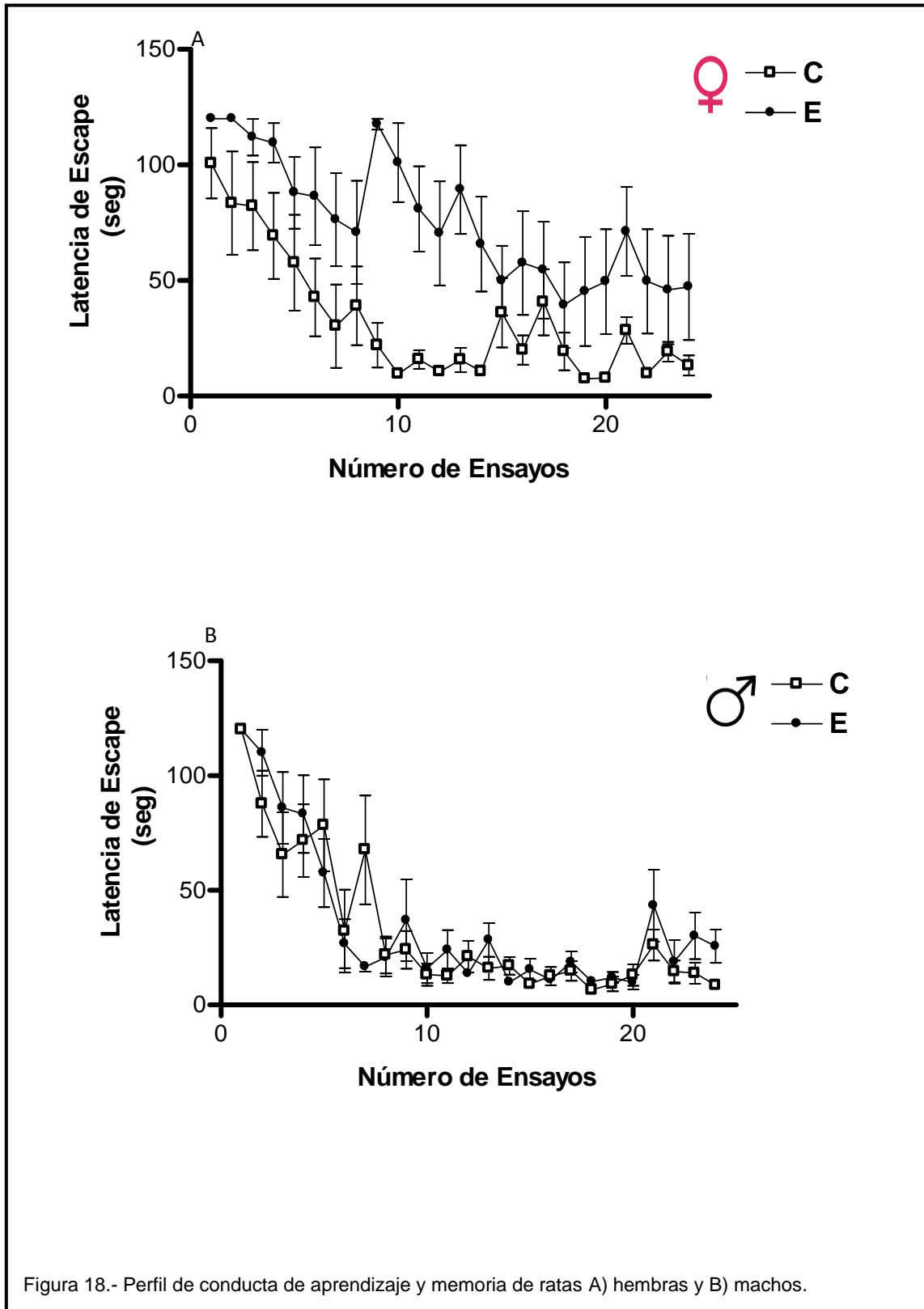
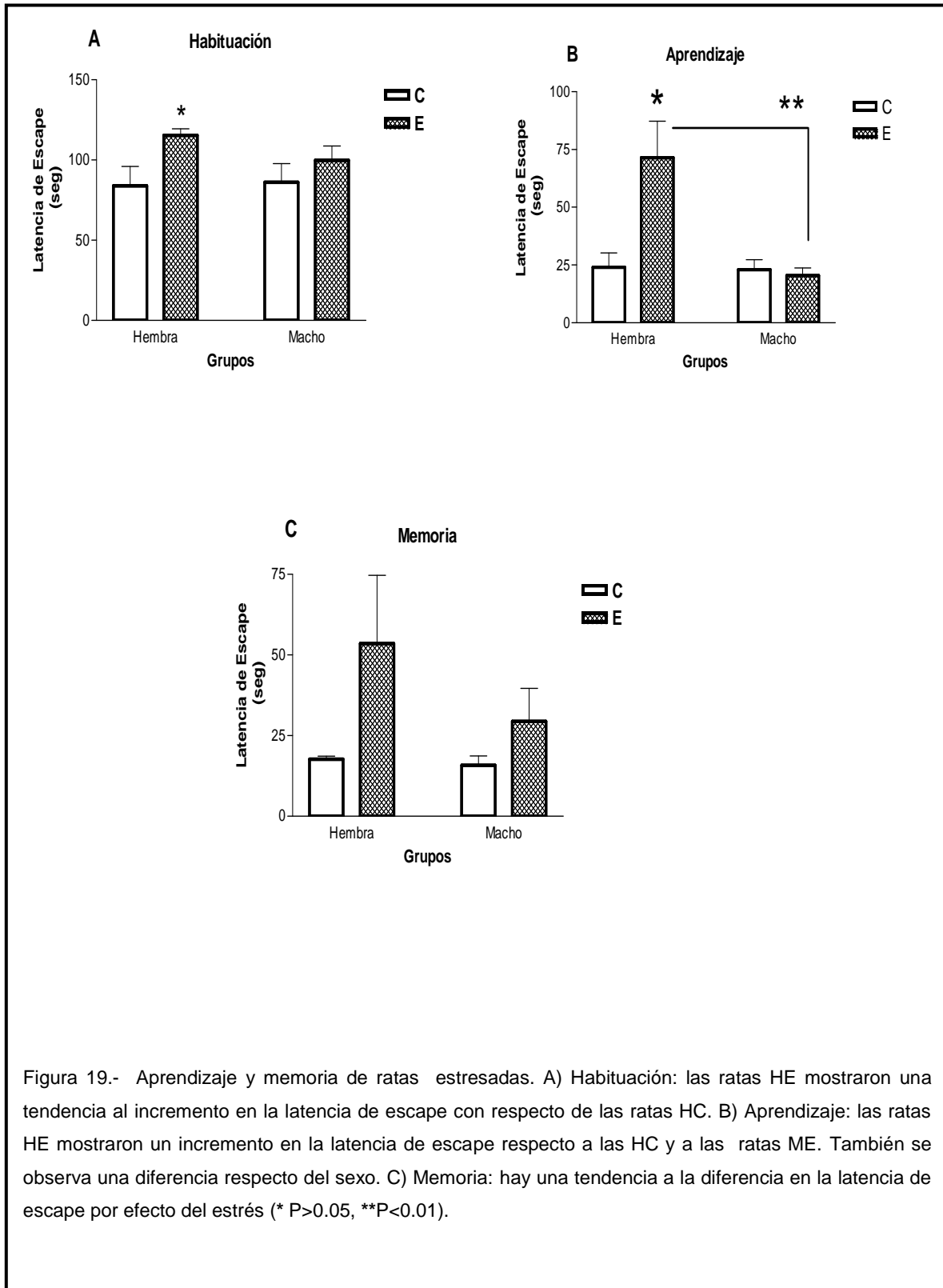


Figura 18.- Perfil de conducta de aprendizaje y memoria de ratas A) hembras y B) machos.

En la figura 19A se muestran los resultados de la ejecución de la prueba de laberinto acuático de Morris durante los primeros 4 ensayos (fase de habituación). Se observó una diferencia en el tiempo de latencia de escape de las ratas HE que mostraron un incremento en la latencia de escape respecto a las ratas HC (tratamiento $F_{1, 20} = 5.325$). No se observaron cambios entre las ratas macho. De igual manera durante la fase de aprendizaje se observó que las ratas HE presentaron un incremento en el tiempo de latencia de escape respecto de las ratas HC (tratamiento $F_{1, 20} = 6.377$, sexo $F_{1, 20} = 8.608$, $P < 0.01$). Este incremento es significativo también cuando se compara el resultado con la latencia de escape de las ratas ME. Por último, en la fase de memoria no se observaron diferencias significativas ni por tratamiento ni por sexo sin embargo existe una tendencia a la diferencia ($P = 0.0503$) entre las ratas HE y ratas HC (figura 19C).



Discusión

En este proyecto se analizó el efecto del estrés crónico por restricción de movimiento en la arborización dendrítica de neuronas CA3 de hipocampo dorsal e hipocampo ventral así como la capacidad de aprendizaje y memoria espacial de las ratas estresadas.

Uno de los datos importantes a resaltar de este proyecto es que se utilizaron ratas de la cepa Long Evang para realizar los experimentos ya que las cepas de ratas llegan a ser un factor importante en la investigación sobre estrés, debido a las diferentes sensibilidades que presentan cada una (McLaughlin *et al.*, 2007). En paradigmas de restricción de movimiento comúnmente se utilizan las cepas Sprague Dawley o Wistar (Ishizuka *et al.*, 1995; Magariños y MCewen, 1995; Sunanda y Raju, 1995; Castañeda *et al.* 2013).

Otro dato a resaltar es el tipo de estresor ya que existen varias formas para provocar estrés como lo son: nado forzado, estímulos luminosos durante el periodo de oscuridad y vice-versa, frío, aislamiento social, privación de agua y comida (Vyas *et al.*, 2002), y restricción de movimiento por medio de mallas de alambre (Magariños y MCewen, 1995). En este proyecto se optó por provocar estrés crónico mediante restricción de movimiento en cajas de polipropileno lo que limita la movilidad del animal, pero no le genera ningún maltrato físico ni dolor (Magariños y MCewen, 1995).

En relación a la morfología neuronal, Vyas *et al.*, (2002) encontraron que por restricción de movimiento se produce una disminución del largo y el número de ramas dendríticas basales y apicales de las neuronas CA3 de hipocampo ventral, lo cual concuerda con los datos obtenidos por nosotros respecto del árbol basal de neuronas CA3 de hipocampo dorsal. Esta disminución de la arborización y atrofia dendrítica es debida posiblemente, al aumento en la síntesis y liberación de glucocorticoides, moléculas que en el organismo controlan la magnitud y la duración de la respuesta del estrés.

Los GC modifican la liberación de glutamato de las terminales presinápticas el cual actúa sobre varios tipos de receptores: los ionotrópicos NMDA, AMPA (ácido α -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y kainato. La activación de los receptores NMDA permiten la entrada de Ca^{2+} a través de los canales iónicos específicos y permite un cambio persistente en la expresión de receptores postsinápticos (AMPA). El aumento del Ca^{2+} en el árbol dendrítico, activa a cinasas dependientes de Ca^{2+} como la proteína-cinasa dependiente de Ca^{2+} calmodulina (Camk) y la proteína-cinasa C (PKC). Una isoforma de la proteína quinasa C, queda persistentemente activa. Así queda inducido el estado de LTP (long-term potentiation) por despolarización, por entrada de Ca^{2+} y también por la activación de segundos mensajeros retrógrados GABA, óxido nítrico y factor neurotrófico derivado del cerebro, (BDNF) los cuales son liberados por las neuronas postsinápticas (Mac Donal *et al.*, 2006; Rodríguez, 2003). La entrada de Ca^{2+} por la activación de los receptores NMDA activa a diferentes proteínas-cinasas que promueven cambios en el citoesqueleto, los que generan cambios en la morfología de la neurona y de esta forma, se crean nuevas regiones sinápticas (Bailey y Kandel, 1993). Por otro lado, los factores de transcripción regulados dentro del núcleo de la neurona postsináptica, producen la síntesis de ARNm orientado a traducirse en nuevas proteínas que se destinan a estabilizar los cambios morfológicos producidos (Casadio *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1997).

Los cambios estructurales en las dendritas son el resultado de la modificación del sistema de microtubulos del citoesqueleto (Black y Garbutt. 2002), las modificaciones protraduccionales de la tubulina (Black y Garbutt. 2002) y la fosforilacion de los microtubulos asociadas a proteínas *tau* (Mohapel Petet *et al.*, 1997) que junto con los cambios de actina (Roosendaal *et al.*, 1991) producen la reorganización de las dendritas.

Nuestros datos concuerdan parcialmente con Beylin *et al.*, (1998) quienes dicen que el estrés crónico induce un decremento en la complejidad del árbol dendrítico y en la densidad de la excrescencias y espinas dendríticas. Sin embargo en este trabajo no se encontraron alteraciones en la densidad de espinas dendríticas. Se

ha sugerido que la disminución en la densidad de espinas dendríticas se debe a que el estrés afecta la síntesis y la liberación de serotonina con un incremento y eso causa la retracción de las espinas (MacDonald *et al.*, 2006). De acuerdo a Sapolsky, (2003); Bulloch, (2000); Berczi *et al.*, (1996), la retracción dendrítica típica ocurre solo en la región apical de CA3 y no en el árbol dendrítico basal de CA3 posiblemente debido a que esta región recibe la mayoría de impulsos de las fibras musgosas desde el giro dentado indicando que el daño puede prevenir o alterar la remodelación dendrítica inducida por el estrés en otras regiones de la neurona. Sin embargo, en nuestros datos encontramos alteraciones en el árbol basal de hipocampo dorsal, esto posiblemente a las diferencias entre las distintas cepas utilizadas.

Las diferencias importantes en el efecto del estrés relacionadas con el sexo han sido descritas (Galea *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1992 a, b). Existe información contradictoria respecto de la sensibilidad por sexo a los efectos por estrés. Varios autores (Conrad *et al.*, 1996; Luine *et al.*, 1994, 1996, 2002; McLay *et al.*, 1998; Mizoguchi *et al.*, 2000) apoyan la idea de que periodos cortos de estrés no son tan dañinos para la rata macho mientras que periodos largos de estrés promueven un déficit de memoria espacial. Contrariamente Bowman *et al.* (2001) menciona, que las ratas hembra parecen ser menos sensibles que los machos a los efectos deteriorantes de estrés. Nuestros datos apoyan parcialmente la primera idea ya que los efectos del estrés no causaron daño en ratas macho sin embargo se observaron cambios en las ratas hembra. Aunque no es claro qué mecanismos están mediando las respuestas de estrés propias de cada sexo, se ha demostrado que los niveles circulantes de estradiol son una importante contribución a las diferencias sexuales en la respuesta al estrés (Bowman *et al.*, 2002).

Las hormonas ováricas también pueden contribuir a las diferencias sexuales en los efectos del estrés. Los estrógenos desempeñan un papel beneficioso en el aprendizaje y la memoria en roedores y varias observaciones sugieren que las

hormonas gonadales femeninas como el estradiol pueden contribuir a efectos de estrés sexualmente dimórficos. Las hembras muestran ciclos estrales naturales durante y después del periodo de estrés, lo que sugiere que la función ovárica se mantiene sin trastornos (Bowman *et al.*, 2001) aunque los niveles de GC varían dependiendo de los días del ciclo estral (Burgues *et al.*, 1992; Carey *et al.*, 1995; Viau y Meaney. 1991). Los estrógenos pueden afectar la respuesta a CORT, sugiriendo efectos neuroprotectores (Wise *et al.*, 2001). En los datos obtenidos de hembras con respecto de machos queda totalmente descartada la idea de que dichos cambios pudieron ocurrir dependiendo de la etapa del ciclo estral en el que se encontraban los animales, ya que se ha demostrado que no hay variabilidad dependiente de la etapa del ciclo estral (Prendergast *et al.*, 2014).

Posiblemente las diferencias encontradas en machos respecto de hembras pudieron deberse a que la testosterona (T) posee un efecto ansiolítico y analgésico sobre la conducta de ratas (Justel *et al.*, 2009). La T es producida principalmente por los testículos, aunque las hembras también la producen pero en menor cantidad. Los receptores de andrógenos se encuentran en diferentes regiones cerebrales que son cruciales para la emoción, el aprendizaje y la memoria, por ejemplo, la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal (Janowsky, 2006). Existen estudios que señalan que la T modifica la fisiología y la función del hipocampo (Leranth *et al.*, 2003), cuando las ratas son castradas la privación de andrógenos produce un decremento en la densidad sináptica en el hipocampo y el reemplazo con T normaliza esta alteración (Leranth *et al.*, 2003).

Ante situaciones de estrés los machos recurren con mayor frecuencia a conductas de huida o pelea, mientras que las hembras orientan su conducta hacia el cuidado de los hijos (Taylor *et al.*, 2000). No obstante el tipo de estresor pudo causar un cierto nivel de habituación ya que un estresor de mediana intensidad, tiene como resultado una robusta secreción inicial de corticosterona, la que disminuye gradualmente en el transcurso de los días de exposición al estresor (Natelson *et al.*, 1988; Pitman *et al.*, 1988; Retana *et al.*, 2003) lo cual puede influir tanto en la

morfología neuronal como en la capacidad de aprendizaje espacial en ratas macho.

Madera y Shorts (1998) mencionan que el estrés agudo facilita el condicionamiento clásico en ratas macho de igual manera que el estrés deteriora el procesamiento de memoria espacial y el aprendizaje (Kim y Diamond, 2002) lo cual es confirmado parcialmente en nuestros resultados ya que sólo las hembras estresadas mostraron un déficit en la etapa de aprendizaje y una tendencia al déficit en la etapa de memoria. Estos cambios posiblemente se debieron a las células granulosas y la relación estrecha con el aprendizaje y la memoria ya que se sabe que la producción de células granulosas se inhibe por efecto del estrés crónico.

En nuestros resultados solo encontramos alteraciones en la región del hipocampo dorsal y no del ventral posiblemente a que el estrés provoca un arreglo estructural del hipocampo dorsal, estructura que recibe proyecciones de la neocorteza, mientras que la región que proyecta al hipocampo ventral recibe aferentes de núcleos subcorticales, como la amígdala. Aún más, hay conexiones directas entre el hipocampo ventral y la corteza prefrontal, la amígdala, el hipotálamo y otros núcleos subcorticales (Dolorfo y Amaral, 1998a; Dolorfo y Amaral, 1998b), ausentes en la región más dorsal del hipocampo (Amaral y Witter, 1989).

Conclusiones

- ❖ Las neuronas piramidales CA3 de ratas hembras Long Evans son más sensibles a los efectos del estrés que las neuronas de rata macho.
- ❖ El árbol dendrítico basolateral de neuronas CA3 de hipocampo dorsal de ratas hembra estresadas es afectado con una disminución en su longitud dendrítica total.
- ❖ El estrés crónico promueve un déficit en la capacidad de aprendizaje y memoria espacial en ratas hembras estresadas.
- ❖ Se observó dimorfismo sexual en el efecto del estrés sobre la morfología neuronal y la capacidad de aprendizaje y memoria.
- ❖ De modo contrario con nuestra hipótesis se encontraron cambios en la morfología de neuronas CA3 de hipocampo dorsal de ratas hembra, sin cambios en la morfología de neuronas CA3 de hipocampo ventral.
- ❖ El hipocampo ventral de ratas hembras y ratas machos de la cepa Long Evans no es afectado por estrés por restricción de movimiento.

Bibliografía

- Amaral DG., Witter MP. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Amaral DG., Scharfman HE., Levanex P. (2007). The dentate gyrus; fundamental neuroanatomical organization (The dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*.163:3-22.
- Andersen P., Morris R., Amaral D., Bliss T., O'Keefe J. (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press: USA.
- Bailey CH., Kandel ER. (1993). Structural changes accompanying memory storage. *Annual Review of Physiology*. 55:397-426.
- Bannerman DM., Rawlins JN., McHugh SB., Deacon RM., Yee BK., Bast T., Zhang WN., Pothuizen HH., Feldon J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28:273-283.
- Bannister HJ., Larkman AU. (1995). Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurons from the rat hippocampus. I. Branching patterns. *J. Comp. Neurol.* 360:150-160.
- Bast T., Feldon J. (2003). Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog. Neurobiol.* 70:319-345.
- Beck KD., Luine VN. (1999). Food deprivation modulates chronic stress effects on object recognition in male rats: role of monoamines and amino acids. *Brain Res.* 830, 56–71.
- Beck KD., Luine VN. (2002). Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: role of housing conditions. *Physiol. Behav.* 75:661–673.
- Berczi I., Chalmers IM., Nagy E., Warrington RJ. (1996). The immune effects of neuropeptides. *Bailleres Clin Rheumatol.* 10:227-257.

- Beylin AV., Shors TJ. (1998). Stress enhances excitatory trace eyeblink conditioning and opposes acquisition of inhibitory conditioning. *Behav Neurosci.* 112:1327-38.
- Black PH., Garbutt LD. (2002). Stress inflammation and cardiovascular disease. *J. Psychosom Res.* 52:1-23.16.
- Bowman RE., Ferguson D., Luine VN. (2002). Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. *Neuroscience.* 113:401–410.
- Bowman RE., Zrull MC., Luine VN. (2001). Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. *Brain Res.* 904:279–289.
- Brinton RD. (2001). Cellular and molecular mechanisms of estrogen regulation of memory formation and neuroprotection against Alzheimer's disease: recent insights and remaining challenges. *Learn Mem.* 8:121–133.
- Brinton RD., Chen S., Montoya M., Hsieh D., Minaya J. (2000). The estrogen replacement therapy of the Women's Health Initiative promotes the cellular mechanisms of memory and neuronal survival in neurons vulnerable to Alzheimer's disease. *Maturitas* 34:S35–S52.
- Bulloch K. (2000). Regional neural regulation of immunity: anatomy and function. In: McEwen BS, ed. *Handbook of physiology. Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanism.* Oxford University Press. 353-379.
- Burgess LH., Handa RJ. (1992). Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology*, 131:1261-1269.
- Butler DG., Donaldson EM., Clarke WC. (1969). Physiological evidence for a pituitary-adrenocortical feedback mechanism in the cel (*Anguilla rostrata*). *Gen Com Endocrinol.* 12:173-176.

- Calfa G., Bussolino D., Molina VA. (2007). Involvement of the lateral septum and the ventral Hippocampus in the emotional sequelae induced by social defeat: role of glucocorticoid receptors. *Behav Brain*. 18:23-34.
- Callard GV., Chan SW. (1975). Negative feedback control of the lizard adrenal gland by corticosterone and aldosterone. *Gen. Comp Endocrinol Reviews*. 25:387-390.
- Carey MP., Deterd CH., de Koning J., Helmerhorst F., de Kloet ER. (1995). The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J Endocrinol*. 144:311-321.
- Carvajal AC. (2005). Estrés y Depresión: Una mirada desde la clínica a la neurobiología. *Revista médica*.
- Casadio A., Martin KC., Giustetto M., Zhu H., Chen M., Bartsc D. Bailey CH., Kandel ER. (1999). A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein. *Synthesis Cell*. 99:221-237.
- Castañeda P., Díaz G., Mora S., Fiedler J. (2013). Efecto del estrés sobre la plasticidad sináptica, la conducta y la capacidad de aprendizaje asociativo en un modelo animal. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UMCE, 2 Departamento de Bioquímica y Farm. U. Chile; 3
- Cenquizca LA., Swanson LW. (2006). Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *J. Comp Neurol*. 497:101-114.
- Charmandari E., Tsigos C., Chrousos G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*. 67:259-84.
- Conrad CD., Galea LA., Kurada Y., Mc Ewen Bs. (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci*.
- Critchlow V., Liebelt R., Ber SM., Mountcastle W., Lipscomb H. (1963). Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am. J. Physiol*. 205:807-815.

- Czeh B., Michaelis T., Watanabe T., Frahm J., De Biurrun G., Kampen V., Fuchs E. (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volumen, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad.* 98:12796.
- De Kloet ER. Oitzl MS., Joels M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosciences.* 22:422-426.
- Diamond DM., Park CR., Campbell AM., Woodson JC. (2005). Competitive interactions between endogenous LTD and LTP in the hippocampus underlie the storage of emotional memories and stress-induced amnesia. *Hippocampus.* 15:1006-1025.
- Dolorfo CL., Amaral DG. (1998b). Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 398:25-48.
- Dolorfo CL. y Amaral DG. (1998a). Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J. Comp Neurol.* 398, 49-82.
- Dubal DB., Shughrue PJ., M.E. Wilson ME., Merchenthaler I., Wise PM. (1999). Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors, *J Neurosci.* 19:6385–6393.
- Eichenbaum H. (2000). A cortical–hippocampal system for declarative memory. *Reviews in the Neurosciences.* 1:41-50.
- Elston GN., Rosa MG. (1998). La variación morfológica de las neuronas piramidales de la capa III de la vía occipitotemporal de la corteza visual mono macaco. 8:278-294.
- Engert F., Bonhoeffer T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature.* 399:66-70.
- Fox SE., Ranck JB., Jr. (1975). Localization and anatomical identification of theta and complex spike cells in dorsal hippocampal, formation of rats. *Experimental Neurology.* 49:299-313.
- Frostscher M. (1985). Mossy fibres form synapses with identified pyramidal basket cells in region of the guinea pig hippocampus: a combined Golgi

- electron microscope study, *J. Neurocytol.* in the non-adopted rat offspring. *Neuroscience.* 103:301-307.
- Fujioka A., Fujioka T., Ishida Y., Maekawa T., Nakamura S. (2006). Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience.* 141:907-915.
 - Fujioka T., Fujioka A., Tan N., Chowdhury GMI., Mouri H., Sakata Y., Nakamura S. (2001). Mild prenatal stress enhances learning performance.
 - Gabrielli JDE. (1998). Cognitive neuroscience of human memory. *Annual Review Psychology.* 49:87-115.
 - Galea LA., McEwen BS., Tanapat P., Deak T., Spencer RL., Dhabhar, FS. (1997). Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience* 81, 689–697.
 - González RB., DeLeon GC., Range YM., Claiborne BJ. (2001). Distribution of thorny excrescences on CA3 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *J Neurol.* 430:357-68.
 - González DM., Lopez CJ., González SL, Labombada FL. Garay L. (2002). Basis of progesterone protection in spinal cord neurodegeneration. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 83:199–209.
 - Guyton AC. (2001). *Tratado de fisiología médica.* Editorial mc Graw hill interamericana. 10 edición, España.
 - Habib KE., Gold PW., Chrousos GP. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 30:695-728.
 - Handa RJ., Burgess LH., Kerr JE., O'Keefe JA., (1994). Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Horm. Behav.* 28:464–476.
 - He J., Hoffman SW., Stein DG. (2004). Allopregnanolone, a progesterone metabolite, enhances behavioral recovery and decreases neuronal loss after traumatic brain injury, *Restor. Neurol. Neurosci.* 22:19–31.
 - Hebb DO. (1949). *The Organization of Behavior: a Neuropsychological Theory.* 335.

- Hebb DO. (1976). Physiological learning theory. *Journal of Abnormal. Child Psychology.* 4:309-314.
- Ishizuka N., Cowan M., Amaral D. (1995). *The journal of comparative neurology.* 362:17-15.
- Issason RL. (1982). Hippocampus. In the *Limbic System.* Ed. Plenum press. Second. Edition.
- Johansen JP., Cain CK., Ostroff LE., LeDoux JE. (2011) Molecular mechanisms of fear learning and memory *Cell.* 147:509-524.
- Justel N., Bentosela M., Mustaca A. (2009). Comportamiento sexual y ansiedad [Sexual behavior and anxiety]. *Revista Latinoamericana de Psicología.*
- Kessels RP., De Haan EH., Kappelle LJ., Postman A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews.* 35:295-303.
- Kim JJ., Diamond DM. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci.* 3:453-62.
- Kishi T., Tsumori T., Yokota S., Yasui Y. (2006). Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. *J Comp Neurol.* 496:349-368.
- Klauer KC., Meiser T., Naumer B. (2000). Training propositional reasoning. *The Quarterly Journal Experimental Psychology A, Human Experimental Psychology.* 53:868-95.
- Labombarda F., Gonzalez SL., Gonzalez DM., Guennoun R., Schumacher M., de Nicola AF. (2002). Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord *J Neurotrauma.* 19:343–355.
- Leranath C., Prange-Kiel J., Frick K., Horvath T. (2004). Low CA1 spine synapse density is further reduced by castration in male non-human primates. *Cerebral Cortex.* 14: 503-510.

- Luine V., Martinez C., Villegas M., Magarinos AM., McEwen BS. (1996). Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiol. Behav.* 59:27–32.
- Luine VN. (1994). Steroid hormone influences on spatial memory. *Ann NY Acad Sci.* 743:201–211.
- Luine VN., 2002. Sex differences in chronic stress effects on memory in rats. *Stress.* 5:205–216.
- Lupien SJ., Lepage M. (2001). Stress, memory, and the hippocampus: can't live with it, can't live without it. *Behavioural Brain Research.* 127: 137.
- Mac Donald JF., Jackson MF., Beazely MA. (2006). Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Critical Reviews in Neurobiology.* 18:71-84.
- Magariños MA., McEwen BS. (1995). Laboratory of Neuroendocrinology, Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York. *Neuroscience Vol.* 69, No. 1.
- Martin KC., Casadio A., Zhu H., Yaping E., Rose J C., Chen M., Bailey CH., Kandel ER. (1997). Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage *Cell.* 91:927-38.
- McEwen BS. (2000). Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry* 48:721-31.
- McEwen BS., Weiss J., Schwartz L. (1968). Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature.* 220: 911-912.
- McEwen BS. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:105-122.
- McLaughlin KL., Gomez J., Baran SE., Conrad CD. (2007). The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res.* 1161:56-64.

- McLay RN., Freeman SM., Zadina JE. (1998). Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes maze. *Physiol. Behav.* 63:933–937.
- Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyas AL. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neurosci.*102:527-540.
- Mizoguchi K., Yuzurihara M., Ishige A., Sasaki H., Chui, D.H., Tabira T., 2000. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J. Neurosci.* 20:1568–1574.
- Mohapel P., Armitage L., Hannesson DK., Corcorane ME. (1997). The effect of fimbria/fornix transections on perforant path kindling and mossy fiber sprouting. *Brain Res.* 778:186-93.
- Moore RY. (1975). Monoamine neurons innervating the hippocampal formation and septum: organization and response to injury, In R.L. Issacson and K.H. Pribram (Eds.), *The Hippocampus*, Vol. 1.
- Muller RU. (1996). A quarter of a century of place cells. *Neuron.* 17:813-822.
- Natelson BH., Ottenweller JE., Cook JA., Pitman D., McCarty R., Tapp WN. (1988). Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol. Behav.* 43:41-46.
- Neves SR., Tsokas P., Sarkar A., Grace EA., Rangamani P., Taubenfeld SM., Alberini CM., Schaff JC., Blitzer RD., Moraru II., Iyengar R. (2008). Neuroprotective properties of 17 β -estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice, *Synapse* 41:131-138.
- O'Keefe, J., Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brian Research.* 34:171-175.
- O'Keefe J., Nadel L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford Univ. Press (Clarendon), London/New York.

- Olivares PM., Toledo GC., Vera MY., Perez HT., Aboitiz DF. (2008). Efecto del estrés sobre el sistema nervioso central. Vol. 23, numero 1 y 2.
- Paxinos, George, and Charles Watson. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition.
- Pitkanen A., Pikkarainen M., Nurminen N. and Ylinen A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. Ann. N. Y. Acad. Sci. 911:369-391.
- Pitman DL., Ottenweller JE., Natelson BH. and Natelson BH. (1988). Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol. Behav.* 43, 47-55.
- Prendergast BJ., Kenneth GO, Irving ZC. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 40:1–5.
- Rachel E., Kevin D., Beck., Victoria N. (2002). Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Hormones and Behavior* 43: 48–59
- Retana MS., Bonilla JH., Vázquez PG., Domínguez SE., Martínez GJ., Velázquez MJ. (2003). Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 28:207-227.
- Rodríguez MA. (2003). Receptores de kainato. Función en la regulación de la transmisión sináptica gabérgica en el hipocampo. *Revista de Neurología.* 36:852-859.
- Roof RL., Hall ED. (2000). Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone, *J. Neurotrauma.* 17:367–388.
- Roozendaal B., Koolhaas JM., Bohus B. (1991). Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. *Physiol Behav.* 50:777-81.

- Sapolsky RM. (2003). Stress and Plasticity in the Limbic System. *Neurochemical Research*.28:1735–1742.
- Scharfman H., Rene H. (2007). Is more neurogenesis always better? *Science*. 315: 337-338.
- Schonreiter S., Lohmuller V., Huber H., Zanella A., Unshelm J., Frhrardt W. (2000).Effects of the CO2/O2-anesthesia on behaviour beta-endorphin and cortisol concentration of male piglets after castration, *KTBL-Shcr*: 137-45.
- Schumacher M., Guennoun R., Robert F., Carelli C., Gago N., Ghoumari A., Gonzalez Deniselle MC., Gonzalez SL., Ibanez C., Labombarda F., Coirini H., Baulieu EE., De Nicola AF. (2004). Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination, *Growth Horm. IGF Res*. 14:18–33.
- Scoville WB., Milner B. (1957). Los of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 20:11-21.
- Selye H. (1956). *The stress of life*. McGraw Hill.
- Shen J., Barnes CA., McNaughton BL., Skaggs WE., Weaver KL. (1997). The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells. *Journal of Neuroscience*. 17:6769-6782.
- Shors TJ. (2006). Stressful experience and learning across the lifespan. *Annual Review of Psychology*. 57:55-85.
- Singer CA., Figueroa-Masot XA., Batchelor RH., Dorsa DM. (2002). The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons *J. Neurosci*. 19:2455–2463.
- Singh M. (2001). Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex, *Endocrine* 14:407-415.

- Soria Fregozo. Pérez Vega (2012). Actin-binding proteins and signaling pathways associated with the formation and maintenance of dendritic spines. *J Neurol.* 27:421-431
- Soto MR., Alarcón S., Belmar J., Kusch P., Pérez H., Ruiz S., Hernández A. (1999). Prenatal protein restriction alters synaptic mechanisms of callosal connection in the rat visual cortex. *Dev Neurosci.*
- Squire LR., Zola-Morgan S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science.* 253:1380-1386.
- Sterkubg P., Eyer J. (1988). Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher S, Reason J, (eds.) *Handbook of life stress. Cognition and Health.* John Wiley y Sons. 629-649.
- Sunanda MSR, Raju TR. (1995). Effects of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons- a quantitative study. *Brain Res.* 639:312-317.
- Taylor SE., Klein LC., Lewis BP., Gruenewald TL., Gurung RA., Updegraff JA. (2000). Bio behavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychological Review.* 107:411-429.
- Trommald M, Hulleberg G (1997). Dimensions and density of dendritic spines from rat micrographs. *J Comp Neurol.* 76:2461-2473.
- Tzintli MM., Jacinto BP., (2009). Effect of chronic stress on the dendritic remodeling in the región CA3 hippocampale-Gnosis. Vol.7.Art.3.
- Verwer RW., Meijer RJ., Van UF., Witter MP. (1997). Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus.* 7:397-402.
- Vicens P., Redolat R., Carrasco MC. (2003). Aprendizaje especial y laberinto de agua: Metodología y aplicaciones. *Psicothema.* 15:539-544.
- Vyas A., Mitra R., Shakaranarayana R., Chattarji S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22: 6810-3818.

- Wang RF., Spelke E. (2002). Human spatial representation: insights from animals. *Trends in Cognitive Neuroscience*. 6:376-382.
- Watanabe Y., Gould E., McEwen B.S. (1992b). Stress induces atrophy of
- Watanabe Y., Gould E., Cameron HA., Daniels DC., McEwen BS. (1992a). Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus*. 2:431–435.
- Wise PM., Dubal DB., Wilson ME., Rau SW., Bottner M. (2001). Minireview: neuroprotective effects of estrogen—New insights into mechanisms of action. *Endocrinology*. 142:969-973.
- Wise PM. (2013) Estrogens and neuroprotection, *Trends Endocrinol. Metab.* 13:229-30.
- Wood ER., Dudchenko PA., Eichenbaum H. (2001). Cellular correlates of behavior. *International Review Neurobiology*. 45:293-312.
- Yang SH., Liu R., Wu SS., Simpkins JW. (2003). The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia, *Ann. NY Acad. Sci.* 1007:101-107.
- Ziegler DR. and Herman JP. (2002). Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat. *Integrp Biol.* 42:541-51.

ANEXO 1

Tabla 1

Resultados comparativos de rata hembra control y rata experimental de la longitud dendrítica total y el número de espinas dendríticas, de las neuronas piramidales CA3 Dorsal y CA3 ventral.

Tabla 1: se muestra la longitud dendrítica total (LDT) del árbol apical y basal y el número de espinas de hipocampo dorsal y ventral de rata hembra. \pm (error estándar), * Cambios respecto del grupo control (tratamiento $F_1 = 5.847$, $P = 0.0253$).


		CA3 Dorsal		CA3 Ventral	
		control	Estrés	control	Estrés
LDT	Basal	1502.16 \pm 42.73	1322 \pm 34.45*	1673.33 \pm 53.63	1450.83 \pm 51.40
	Apical	887.00 \pm 32.30	1060.33 \pm 36.37	1015.40 \pm 42.12	1086.50 \pm 43.28
Núm de espinas	Basal	5.339 \pm 0.16	5.03 \pm 0.13	5.00 \pm 0.14	5.57 \pm 0.15
	Apical	5.04 \pm 0.18	5.04 \pm 0.16	5.20 \pm 0.15	5.56 \pm 0.20

Tabla 2

Resultados comparativos de rata macho control y rata experimental de la longitud dendrítica total y el número de espinas dendríticas, de las neuronas piramidales CA3 Dorsal y CA3 ventral.


		CA3 Dorsal		CA3 Ventral	
		control	Estrés	control	Estrés
LDT	Basal	1430.78 ± 48.15	1354.00 ± 63.74	1519.33 ± 62.53	1530.16 ± 64.57
	Apical	1105.75 ± 39.61	1090.83 ± 42.24	1128.333 ± 47.01	1152.33 ± 52.75
Núm de espinas	Basal	5.01 ± 0.15	4.84 ± 0.17	5.548 ± 0.17	5.22 ± 0.15
	Apical	5.05 ± 0.16	4.71 ± 0.14	4.94 ± 0.17	4.60 ± 0.14

Tabla 2: se muestra la longitud dendrítica total (LDT) del árbol apical y basal y número de espinas dendríticas de hipocampo dorsal y ventral de rata macho. ± (error estándar).