BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Efectos de la lesión estereotáxica en el hipocampo sobre la expresión de la densidad de espinas dendríticas y la función reproductiva de ratas hembras Long-Evans”

Tesis presentada para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Biológicas

PRESENTA
BIOL. ESTRELLA DEL MAR CASTILLO LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS**: Dra. en C. Lorena Milflores Flores**

COODIRECTOR DE TESIS**: Dr. en C. Ubaldo Quiróz López**

COMITÉ TUTORIAL

Dra. en C. Rosalina Reyes Luna

Dr. en C. Juan Carlos Flores Alonso

REVISOR

Dr. en C. Rubén Antonio Vázquez Roque

ENERO 2023

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

H. Puebla de Z. a 14 de diciembre de 2023

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado
PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

"Efectos de la lesión estereotáxica en el hipocampo sobre la expresión de la densidad de espinas dendríticas y la función reproductiva de ratas hembras Long-Evans"

Que presenta la estudiante **Estrella del Mar Castillo López** con número de matrícula **221470303**, aspirante al grado de **Maestra en Ciencias Biológicas,** de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: **"Estructura y funcionamiento de los seres vivos"** notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: **Dra. en C. Rosalina Reyes Luna**

Tutor Externo: **M. en C. Juan Carlos Flores Alonso**

Revisor: **Dr. en C. Rubén Antonio Vázquez Roque**

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA · FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS · SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO · 1578 ·
RECIBIDO
18 ENE 2024

Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Facultad de Ciencias Biológicas
Edif. 1 BIO 1, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7097, 7085, 7084 y 7086

DECLARATORIA DE TRABAJO ORIGINAL

Nombre del Autor: Estrella del Mar Castillo López

Número de matrícula: 221470303

Programa: Maestría en Ciencias Biológicas de la BUAP

Título de la Tesis: "Efectos de la lesión estereotáxica en el hipocampo sobre la expresión de la densidad de espinas dendríticas y la función reproductiva de ratas hembras Long-Evans"

Lugar: H. Puebla de Zaragoza

Fecha: 6 de diciembre 2023

Por medio de la presente

DECLARO QUE: El documento de tesis presentado para la obtención de grado de Maestra en Ciencias Biológicas es una obra original que ha sido desarrollado íntegramente, que no se han utilizado ideas, formulaciones, citas, ilustraciones diversas u otra información de fuentes en medios escritos o electrónicos, sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor (es). Además, el documento no infringe los derechos de propiedad intelectual ni otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente. Del mismo modo, la tesis no es plagio y no ha sido usada para otro trámite de graduación por lo cual asumo frente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y ante la instancia que corresponda cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la falta de originalidad del contenido de la tesis terminal presentada en conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Biól. Estrella del Mar Castillo López

Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes.

- *Santiago Ramón y Cajal*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento y apoyo brindado durante la realización de este proyecto a través del número de beca 798636.

A la Maestría en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas incluida en el PNPC (Clave 005671), por su apoyo durante mis estudios.

A mis padres que han sido un pilar fundamental en mi vida, gracias por sostenerme, y por su amor. A mi María y mi Juanita, aunque no estén físicamente vivirán por siempre en mi corazón.

A mis directores de tesis, la Dra. Lorena Milflores Flores, gracias por aceptarme dentro de su equipo de trabajo, por la confianza y el apoyo para la elaboración de esta tesis.

Al D. en C. Ubaldo Quiróz López, por su gran apoyo y paciencia desde mis primeros pasos por el laboratorio, gracias por su confianza y el cariño que le tiene a sus alumnos, por alentarnos día a día. Usted es un ejemplo de Investigador a seguir, gracias por sus palabras de aliento, por permitirme trabajar a su lado, sus conocimientos y su amistad.

Al Biól. Arturo Rodríguez Rubí gracias por todo tu apoyo incondicional, por ser un amigo y hermano, por estar soportando mis días más caóticos y por todos los momentos divertidos que pasamos en casa.

Aprovecho también para externar mis más sinceros agradecimientos a mi comité tutoral conformado por la **Dra. Rosalina Reyes Luna** y el **D. en C. Juan Carlos Flores Alonso,** por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo.

Al Dr. **Rubén Antonio Vázquez Roque** por sus conocimientos invaluables que me brindaron para llevar a cabo esta investigación y su apoyo.

Al Dr. Hernán Lara, Dr. Alfonso Paredes, Dra. Monika Greiner, por permitirme una estancia de investigación en el laboratorio de Neurobioquímica de la Universidad de Chile, por la acertada orientación, el soporte, y discusión crítica que me permitió un buen aprovechamiento en el trabajo realizado y que esta tesis llegará a un buen término.

Al Dr. Gonzalo Flores Álvarez y a todo el laboratorio de Neuropsiquiatría.

A mis amigos: Jorge, Jess, Dani, Fer, Marco, Danielle, Oliver y a todo el equipo del laboratorio de Histofisiología. Gracias por su apoyo, por tantas horas de alegría, por cada una de las experiencias, por sus consejos y por qué sin ustedes mi vida no sería igual.

Sicarú Shavizende

Sicarú Shavizende
ne ca badudxaapa zuchaahui' xti';
galaa dxi hruunda bigarii,
huashinni hruzaani' bacuzagui.

Sicarú Shavizende
ne ca binnigola xti';
hriasaca' nuuxcanda
ne hribica' sha'na' yága bacánda.

Sicarú Shavizende
ne ca gunaa' hruni dxi'ña',
luguiaa hrutooca', ne hrizi'ca',
cadi nizi zubásica'.

Sicarú Shavizende,
xquidxi binnizá,
binni hriní' diidxazá.

¡Sicarú Shavizende!

(Gabriel López Chiñas)

Juchitán hermoso

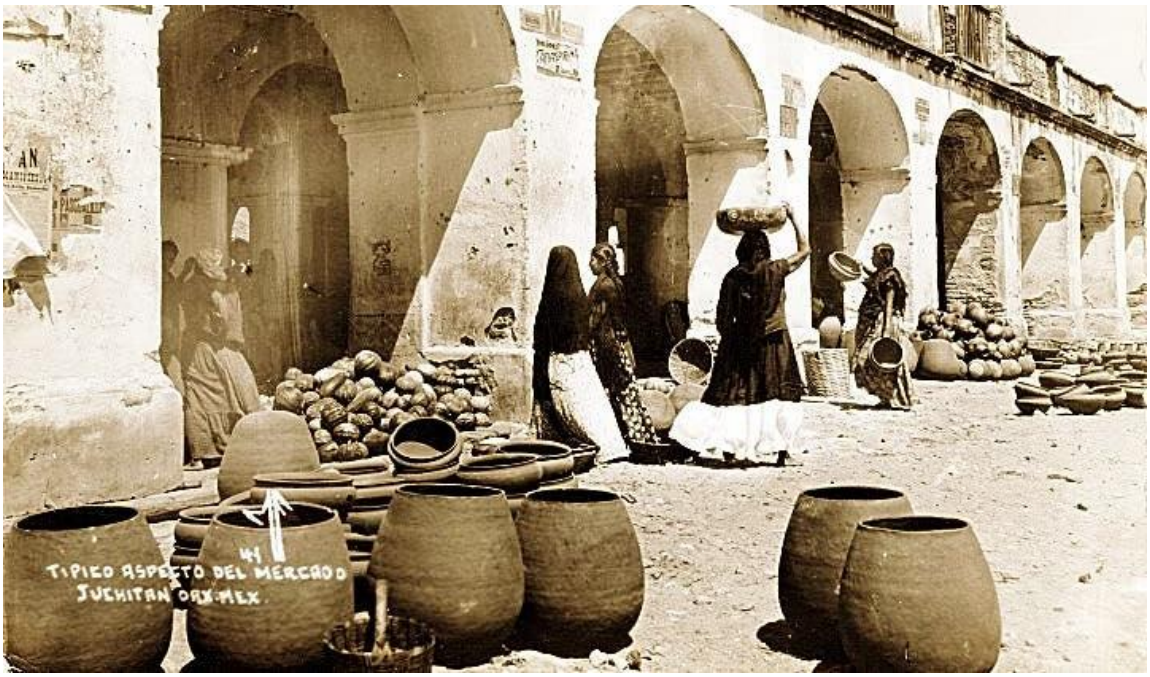
Juchitán hermoso
con sus muchachas elegantes;
al medio día cantan las cigarras,
de noche brillan las luciérnagas.

Juchitán hermoso
con sus ancianos;
se levantan de madrugada
y descansan a la sombra del árbol.

Juchitán hermoso
con sus trabajadoras,
en el mercado venden, y compran,
quietas nunca están.

Juchitán hermoso,
tierra de gente istmeña,
gente que habla el zapoteco.

¡Juchitán hermoso!



INDICE GENERAL

Abreviaturas 9
Índice de figuras 10
RESUMEN 11
1. INTRODUCCIÓN 12
1.1 Aparato Reproductor femenino 13
1.1.1 Ovarios 14
1.1.2 Control endócrino en el crecimiento folicular 14
1.1.3 Control auto/paracrino del crecimiento folicular 15
1.1.4 Folículo ovárico 16
1.1.5 Ciclo estral 18
1.2 Inervación Ovárica 19
1.3 Vías neurales entre los ovarios y el SNC 21
1.4 Hipocampo 22
1.4.1 Circuito trisináptico 23
1.4.2 Aferencias y eferencias del hipocampo 24
1.5 Espinas dendríticas 26
1.5.1 Plasticidad en espinas dendríticas 28
1.5.2 Memoria y aprendizaje 30
1.5.3 Cambios que se han reportado como consecuencia de la lesión del hipocampo tanto en edad neonatal como adulta. 31
2. ANTECEDENTES 32
3. JUSTIFICACIÓN 36
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 36
5. HIPÓTESIS 36
6. OBJETIVOS 37
6.1 Objetivo general 37
6.2 Objetivos específicos 37
7. MATERIAL Y MÉTODOS 38
7.1 Declaración ética 39
7.2 Cirugía estereotáxica 39
7.3 Estudios conductuales 40
7.3.1 Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NORT) 40
7.3.2 Actividad locomotora 42
7.3.3 Prueba de ansiedad 42

7.4 Pruebas de ciclicidad vaginal 42
7.4.1 Tinción Hematoxilina- Eosina 43
7.5 Pruebas de fertilidad 43
7.6 Sacrificio de animales 43
7.6 Análisis histológico de los ovarios y del crecimiento folicular 44
7.7 Determinación de hormonas esteroides sexuales 45
7.8 Tinción de Golgi-Cox 45
7.8.1 Impregnación de cortes de cerebro con solución Golgi-Cox 46
7.9 Densidad y tipificación de espinas dendríticas 46
7.10 Análisis estadístico 47
8. RESULTADOS 47
8.1 Parámetros de pubertad 48
8.2 Pesos ováricos 49
8.3 Ciclicidad vaginal 50
8.4 Pruebas de fertilidad en ratas Long-Evans 52
8.5 Morfologia ovárica 53
8.5.1Población folicular 53
8.5.2 Crecimiento folicular 54
8.6 Pruebas conductuales 56
8.6.1 Reconocimiento de objetos novedosos después de la lesión, en ratas de 30 días de edad 56
8.6.2 Efecto de la lesión sobre la actividad locomotora en ratas Long-Evans 58
8.7 Efecto de la lesión sobre secreción de hormonas esteroideas en ratas Long-Evans 58
8.8 Efecto de la lesión sobre secreción de gonadotropinas en ratas Long-Evans 60
8.9 Verificación de la lesión 61
8.9 Efecto de las lesiones sobre la neuroplasticidad estructural en regiones del hipocampo de ratas Long-Evans 61
9. DISCUSIÓN 66
10. CONCLUSIONES 71
12. REFERENCIAS 73
12. ANEXOS 87

Abreviaturas

Ach	Acetilcolina
SNC	Sistema Nervioso Central
FSH	Hormona foliculoestimulante
LH	Hormona luteinizante
GnRH	Hormona gonadotrópica
AChE	Acetilcolinesterasa
PNO	Plexo nervioso ovárico
NOS	Nervio ovárico superior
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
NE	Norepinefrina
NAcc	Núcleo accumbens
AVT	Área ventral tegmental
GD	Giro dentado
i.p	Intraperitoneal
CA	Cuerno de Amón
E2	Estradiol
EC	Corteza entorrinal
HD	Hipocampo Dorsal
HI	Hipocampo Intermedio
HV	Hipocampo Ventral
LTP	Potenciación a largo plazo
LS	Septum lateral
LSr	Septum lateral rostral
LSc	Septum lateral caudal
LSv	Septum lateral ventral
LSd	Septum lateral dorsal
MPN	Núcleo preóptico medial
PVZ	Zona periventricular hipotalámica
AHN	Núcleo hipotalámico anterior
VMH	Núcleo hipotalámico ventromedial
MB	Cuerpo mamilar
DPS	Densidad postsináptica proteica
ED	Espinas dendríticas
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
NMDA	*N*-metil- d -aspartato
LTD	Depresión a largo plazo
NGF	Factor de crecimiento Nervioso
E2	Estradiol
P4	Progesterona

Índice de figuras

Figura 1. Representación del aparato genital de una rata hembra. 13
Figura 2. Corte sagital del cerebro de la rata donde de muestra la ubicación del hipotálamo 15
Figura 3. Fluctuaciones de las hormonas estradiol, progesterona y hormona luteinizante a lo largo del ciclo estral de una duración promedio de 4 a 5 días de la rata. 18
Figura 4. Ciclo estral de la rata hembra. 19
Figura 5. Esquema que muestra el origen y la distribución del PNO en la rata hembra. 20
Figura 6. Esquema simplificado de las conexiones neuronales. 22
Figura 7. Esquema de cerebro de rata, mostrando los ejes septotemporales y transversales de la formación del hipocampo. 23
Figura 8. Circuito trisináptico. 24
Figura 9. Conexiones extrínsecas del hipocampo. 26
Figura 10. Morfología de las espinas dendríticas. 28
Figura 11. La potenciación a largo plazo (LTP). 30
Figura 12. Diagrama de trabajo. 38
Figura 13. Prueba de NOR. 41
Figura 14. Esquema de la caja usada para la prueba de actividad locomotora. 42
Figura 15. A) Administración vía ip. de ketamina-xilacina. B) Perfusión de la rata, con solución salina (Hartmann) 44
Figura 16. Comparación de edad de apertura vaginal y primer estro en ratas hembras púberes con lesión en hipocampo dorsal, ventral, lesión falsa y grupo testigo absoluto de la cepa Long-Evans. 48
Figura 17. Comparación de los pesos ováricos de ratas hembras púberes con lesión en hipocampo ventral 49
Figura 18. Células representativas de cada etapa del ciclo estral. 50
Figura 19. Pruebas de fertilidad en ratas de 90 días de edad 52
Figura 20. Población folicular. 53
Figura 21. Crecimiento folicular. 54
Figura 22. Fotomicrografías de la morfología ovárica. 55
Figura 23. NORT después de la lesión a los 30 días de vida postnatal. 57
Figura 24. Actividad locomotora después de la lesión a los 30 días de vida postnatal de la cepa Long-Evans.. 58
Figura 25. Concentraciones séricas de hormonas esteroideas. 59
Figura 26. Concentraciones séricas de hormonas gonadotrópicas. 60
Figura 27. Fotografía de secciones coronales del hipocampo dorsal o ventral. 61
Figura 28. Neuroplasticidad estructural del hipocampo dorsal de ratas Long-Evans con LHV. 62
Figura 29. Neuroplasticidad estructural del hipocampo ventral de ratas Long-Evans con LHD. 64
Figura 30. Fotomicrografías representativas de segmentos distales del árbol dendrítico basal de neuronas piramidales. 65

RESUMEN

Las funciones del ovario son reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y por una vía neural directa entre el sistema nervioso central y los ovarios. Por otra parte, el hipocampo aún no se considera que participe en la regulación de la reproducción, sin embargo, diversos estudios han mostrado que, en patologías neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Huntington, se observan disfunciones cognitivas que se asocian con la neurodegeneración del hipocampo, interesantemente también se presentan disfunciones gonadales. El objetivo de este estudio fue analizar los efectos de la lesión del hipocampo dorsal o ventral en la rata hembra sobre la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales hipocampales de las áreas CA1, CA3 y GD, el inicio de la pubertad y el crecimiento folicular. Se usaron ratas hembras prepúberes de la cepa Long-Evans de 21 días de edad. Las lesiones del hipocampo ventral o dorsal se realizaron mediante cirugía estereotáxica al igual que sus respectivos controles, un quinto grupo se usó como control absoluto. A los 30 días de edad todos los grupos se sometieron a pruebas de reconocimiento de objetos novedosos (NORT). Se registró la edad a la que presentaron apertura vaginal y se sacrificaron al primer estro vaginal. Los resultados de la prueba de memoria NORT mostraron una disminución en la memoria a corto y largo plazo en los animales de los grupos con lesión del hipocampo ventral o dorsal en comparación con sus respectivos controles y al grupo control absoluto. De igual manera presentaron una disminución significativa en la densidad de espinas dendríticas en la región CA1 en comparación con la región CA3, un retraso en la edad de apertura vaginal, disminución en el número de folículos ováricos e incremento de la atresia. Estos resultados apoyan la idea de que el hipocampo participa, no solo en los procesos de memoria y aprendizaje, sino también en la regulación de las funciones gonadales y la reproducción.

Palabras clave: CA1, CA3, Giro dentado, ventral, dorsal.

1. INTRODUCCIÓN

El funcionamiento del ovario en mamíferos, tal como ocurre con otros órganos, depende de la acción establecida de distintos tipos de señales moleculares de tipo hormonal como neuronal. La reproducción en mamíferos está regulada principalmente por el eje neuroendocrino hipotálamo-pituitaria-gónadas (HPG). Aunado a este eje existe una vía neural paralela que permite una comunicación bidireccional entre los ovarios y diversas estructuras del Sistema Nervioso Central (SNC) cuyo papel es la regulación fina de las funciones gonadales (Gerendai *et al.,* 2005). En las últimas décadas, se ha fortalecido la idea de un vínculo neuronal directo entre los ovarios y el SNC. Este enlace contiene vías aferentes y eferentes y puede ajustar la actividad funcional o la capacidad de respuesta de las gónadas. El regulador clave del eje hipotálamo-pituitario-gonadal es la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) secretada por el hipotálamo (Kang *et al.,* 2003), se sabe que existe una mayor concentración de GnRH en el hipotálamo medio basal (HMB) del lado derecho; esta diferencia se mantiene al realizar una ovariectomía unilateral derecha, la diferencia en las concentraciones de GnRH entre ambos lados del HMB desaparecen al realizar la ovariectomía izquierda o la bilateral (Gerendai *et al.,* 1978). Numerosos trabajos reportan la existencia de asimetrías reproductivas, por ejemplo, Domínguez *et al.,* (2003) mostraron que, en la rata adulta, el ovario izquierdo libera más ovocitos que el ovario derecho. En otros estudios se ha observado un aumento de folículos sanos en el ovario izquierdo que en el ovario derecho (Domínguez, Morales y Cruz, 2003; Castillo, 2020). Se ha planteado la idea de que las asimetrías reproductivas reportadas en las últimas décadas podrían estar asociadas a la cantidad de conexiones neurales que reciben los ovarios. En este sentido, se sabe que la inyección de marcadores anterógrados en los ovarios muestra que la tinción de algunas estructuras cerebrales es mayor cuando se administra el marcador en el ovario izquierdo que en el derecho (Toth *et al.,* 2007). Previamente, Gerendai *et al.,* (1998) habían demostrado que las estructuras marcadas en el SNC están en la médula espinal (células de la columna intermediolateral, en el asta dorsal y en el núcleo autónomo central) y en el encéfalo (núcleo paraventricular, hipotálamo lateral y dorsal y núcleo central de la amígdala). Utilizando la misma técnica, mostraron la existencia de al menos dos rutas separadas en la vía neural que comunica los ovarios con el SNC, una de las cuales sería la ruta vagal, la cual permitiría la comunicación entre los ovarios y el núcleo parapiramidal, grupos celulares A1, A5, A7 el área postrema, el núcleo del tracto solitario, el complejo vagal dorsal, el núcleo ambiguo, el núcleo de Barrington, el locus coeruleus, el gris periacueductal, el hipotálamo dorsal, y una segunda ruta en donde participan los núcleos del rafe caudal, núcleo paraventricular y el hipotálamo lateral, sin pasar por los núcleos vagales. Estas estructuras no

se marcan si al animal previamente se le realiza una sección del nervio vago (Gerendai *et al.,* 2000). Todo lo anterior, nos permite considerar la posibilidad de que la técnica del trazado transneuronal no revela todas las estructuras involucradas en las vías neurales existentes entre el SNC y los ovarios, y podrían existir otras rutas no descritas hasta el momento, que pudieran ser reveladas mediante otras técnicas o abordajes experimentales tales como las hemicastraciones, desnervaciones quirúrgicas y/o farmacológicas, etc. Por ejemplo, previamente nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en la rata macho prepúber, el bloqueo de la vía neural derecha, entre el testículo derecho y el SNC, mediante la orquidectomía unilateral, provoca en la etapa adulta una disminución de la arborización dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (Santos, 2017).

El hipocampo, una estructura subcortical importante en el cerebro de los mamíferos, está involucrado en varios tipos de procesos de aprendizaje y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo, además, del estrés.

1.1 Aparato Reproductor femenino

Todo el aparato reproductivo femenino, excepto la vulva (parte externa), se sitúa en la cavidad pélvica abdominal y se encuentra sujeto por los ligamentos del peritoneo (membrana que reviste la cavidad abdominal), consta de dos ovarios, dos oviductos, dos cuernos uterinos, cuerpo del útero, cérvix, vagina y vulva. Una vez alcanzada la pubertad, las principales funciones del aparato reproductor femenino son generar óvulos, producir hormonas sexuales y llevar a término la gestación y el parto (Urroz, 1991; Caravaca *et al.,* 2008). El aparato reproductor de la rata hembra es inmaduro al nacer y se convierte en una unidad reproductiva completamente funcional para el día 42 de vida postnatal (figura 1), mientras que el ovario se considera maduro una vez que la rata ha experimentado al menos dos ciclos ovulatorios, y esto típicamente ocurre por el día 42 de vida postnatal (Quezada, 1997; Picut, y Remick, 2016).

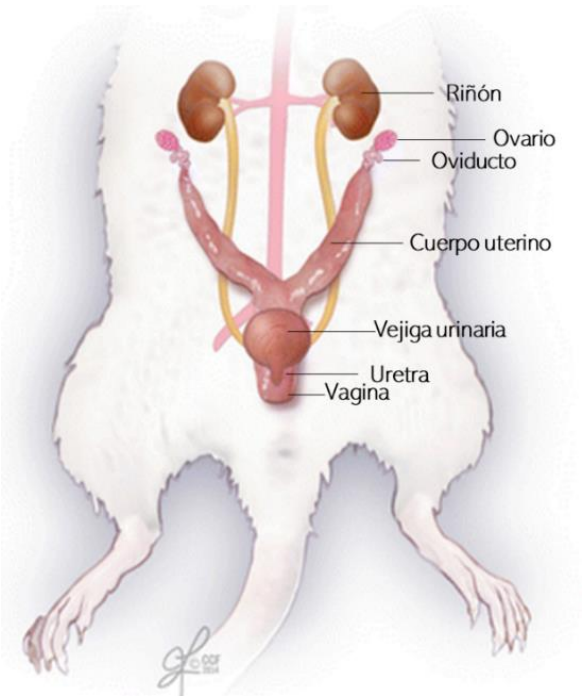


Figura 1. Representación del aparato genital de una rata hembra (Modificado de Kwiecien, 2015).

1.1.1 Ovarios

Son las gónadas femeninas, que se localizan a ambos lados de la entrada de la pelvis, suspendidos del abdomen por el ligamento ancho del peritoneo llamado mesovario y a la pared pélvica por el ligamento suspensorio, lugar donde transitan vasos y nervios ováricos (Ross y Pawlina, 2007; Caravaca *et al.,* 2008).

En el ovario se distinguen dos capas, la capa cortical en donde se da lugar el desarrollo de los folículos y ovocitos y en la que se encuentran las células secretoras de hormonas (Caravaca *et al.,* 2008; Matorras, Hernández y Molero, 2008), y una segunda capa medular situada en el centro del ovario y contiene tejido conjuntivo laxo, vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Ross y Pawlina, 2007).

El ovario de la rata llega a ser morfológicamente funcional para el día 42 de vida posnatal momento en el que hay cuerpos lúteos que representan al menos dos ovulaciones, bajo la influencia de las hormonas gonadotrópicas de la adenohipófisis, a partir de este momento, el ovario se transforma en esta unidad que permite una gran cantidad de fenómenos cíclicos (Urroz, 1991; Picut y Remick, 2016).

1.1.2 Control endócrino en el crecimiento folicular

El eje hipotálamo-hipófisis-ovario, se rige por la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual secreta a nivel de la adenohipófisis a las hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) (figura 2), la FSH es la encargada del crecimiento de los folículos ováricos y la producción de estrógenos. La LH se encarga de la ovulación, de la formación del cuerpo lúteo y de la síntesis de estrógenos y progesterona; estas hormonas se liberan al torrente sanguíneo donde alcanzan sus órganos blanco (como las gónadas) (Gómez y Paniagua, 2002), por medio de receptores de membrana. Ambas hormonas son sintetizadas y secretadas por las mismas células hipofisarias, las gonadotropas, localizadas en la porción lateral de la glándula pituitaria, y responden a la estimulación pulsátil de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropina (Palermo, 2007).

En los folículos antrales, la FSH promueve el crecimiento y la diferenciación de las células somáticas hasta la fase preovulatoria, asegurando que eventualmente adquieran sensibilidad a la LH, el desencadenante principal de la ovulación y la maduración de los ovocitos y estimula las células foliculares y el cuerpo lúteo para que produzcan progesterona (Moore, Persaud y Torchia, 2008; Albertini, 2014). El cuerpo lúteo además de la producción de estrógenos y de progesterona, también produce inhibina que permite una retroalimentación negativa con la

adenohipófisis y el hipotálamo, lo que inhibe la producción de FSH y LH (Jara, 2001; Hoffman *et al.,* 2009; Pacheco, 2010).

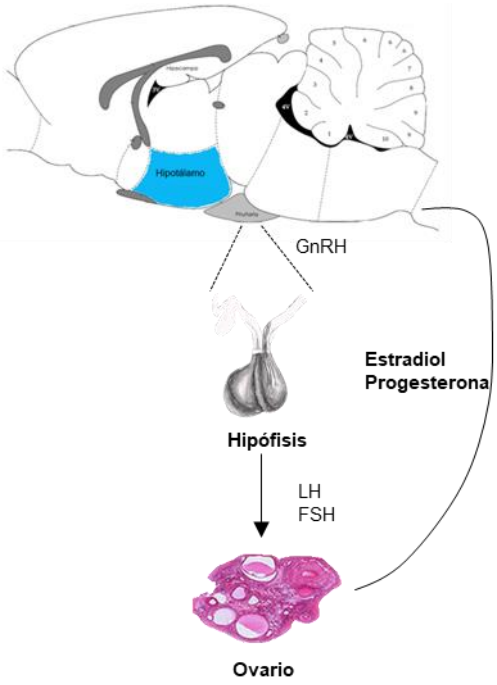


Figura 2. Corte sagital del cerebro de la rata donde de muestra la ubicación del hipotálamo (Modificado de Paxinos y Watson, 2007). Eje hipotalámico adenohipofisiario ovárico de rata. GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina, LH: Hormona luteinizante, FSH: Hormona foliculoestimulante. La liberación de GnRH promueve la segregación de FSH y LH para la estimulación de secreción de los esteroides del ovario (Modificado de Tapia y Anaya, 2016).

1.1.3 Control auto/paracrino del crecimiento folicular

La regulación del desarrollo folicular es un proceso complejo e implica interacciones entre factores endocrinos (gonadotropinas) y reguladores intraováricos (esteroides sexuales, y factores de crecimiento) en el control del destino de las células foliculares (es decir, proliferación, diferenciación y apoptosis) (Asselin *et al.,* 2000).

Sin embargo, el desarrollo folicular es considerado un proceso poco eficiente ya que cerca del 70-99% de los folículos degenera antes de llegar a ovular por un proceso denominado atresia folicular, este proceso permite asegurar las condiciones óptimas del ovocito cuando sea ovulado (Hsueh *et al.,* 1994).

El funcionamiento del crecimiento folicular depende en gran medida de la interacción de señales moleculares, hormonales y neuronales. Se ha observado que la presencia de todo el sistema de síntesis, liberación y degradación de la acetilcolina (ACh) en el ovario, molécula que

puede actuar como un neurotransmisor clave en el sistema nervioso central y periférico. Sin embargo, el papel de la ACh puede ser más amplio porque también puede funcionar como una molécula de señalización autocrina o paracrina en una variedad de tejidos no neuronales. En estudios tanto en roedores, primates y humanos, se encontró Acetilcolinesterasa (AChE) en células de la granulosa (CG), en mayor cantidad de esta enzima en folículos de mayor tamaño en comparación a los preantrales, sugiriendo la participación local de este sistema en el desarrollo folicular (Fritz *et al.,* 1999). Así mismo, se ha descrito la presencia de los receptores muscarínicos (M) acoplados a proteína Gq de distintos tipos: M1, M3 y M5, tanto en células de la granulosa (M1 y M5) como en el ovocito (M3) en ovarios de primates humanos y no humanos (Fritz *et al.*, 1999; Mayerhofer y Fritz 2002). Con relación a su funcionalidad, la activación de estos receptores con análogos de ACh, provocan un incremento en las concentraciones de calcio intracelular libre, a través de su movilización de depósitos intracelulares (Mayerhofer *et al.,* 1992). Eventualmente, se produce una hiperpolarización de membrana que permite la apertura de canales de potasio operados por calcio y otros canales operados por voltaje, que permiten que las gonadotropinas induzcan la producción de esteroides (Mayerhofer y Kunz, 2005; Kunz *et al.,* 2002), lo que da cuenta de un posible rol regulatorio de la ACh en ovario en la esteroidogénesis, a través de un control de tipo auto/paracrino. Estudios realizados en ratas expuestos al estrés por frío aumenta la actividad simpática y los niveles de noradrenalina (NA) en el ovario, este aumento está relacionado con alteraciones en el desarrollo folicular, como la disminución de folículos secundarios y la aparición de folículos con una capa de teca hipertrófica (Zangeneh *et al.,* 2011, Park *et al.* 2012; Benítez *et al.,* 2021). Además, la evidencia reciente respalda la presencia de un sistema colinérgico intraovárico ubicado en las células de la granulosa (GC) e involucrado en el desarrollo de los folículos ováricos y la ovulación (Riquelme *et al.,* 2019). Todo lo anterior, nos permite plantear que, en el ovario tanto el sistema noradrenérgico como el colinérgico, regulan las funciones ováricas. Probablemente trabajando juntos o participando de manera equilibrada para regular la función ovárica, similar a la regulación autónoma de muchos órganos internos del cuerpo.

1.1.4 Folículo ovárico

En los mamíferos, los mecanismos neuroendócrinos que controlan la formación de los folículos ováricos y su desarrollo son muy parecidos, por lo que los murinos son un excelente modelo biológico para estudiar estos procesos. La unidad funcional básica en el ovario es el folículo ovárico que está compuesto por células somáticas y el ovocito que se desarrolla y alcanzan la madurez ovulatoria dentro de los folículos (Palma, 2008).el crecimiento Los dos tipos de

células somáticas primarias en el folículo ovárico son las células de la teca y las células de la granulosa. Estos dos tipos de células somáticas son el sitio de acción y síntesis de una serie de hormonas que promueven una compleja regulación del desarrollo folicular. La proliferación de estos dos tipos de células es en parte responsable del desarrollo del folículo ovárico antral. Las células de la granulosa son células que se diferencian activamente con varias poblaciones distintas (Palermo, 2007). El folículo se caracteriza por poseer 2 funciones principales: La producción de hormonas y ovocitos competentes para ser fecundados, estas funciones son realizadas por los folículos antrales, que se caracterizan por poseer una pared interna de células de la granulosa rodeadas por una lámina basal y que las separa de los tejidos de origen mesenquimatoso. Dependiendo de su estado de desarrollo folicular, puede poseer otros componentes, como: antro, zona pelúcida, y tecas. Además de las células tecales y de la granulosa, el folículo está rodeado por fibras musculares lisas y células de tejido conectivo, que recibe el nombre de teca externa. (Rodríguez, 2005; Filipiak, Viqueira y Bielli, 2016). Existen dos clasificaciones de folículos ováricos, los folículos primordiales (en reposo) y los folículos en crecimiento; estos últimos presentan cuatro estados de crecimiento: folículo primario unilaminar, folículo primario multilaminar, folículo secundario (antral) y folículo de Graaf (maduro), los dos últimos, es decir, los folículos secundarios y de Graaf (pero no necesariamente es el folículo dominante) requieren de la hormona FSH para su desarrollo, por otro lado, los folículos primordiales y los dos tipos de folículos primarios se forman debido a factores locales desconocidos tal vez elaborados por las células foliculares (Gartner y Hiatt, 2011).

Estudios realizados en ratas se observa que la foliculogénesis inicia aproximadamente 36 horas después del nacimiento**,** antes de este tiempo, se forman de 1 a 2 folículos, a las 48 horas después del nacimiento, se han observado aproximadamente 1300 folículos por ovario (Malamed, Gibney y Ojeda, 1992); y en la pubertad se ha observado alrededor de 5000 folículos primarios (Crisp, 1992). En la rata, el desarrollo del folículo dura 19 días, que va desde un estado de "reposo" hasta que sucede la ovulación. Esto indica que durante la vida del folículo en crecimiento se ve expuesto al menos a cuatro "picos" preovulatorios de gonadotropinas (Domínguez *et al.,* 1991).

1.1.5 Ciclo estral

El ciclo estral en ratas y ratones tiene un promedio de 4 a 5 días y es un proceso repetitivo pero dinámico por el cual diferentes tipos de células aparecen y retroceden en oleadas a lo largo del ciclo, esto se rige por la secreción de hormonas hipofisarias y ováricas como la LH y FSH, estradiol, la progesterona y la prolactina respectivamente, reflejando diferentes niveles de liberación lo largo del ciclo estral (Figura 3) (Goldman *et al.,* 2007; Hamid y Zakaria, 2013; Cora, Kooistra y Travlos, 2015).

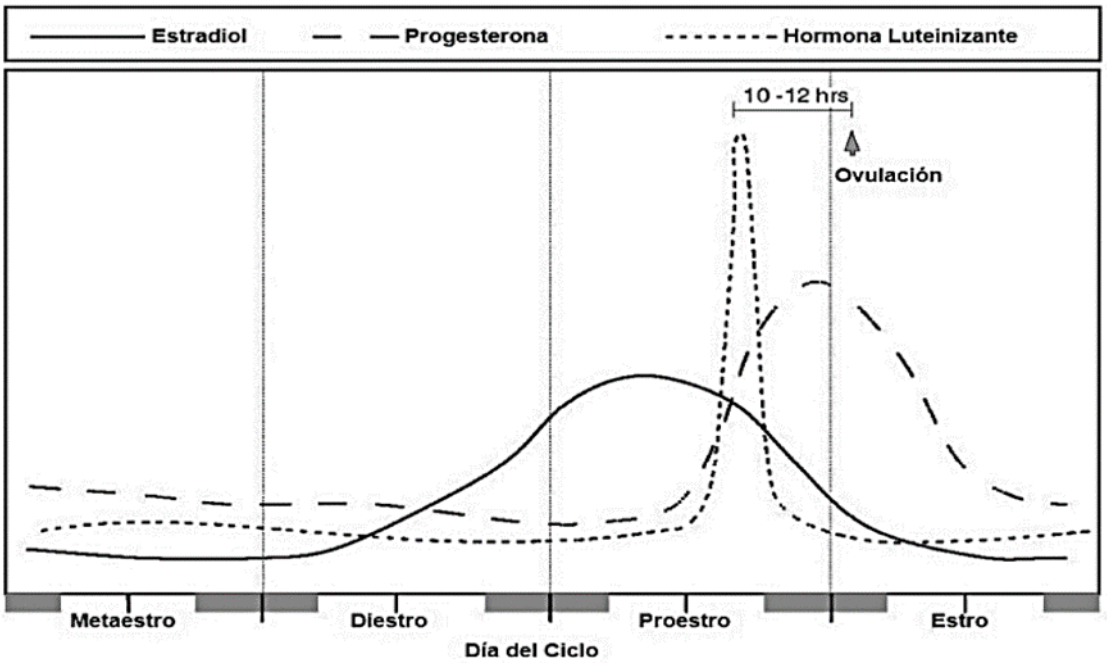


Figura 3. Fluctuaciones de las hormonas estradiol, progesterona y hormona luteinizante a lo largo del ciclo estral de una duración promedio de 4 a 5 días de la rata (Imagen tomada de Goldman *et al.,* 2007).

Generalmente se caracteriza por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. En un ciclo estándar de 4 días, el proestro es identificado por la presencia de grupos de células epiteliales nucleadas redondas, el proestro dura 1 día y es seguido por el estro vaginal, identificable rutinariamente por la presencia de un gran número de células cornificadas (o queratinizadas). El predominio de células cornificadas durará un día en un ciclo de 4 días, o puede estar presente durante 2 días consecutivos en un ciclo de 5 días. El metaestro es un término que se ha utilizado para describir un período de transición durante la primera parte del primer día del diestro (diestro 1), se caracteriza por una combinación de leucocitos y células epiteliales cornificadas y redondeadas. Estas células epiteliales redondas comúnmente persisten durante los días 1 y 2 del diestro, cuando coexisten con los leucocitos. El segundo día del diestro (diestro 2) también puede mostrar algunos pequeños grupos de células epiteliales nucleadas

y una gran cantidad de leucocitos que anunciarán el proestro un día después (véase figura 4) (Pichardo, Reyes y Suárez, 1999; Goldman, Murr y Cooper, 2007).

La ovulación es el proceso por el cual inicia con el comienzo del proestro hasta el final del estro (Marcondes, Biachi y Tanno, 2002) y puede ser rastreada mediante los cambios en las células del epitelio vaginal, las cuales caracterizan en cada etapa (Tapia y Anaya, 2016) y con el aumento del tamaño folicular, seguido de la protrusión del folículo desde la corteza ovárica debido a un ascenso de estrógenos, después de un pico de LH y FSH. Luego del pico de LH, la concentración de progesterona en el folículo preovulatorio continúa aumentando, hasta la ovulación (Caron, Goldstein, Savard, y Marsh, 1975; Antunes *et al.,* 2016). Este último es el responsable del mecanismo de retroalimentación negativa, induciendo la finalización del pico de LH, esto permite la maduración meiótica del ovocito y conduce a la ruptura de la pared del folículo (Hillier, 2001).

Figura 4. Ciclo estral de la rata hembra, caracterización de las células observadas en cada una de sus etapas (Altamirano, 1994).

1.2 Inervación Ovárica

El ovario recibe inervación simpática de dos fuentes: el nervio plexo ovárico (PNO), que se caracteriza por ser un nervio bilateral de 2.5 a 3 cm de longitud, que se extiende desde el ovario hasta el primer ganglio prevertebral. El PNO derecho e izquierdo pasan a lo largo de la arteria ovárica y se bifurca unos 3 mm antes de llegar al ovario, la otra rama viaja hasta el útero. Por otro lado, el nervio ovárico superior (NOS) está conectado con el ligamento suspensorio, (Figura 5) (Lawrence y Burden, 1980; Pastelín *et al.,* 2017). En general, las fibras del NOS inervan los componentes secretorios del ovario, como las glándulas intersticiales y los folículos, mientras que las fibras del PNO son principalmente perivasculares. La inervación simpática de las gónadas llega a través del nervio del plexo ovárico y del nervio ovárico

superior, a diferencia del nervio vago que transporta fibras sensoriales y parasimpáticas (Burden y Lawrence, 1977).

La inervación extrínseca de la glándula se ha demostrado estar involucrada en la regulación de las funciones específicas del ovario, como la esteroidogénesis y el desarrollo folicular temprano. Esta regulación se ejerce principalmente por el péptido intestinal vasoactivo y la norepinefrina (NE), estos neurotransmisores median el desarrollo folicular (Greiner *et al.,* 2005). La inervación intrínseca del ovario muestra la participación de ganglios bien desarrollados situados a nivel del hilio y el mesovario que discurren a lo largo del tejido conectivo. Las fibras se presentan antes del desarrollo folicular las cuales son producidas entre las 48-72 horas después del nacimiento y alcanzan su desarrollo máximo alrededor de la pubertad contribuyendo a la activación de la secreción esteroidogénica (D'Albora *et al.,* 2002).

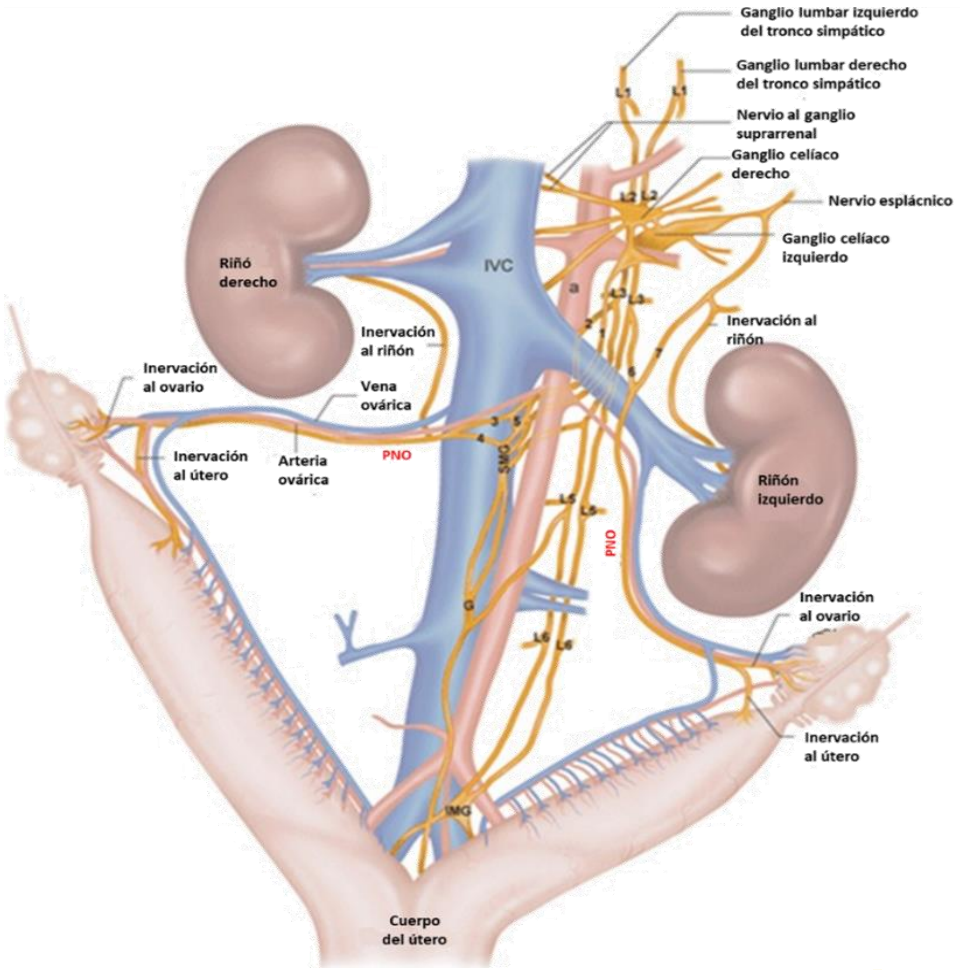


Figura 5. Esquema que muestra el origen y la distribución del PNO en la rata hembra. a, aorta; IVC, vena cava inferior; SMG, ganglio mesentérico superior; G, ganglio; IMG, ganglio mesentérico inferior; L (1,2,3,4,5,6) Ganglio lumbar del tronco simpático. 1: rama celíaca, 2: rama lumbar, 3: rama anastomótica, 4: rama mesentérica superior, 5: plexo mesentérico, 6: rama anastomótica del ganglio lumbar del tronco simpático, 7: rama anastomótica del nervio esplácnico (Modificado de Pastelín *et al.,* 2017).

1.3 Vías neurales entre los ovarios y el SNC

Recientemente, cada vez hay más pruebas de la existencia de una conexión neuronal directa entre las gónadas y SNC. Este vínculo involucra vías aferentes y eferentes y puede modular la actividad funcional o la capacidad de respuesta de las glándulas. Ejemplos de esta última característica incluyen la respuesta hipertrófica compensatoria después de la extirpación unilateral de los ovarios o la glándula suprarrenal. Esta respuesta también puede resultar de una desnervación farmacológica unilateral del ovario. Se observan cambios bioquímicos unilaterales en el hipotálamo después de una ovariectomía unilateral, regiones extrahipotalámicas o la médula espinal, o cualquier sección del nervio vago altera la función ovárica (Gerendai y Hala'sz, 1997).El mismo grupo de la Dra. Gerendai, posteriormente realizaron una inyección del virus de la pseudorrabia en el ovario izquierdo, con el fin de observar las estructuras marcadas por el virus mediante un trazado transneuronal, las células nerviosas marcadas con el virus se identificaron por inmunocitoquímica usando anticuerpo policlonal antiviral. Se detectaron neuronas marcadas con virus tanto en la médula espinal como en el cerebro (Gerendai *et al.,* 1998). Estos resultados proporcionaron la primera evidencia neuromorfológica de la existencia de una vía neuronal multisináptica entre los ovarios y el SNC. Teniendo en cuenta los datos obtenidos mediante los métodos clásicos de rastreo de vías y las técnicas de detección de virus transneuronales, proponen que el virus viaja desde el ovario y llega al núcleo paraventricular a través de los nervios simpáticos. Debido a que existen conexiones recíprocas entre los núcleos del tronco encefálico, el núcleo paraventricular, así como el núcleo del tracto solitario, los circuitos neuronales entre estos núcleos proporcionan vías adicionales.

El mismo grupo de la Dra. Gerendai mencionan que la vagotomía unilateral en la rata bloqueó el etiquetado de varias estructuras cerebrales cuando se inyectó el virus de la pseudorrabia en el ovario. Los hallazgos indican que la vagotomía interfirió con el marcaje de varias estructuras cerebrales conectadas con el ovario, incluidos los núcleos vagales. La ausencia del marcado en estructuras distintas a los núcleos vagales sugiere que la infección de estos grupos de células en animales con un nervio vago intacto podría deberse principalmente al paso viral a través de estructuras vagales. Estos datos proporcionan una base morfológica para futuras investigaciones, en el caso que se deseen estudiar las estructuras cerebrales que están involucradas y cuál es su importancia funcional en el control de la inervación simpática y parasimpática del ovario, (Figura 6) (Gerendai *et al.*, 2000). La lateralidad hipotalámica en el control gonadal planteó la pregunta de si las estructuras neurales extrahipotalámicas también involucradas en los procesos reguladores gonadales están lateralizadas o no (Gerendai, 1987). En este contexto, se puede mencionar que las lesiones del lado derecho del locus coeruleus,

un grupo celular transsinápticamente no marcado desde el ovario después de la vagotomía, interfirieren con el desarrollo de la hipertrofia ovárica compensatoria después de una hemiovariectomía (Gerendai, 1984; Gerendai *et al.,* 2000). Lo anterior nos permite sugerir que los métodos de trazado transneuronal pueden revelar algunas de las estructuras involucradas en las vías de comunicación neural entre el SNC y los ovarios, pero también puede omitir el marcado de algunas otras que sólo son posible ser mostradas mediante otras técnicas o abordajes experimentales; como las hemicastraciones, denervaciones quirúrgicas y/o farmacológicas.

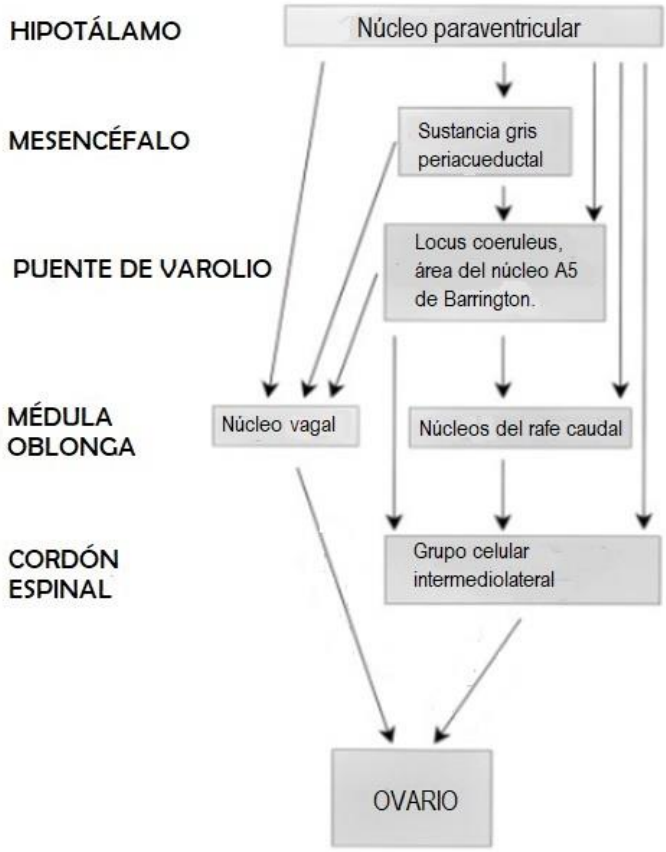


Figura 6. Esquema simplificado de las conexiones neuronales descendentes conocidas entre las estructuras del SNC marcadas desde el ovario por la técnica de rastreo transneuronal viral (Modificado de Gerendai *et al.,* 2002).

1.4 Hipocampo

El hipocampo, una estructura subcortical importante en el cerebro de los mamíferos, está involucrado en varios tipos de procesos de aprendizaje y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo, además del estrés. Deriva de la región medial del telencéfalo, forma parte

del sistema límbico, relacionados con distintos núcleos en los que se encuentran la corteza prefrontal, amígdala, núcleo accumbens (NAcc) y área ventral tegmental (AVT) (Hernández, Aguilar y García, 2015; Moghadami, Jajanshahi, Sepehri y Amini, 2016).

Anatómicamente, está organizado en el cuerno de Amón (CA) (hipocampo propio) que comprende regiones CA1, CA2, CA3 y CA4, (Figura 7) (Lorente de Nó. 1934), dadas de acuerdo con las células piramidales que se localizan en ellas y el giro dentado (GD) (separados por la fisura hipocampal); el complejo subicular, formado por el presubiculum (Pre), el subiculum (Sub) y el parasubiculum (Para) y la corteza entorrinal (EC). (Lavenex, Lavenex y Amaral, 2007; Amaral y Lavenex, 2007).

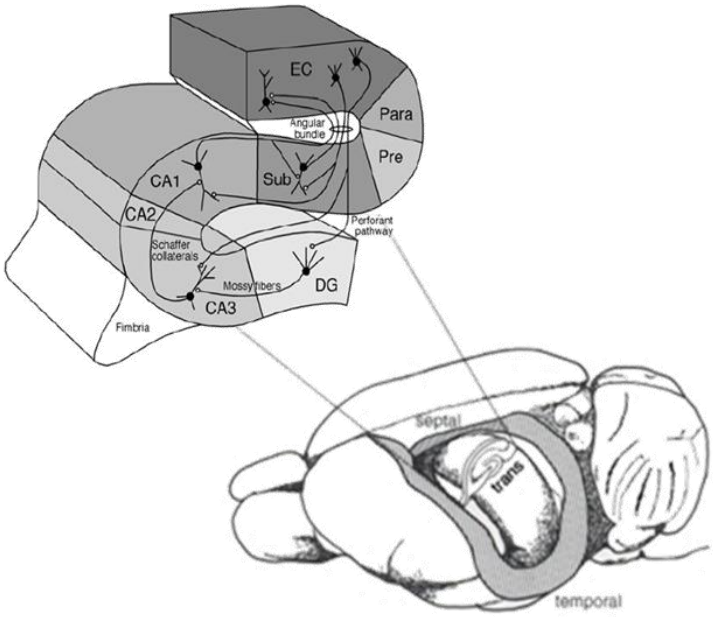


Figura 7. Esquema de cerebro de rata, mostrando los ejes septotemporales y transversales de la formación del hipocampo. (Modificado de Amaral y Lavenex, 2007).

1.4.1 Circuito trisináptico

Las regiones CA1, CA3 y el GD constituyen el circuito trisináptico del hipocampo, se caracteriza por tres relevos (Figura 8): la primera denominada vía perforante que proviene de la capa II de la corteza entorrinal (CE), esta información proviene de las diferentes cortezas, como la auditiva, somatosensorial, gustativa, olfatoria, visual primaria y el tálamo que es el principal integrador de la información sensorial y que a su vez es la principal entrada de información del hipocampo, y proyecta principalmente al GD y al CA3, mientras que las proyecciones de la

capa III de la corteza entorrinal se proyectan hacia la región CA1 (Amaral y Witter,1989). Se sabe que las neuronas piramidales CA1 reciben inervaciones de bulbos olfatorios, núcleo accumbens, corteza prefrontal (CpF), amígdala e hipocampo. Se produce un segundo relevo de información entre el GD y CA3, que está compuesto por fibras musgosas, los axones de las neuronas granulares del GD se proyectan hacia las neuronas piramidales de la región CA3 (Bello-Medina, González-Franco y Andrea, 2018). Un tercer relevo ocurre entre el CA3 y CA1, donde las neuronas piramidales que pertenecen a la región CA3 envían sus axones a la región CA1 para formar las colaterales de Schaffer (Amaral y Lavenex, 2007).

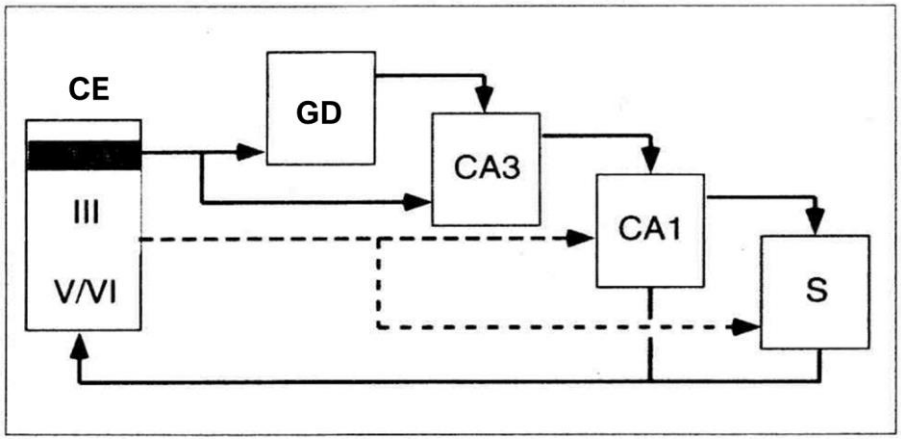


Figura 8. Circuito trisináptico. Ilustra la organización de las dos proyecciones de las vías perforantes hacia los otros campos de la formación del hipocampo. Las células en la capa II de la CE se proyectan al GD y a la región CA3 del hipocampo. Las células en la capa III de la EC dan lugar a una vía distinta que inerva a CA1 del hipocampo y el subículo (Tomado de Amaral, 1993).

1.4.2 Aferencias y eferencias del hipocampo

El hipocampo es una de las estructuras altamente conservadas a través de las especies, tiene conexiones con casi todas las partes del sistema límbico, incluyendo amígdala, circunvolución del hipocampo, hipotálamo y recibe información procedente de todas las áreas asociativas corticales. Esta estructura cerebral está asociada con casi todos los tipos de experiencia sensorial, promoviendo la activación de diferentes áreas del hipocampo, el cual, a su vez envía señales hacia el hipotálamo y otras partes del diencéfalo a través del fórnix (Sánchez, 2009). Esta región del cerebro se divide en hipocampo dorsal (HD), intermedio (HI) y ventral (HV). Mientras que el HD está involucrado en funciones cognitivas y su disfunción conduce a la amnesia, el HI solo separa ambas regiones (Dedovic *et al.,* 2009; Fanselow y Dong, 2010). El HV es responsable del control emocional, como las frustraciones y regula la actividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (Flores, Morales-Medina y Diaz, 2016). Es

particularmente interesante considerar el papel de esta porción ventral y que está fuertemente vinculada a los circuitos relacionados con el comportamiento defensivo del hipotálamo, que no descartan su participación en los procesos reproductivos (Strange *et al.,* 2014). Se ha estudiado la lesión en el hipocampo ventral neonatal (nVH) como modelo para probar la hipótesis de que las anomalías tempranas del neurodesarrollo conducen a cambios de comportamiento supuestamente relacionados con la esquizofrenia (Silva-Gómez *et al.,* 2003). El modelo de lesión del hipocampo ventral neonatal (NVHL), desarrollado originalmente por Barbara Lipska y colegas (Lipska *et al.,* 1993), cumple muchos de los requisitos para un modelo de esquizofrenia útil y clínicamente traslacional. Este modelo quirúrgico implica la infusión de una excitotoxina en el hipocampo durante la primera semana posnatal, un punto de tiempo aproximadamente comparable al tercer trimestre del desarrollo humano (Tseng *et al.,* 2009). Se pretende usar como base este modelo con modificaciones en los días de la lesión para analizar la participación del hipocampo en la regulación de las funciones reproductivas.

Por otro lado, las conexiones extrínsecas del hipocampo permiten la comunicación con otras áreas del cerebro, en la figura 9 se observa que el hipocampo sale hacia el septum lateral (LS) y el hipotálamo. El LS se puede dividir en partes rostral (LSr), caudal (LSc) y ventral (LSv). La punta más ventral del subículo CA1 (azul) se proyecta hacia LSv, que se proyecta hacia el núcleo preóptico medial (MPN) y la zona periventricular hipotalámica (PVZ). Las partes dorsales del área CA1 se proyectan hacia el LSr, que a su vez se proyecta hacia los núcleos de la zona hipotalámica media, incluidos el núcleo hipotalámico anterior (AHN) y el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH). El subículo dorsal envía una pequeña proyección al LS dorsal, que se transmite al cuerpo mamilar (MB) (Strange *et al.,* 2014).

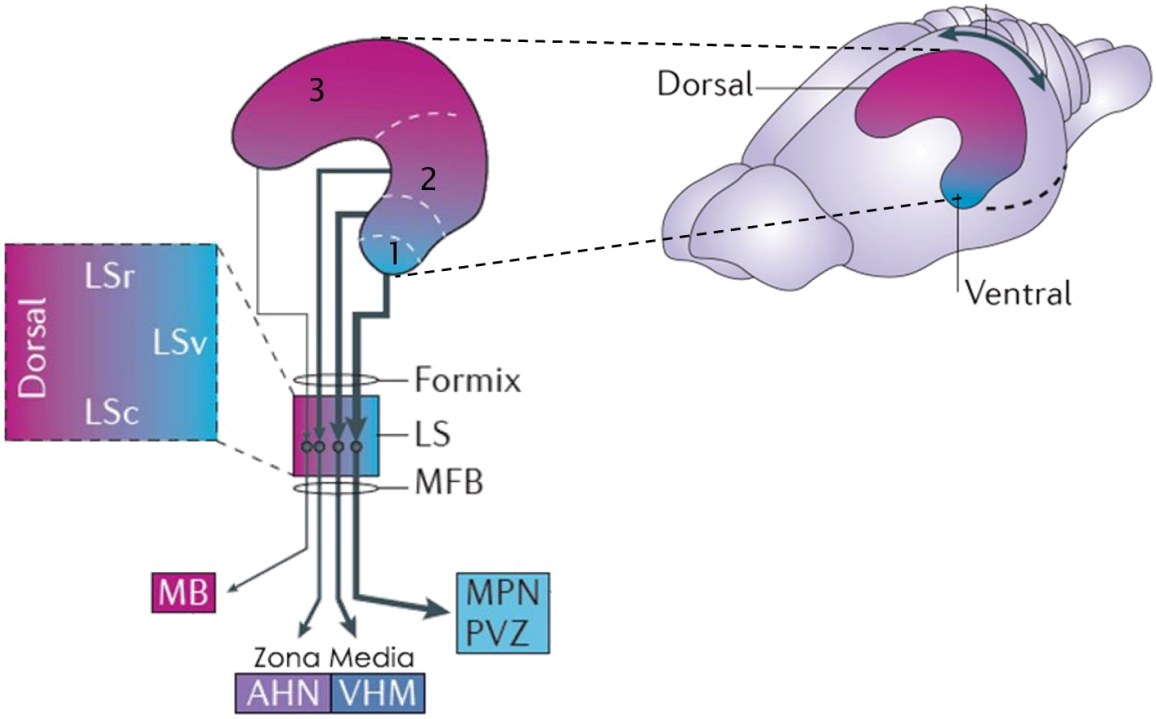


Figura 9. Conexiones extrínsecas del hipocampo. El hipocampo sale hacia el septum lateral (LS) y el hipotálamo. El LS se puede dividir en partes rostral (LSr), caudal (LSc) y ventral (LSv), el grosor de las flechas indica la densidad de proyección (Modificada de Strange *et al.,* 2014).

1.5 Espinas dendríticas

Las espinas dendríticas (ED) son protuberancias dendríticas discretas que forman un rico andamio estructural para la mayoría de las sinapsis excitatorias en el cerebro, albergando un complemento de maquinaria de señalización bioquímica, así como una densidad postsináptica proteica (DPS) que contiene, entre otros, receptores de glutamato ionotrópicos de los subtipos ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y *N*-metil- d -aspartato (NMDA) (Lee, Soares y Béïque, 2012). Cajal fue el primero en descubrir y nombrar este tipo de estructuras en su primer trabajo en el que estudiaba el cerebelo de las aves realizó sus descripciones basado en el método de impregnación argéntica de Golgi (Cajal, 1888). También propuso que las espinas dendríticas servían para conectar los axones con las dendritas.

Las funciones de las espinas dendríticas son diversas en las que destacan: incrementar el área receptiva optimizando la interconectividad neuronal mediante el contacto sináptico que se establece con la región presináptica, restringir la difusión de las moléculas en la región

postsináptica y la regulación del calcio (Martínez y Dierssen, 2014; Valencia, Colín y Fortoul, 2018).

El tamaño de las espinas dendríticas varía entre las áreas del cerebro, así como entre las especies. Aunque son muy heterogéneas en tamaño y forma, generalmente consisten en de una cabeza pequeña (1 µm de diámetro), conectadas a la dendrita por un pequeño cuello de aproximadamente 0.2 µm de diámetro y de 0.5 a varios micrómetros de longitud) (Rochefort y Konnerth, 2012). Por lo general, en las cabezas de las espinas forman una sinapsis excitatoria, que se componen de una terminal presináptica y la densidad postsináptica (DPS) (Yuste, 2010; Rochefort y Konnerth, 2012).

Estudios ultraestructurales han demostrado una correlación entre el tamaño de la DPS, el volumen de la cabeza de la columna vertebral y el número de vesículas en las terminales presinápticas en las neuronas piramidales CA1, las células cerebelosas de Purkinje y en la corteza olfativa (Valencia, Colín y Fortoul, 2018).

Integralmente las espinas dendríticas están formadas por filamentos de F-actina y G-actina, las delgadas y pequeñas poseen mayor motilidad y establecen sinapsis débiles, la morfología puede cambiar muy rápidamente ante los estímulos que recibe la neurona induciendo remodelación de su arquitectura; mientras que las espinas grandes y en forma de hongo son más estables y forman sinapsis más fuertes, ya que su densidad postsináptica proporciona mayor superficie de contacto (Figura 10) (Parnass, Tashiro y Yuste, 2000; Valencia, Colín y Fortoul, 2018).

Las sinapsis excitatorias se forman en las espinas en forma de hongo y contienen abundante DPS. Por el contrario, las sinapsis GABAérgicas inhibitorias están presentes en las dendritas sin espinas, en el soma y en la parte inicial del axón, y no se observa un engrosamiento postsináptico (Martínez y Dierssen, 2014).

Se ha propuesto que la base de la memoria y el aprendizaje se debe a los mecanismos producidos por potenciación a largo plazo (LTP), también se ha encontrado que los sitios preferenciales de inducción de LTP son pequeñas espinas, que expresan una pequeña cantidad de receptores AMPA. Dado que se ha demostrado que las espinas grandes expresan abundantemente los receptores AMPA y son estables, se puede sugerir que las espinas actúan como unidades de memoria, siendo las espinas grandes las unidades físicas de memoria a largo plazo (Matsuzaki *et al.,* 2014). Además, en las dendritas de las neuronas en desarrollo se han observado proyecciones delgadas parecidas a cabellos llamadas filopodios, que carecen de cabezas bulbosas de más de 3 µm de longitud. Los filopodios inmaduros o formas rechonchas representan aproximadamente el 10% de las espinas en el adulto. Muchos filopodios carecen de una sinapsis tipo 1, principalmente debido a la falta de un DPS, aunque a menudo presentan características sinápticas como una pequeña hendidura o algunas

vesículas sinápticas. Una vez que el filopodio realiza contacto con un elemento axonal su motilidad disminuye gradualmente y se estabiliza la estructura de la espina dendrítica (Berry y Nedivi, 2017).

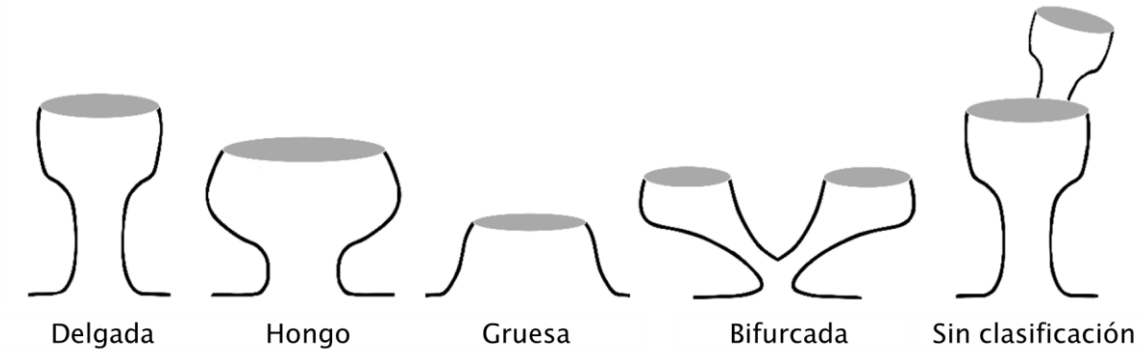


Figura 10. Morfología de las espinas dendríticas. En gris se muestra el área en donde las terminales axónicas pueden hacer contacto en las espinas dendríticas (Tomado de Bello-Medina *et al.,* 2018) .

1.5.1 Plasticidad en espinas dendríticas

Los resultados obtenidos a fines de la década de 1950 permitieron la reconstrucción microscópica electrónica (ME) del tejido neuronal a una resolución nanométrica, estas imágenes presentaron la densidad postsináptica, la terminal presináptica y sus vesículas y otros orgánulos (Sala y Segal, 2014). Una de las propuestas sobre el mecanismo de aprendizaje, sugiere que las espinas implementan una plasticidad sináptica a largo plazo (Yuste, 2010; Sala y Segal, 2014). El grupo de Geinisman (2000) mostró que después LTP hay un aumento en el número de sinapsis perforadas, con una gran cantidad de DPS, lo que aumenta el tamaño del contacto sináptico general. Debido a que la LTP del hipocampo es ampliamente considerada como un modelo sináptico de la memoria, parece razonable plantear la hipótesis de que la misma modificación sináptica puede tener lugar como consecuencia del aprendizaje asociativo dependiente del hipocampo (Geinisman *et al.,* 2000).

Las alteraciones en la morfología de las espinas pueden estar involucradas en las funciones neuronales que favorecen la formación de la memoria. Varios estudios muestran que las espinas se forman mediante el aprendizaje y duran de días a semanas y potencialmente más después del entrenamiento conductual y que la interrupción en la morfología de las espinas después de la consolidación de la memoria se asocia con un deterioro en el mantenimiento de la memoria, lo que sugiere que la persistencia de las espinas es esencial para el mantenimiento de la memoria. El citoesqueleto de una espina dendrítica está compuesto principalmente de

actina. Las espinas maduras contienen una mezcla de filamentos de actina lineales y ramificados en la base, el cuello y la cabeza. Por lo tanto, el citoesqueleto de actina y sus proteínas reguladoras están involucrados en la morfogénesis de la espina y la formación de la memoria. Sin embargo, para que la memoria persista, estos cambios estructurales deben mantenerse durante un largo período de tiempo (Basu y Lamprecht, 2018).

La serie de eventos que ocurren durante la plasticidad de las espinas dendríticas son (1) migración de la actina hacia f-actina; (2) acumulación de actina en la cabeza de la espina; (3) elongación de espinas dendríticas. Los tres tipos de plasticidad estructural que se presentan en las espinas dendríticas son: (1) generación de unas nuevas protuberancias; (2) expansión persistente de espinas existentes; y (3) la expansión transitoria de las espinas existentes que pueden tener lugar en diferentes etapas de desarrollo (Hayasahi y Majewska, 2005).

A nivel celular, existen diferentes patrones de estimulación que producen plasticidad que probablemente utilicen diferentes cascadas moleculares y cambios morfológicos. Por ejemplo, mientras que el modo dominante de producir LTP en áreas del cerebro como el hipocampo implica la activación del receptor de NMDA (Sala y Segal, 2014), existe una LTP distinta no mediada por NMDA, que depende del aumento de las concentraciones Ca^{2+} intracelular postsináptica (Grover y Teyler, 1990). Varias líneas de evidencia sugieren que la señalización del receptor NMDA podría influir en el volumen de la espina mediante el reclutamiento de receptores AMPA, estos receptores son canales catiónicos no selectivos (Ultanir *et al.,* 2007).

Finalmente, la inducción de un LTP se asocia a más receptores AMPA en la membrana plasmática, mientras que la depresión a largo plazo (LTD) se asocia con una disponibilidad reducida de estos receptores (Kessels y Malinow, 2009).

En términos generales, entonces podemos definir que la LTP es el resultado de la actividad glutamatérgica. Si la intensidad y duración de la actividad glutamatérgica es suficiente, aumentará el volumen de las espinas dendríticas y formará una estructura similar a un hongo, aumentando así el volumen de PSD y la estabilidad de las espinas dendríticas. Por lo tanto, se cree que las espinas dendríticas en forma de hongo son estructuras estables y funcionales para la neuroplasticidad (Kruijssen y Wierenga, 2019; Harris, 2020). Estas espinas pueden incluso dividirse, es decir, generar dos cabezas o ramificarse (desarrollar más de dos cabezas), sin embargo, la DPS de las espinas bifurcadas y ramificadas no es mayor que el de las espinas tipo hongo (Harris *et al*., 1992). Por otra parte, si la intensidad y duración de la actividad glutamatérgica es insuficiente, el citoesqueleto de las espinas se reorganizará para formar una estructura achatada con una cabeza y un cuello casi de la misma proporción: espina tipo gruesa. Debido a sus características morfológicas, estas espinas tienen una DEPS alterada y por lo tanto no tienen una función neuroplástica e incluso se asocian con una transmisión sináptica debilitada.

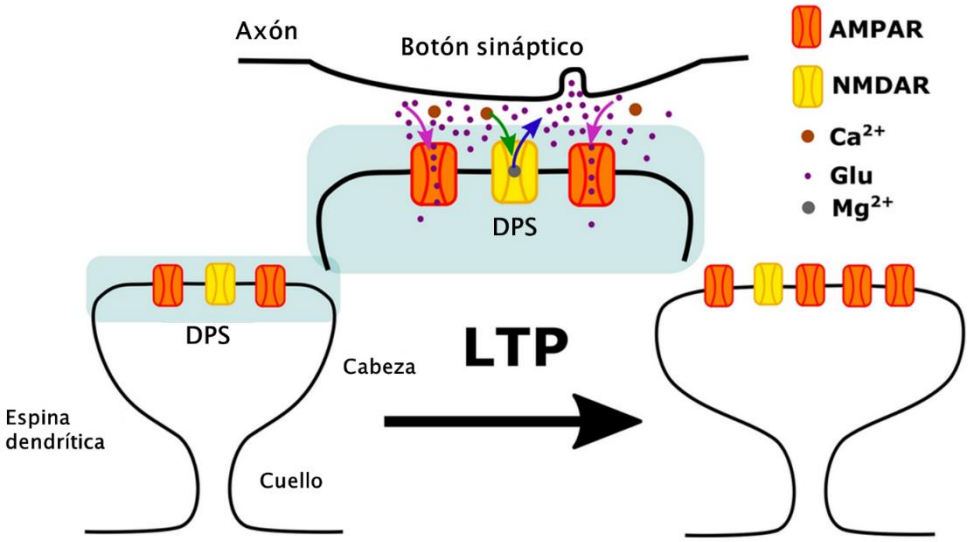


Figura 11. La potenciación a largo plazo (LTP). Los receptores AMPA ubicados en la densidad postsináptica (DPS) en las espinas dendríticas maduras son activados por el glutamato (Glu) liberado del botón sináptico en el axón de la neurona presináptica. Cuando los receptores AMPA son fuertemente estimulados, la célula postsináptica se despolariza provocando la liberación del ion Magnesio (Mg2) que bloquea el receptor NMDA, permitiendo la entrada de calcio (Ca^{2+}). Este proceso se conoce como inducción de LTP y desencadena un aumento del tamaño de la espina y la cantidad de receptores AMPA (Tomada de Bonilla-Quintana y Wörgötter, 2021).

1.5.2 Memoria y aprendizaje

En términos generales, se le considera como la capacidad de reconocer estímulos, o el conocimiento de si hemos experimentado algo en el pasado. Implica el registro de cualquier estado o proceso que resulte de las etapas secuenciales de codificación, almacenamiento y recuperación para comprender y adaptarse al mundo, es una condición necesaria para desarrollar una vida independiente y productiva (Steckler *et al.,* 1998; Klein, 2015).

Muchos factores pueden estar involucrados en el proceso de la memoria y el aprendizaje, entre ellos, las hormonas esteroideas sexuales, los estrógenos pueden actuar sobre las funciones cognitivas como la memoria, la influencia de estas sobre las neuronas colinérgicas con receptores al factor de crecimiento nervioso (NGF), localizadas en el área basal del cerebro anterior y que están conectadas con la formación del hipocampo. Se sabe que estos sistemas colinérgicos están implicados en la memoria y el aprendizaje. Por otro lado, la progesterona a su vez tiene un efecto neuroprotector en las neuronas del hipocampo ante un daño causado por isquemia cerebral, a través de su interacción con los receptores GABA. Las hormonas también estimulan el crecimiento y las ramificaciones en las sinapsis de las algunas estructuras cerebrales, un ejemplo de ello es el estradiol que permite el crecimiento de las neuronas del hipocampo.

1.5.3 Cambios que se han reportado como consecuencia de la lesión del hipocampo tanto en edad neonatal como adulta.

Barbara Lipska, George Jaskiw y Daniel R. Weinberger, plantearon la hipótesis de la interrupción de las conexiones entre las estructuras límbicas como el hipocampo y la CPF en las primeras etapas del neurodesarrollo que podría conducir cambios cerebrales, así como en el comportamiento de los animales que se podrían relacionar con un modelo esquizofrénico, desarrollando así el modelo de LNHV, mediante una administración bilateral de ácido iboténico (agonista de receptores NMDA) directamente en el hipocampo ventral en ratas neonatas a los 7 días de vida posnatal en la cepa Sprague Dawley (SD) (Lipska *et al.,* 1993). Los animales con LNHV desarrollaron extensos cambios en el comportamiento a lo largo de su vida que pueden estar asociados con síntomas de la esquizofrenia, como el aislamiento social y memoria de trabajo alterada. Sin embargo, una de las características más importantes de este modelo es que los cambios de comportamiento asociados con los síntomas positivos de la enfermedad, como cambios en el filtro selectivo de la información sensorial y la hiperactividad inducida por un ambiente novedoso, no aparecen hasta que alcanzan la adultez, tal y como sucede con el primer episodio psicótico de esta enfermedad (Tseng *et al.,* 2009; O'Donnell, 2012). Por otro parte, el grupo de la Dra. Daenen, basados en la hipótesis en que los trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia son el resultado de un déficit del desarrollo neurológico realizaron lesiones en hipocampo ventral a los 7 o 21 días de edad, teniendo en cuenta que a los 21 días de edad las estructuras cerebrales están casi maduras. Demostraron que el deterioro del comportamiento social es uno de los principales síntomas de los trastornos psiquiátricos como Esquizofrenia, en este contexto las lesiones generadas a los 7 días, pero no a los 21 provocan las alteraciones en el comportamiento social, contribuyendo a la validez del modelo de neurodesarrollo planteado por Lipska (Daenen *et al.,* 2002).

Por otra parte, los estudios realizados en ratas adultas de la cepa Wistar, mostraron un deterioro cognitivo derivado de una lesión mecánica en la región CA1 del hipocampo, mientras que los animales con lesión y un implante con portadores de chitosán cargados con neurotrofina-3 (NT-3), estimularon la regeneración de una gran cantidad de fibras nerviosas positivas y células similares a neuronas en el área lesionada (Mo, 2010). Esto nos estaría indicando que una lesión en edad adulta provoca un deterioro cognitivo, pero no un modelo esquizofrénico, como sí sucedería con una lesión realizada en etapa neonatal.

2. ANTECEDENTES

En la regulación neuroendocrina de las funciones de los ovarios participa el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal. El inicio de la pubertad en la rata hembra es el resultado de la activación de dicho eje, permitiendo la liberación de óvulos capaces de ser fertilizados y la secreción de hormonas, específicamente, por la liberación de GnRH desde las neuronas hipotalámicas hacia la circulación del portal hipofisario (Molina, 2006; Prevot, 2015), que actúa sobre los gonadotropos donde estimula la secreción de las gonadotropinas FSH y LH, que al llegar a las gónadas estimularán sus funciones (Randall *et al.,* 2002). Bajo la influencia de estos episodios secretores de LH, el ovario es estimulado para producir más estrógeno (E2). A su vez, los aumentos sutiles en los niveles de E2 parecen ser capaces de evocar aún más mini secreciones de LH, lo que puede inducir una mayor activación ovárica que conduce a la maduración folicular (Urbanski y Ojeda, 1985; Urbanski y Ojeda, 1986). Con el inicio de la pubertad, es el momento del primer aumento preovulatorio de gonadotropinas, que, en sí mismo, representa el clímax de la maduración reproductiva neuroendocrina femenina. Debido a que la unidad hipotalámica-pituitaria ya es completamente competente para responder a los niveles preovulatorios de estrógeno con un aumento de LH, la aparición y el momento de este evento dependen de la finalización de la maduración ovárica. Solo cuando el ovario se vuelve capaz de producir niveles de E2 de magnitud suficiente (50 picogramos/ml) para disparar la secreción de LH de 10-12 horas después de producirse los picos de FSH y LH en el proestro, se produce la ovulación en el estro, inducida principalmente por el pico de LH (Ojeda y Skinner, 2006; Fernández *et al.,* 2021).

Los procesos involucrados en el ciclo estral están controlados por la interacción de sincronizadores endógenos en el hipotálamo, hipófisis y ovario que regulan, de acuerdo con los periodos de luz-oscuridad, el momento de secreción de hormonas y las señales necesarias para la reproducción (Yoshikawa *et al.,* 2009). Por otra parte, el decline observado en el eje reproductivo femenino relacionado con la edad implica déficits en todos los niveles del eje HPG, que conlleva agotamiento de la reserva posmitótica de los ovocitos y la disminución asociada de las concentraciones de E2, la evidencia acumulada indica que durante las etapas más tempranas del declive reproductivo, antes de cualquier cambio en la ciclicidad ovárica y el E2 circulante, los cambios a nivel del cerebro juegan un papel importante en el inicio de la senescencia reproductiva (Downs y Wise, 2009). Durante décadas, se pensó en el estrógeno solo como una "hormona sexual", ya que desempeña un papel fundamental en la regulación de los eventos conductuales y fisiológicos esenciales para una procreación exitosa (Shughrue y Merchenthaler, 2000). Se sabe desde hace más de 30 años que el estrógeno puede alterar la

fisiología intrínseca y sináptica de las neuronas en cuestión de minutos. Sin embargo, la importancia fisiológica de estos efectos agudos no ha sido clara porque algunos efectos requieren concentraciones de estrógeno más altas que las que se detectan en el plasma y porque el estrógeno secretado por el ovario aumenta y disminuye en el transcurso de los días. Estas interrogantes pueden ser respondidas por una nueva investigación que demuestre que el estrógeno se produce en niveles altos dentro del propio cerebro y que la producción de estrógeno en el cerebro puede estar regulada por la actividad neuronal. En animales de laboratorio, la mayoría de los investigadores informan que el estrógeno mejora la plasticidad sináptica y mejora el rendimiento en los comportamientos cognitivos dependientes del hipocampo (Wolley, 2007; Spencer *et al.,* 2008). Además, estudios recientes *in vivo* han demostrado que los receptores de unión de estrógenos nucleares están ampliamente distribuidos en las células piramidales por todo el CA1-3 del hipocampo y las láminas II-VI de la isocorteza. El impacto funcional de la localización del receptor de estrógeno en la corteza y el hipocampo puede resultar relevante para el papel emergente del estrógeno como factor protector en las lesiones relacionadas con accidentes cerebrovasculares (Shughrue y Merchenthaler, 2000). Mitral *et al*. (2003) detectaron los receptores extranucleares de estrógenos (ER) alfa y beta en varias áreas, incluidas las fibras del bulbo olfatorio, CA3 y CA1 del hipocampo y el cerebelo. Aunque ambos receptores se expresaron generalmente en una distribución similar a través del cerebro, el ER nuclear alfa fue el subtipo predominante en el hipocampo, el área preóptica y la mayor parte del hipotálamo, mientras que estuvo escaso o ausente en la corteza cerebral y el cerebelo. En conjunto, estos hallazgos demuestran la expresión selectiva de regiones de ER beta y ER alfa en el cerebro de ratón ovariectomizado adulto. En los últimos años, se ha demostrado que estos estrógenos ejercen efectos sobre la estructura y función del hipocampo y la corteza. Además, el cerebro participa en la regulación del desarrollo neuronal, la plasticidad y el comportamiento reproductivo (Hösli y Hösli, 1999; Shughrue y Merchenthaler, 2000). Por otro lado, la plasticidad sináptica inducida por estrógenos muestra con frecuencia un aumento de las espinas en las dendritas apicales de las neuronas piramidales CA1 después de la aplicación sistémica de estradiol a ratas ovariectomizadas. Otros estudios cuestionan esta regulación endocrina directa de la sinaptogénesis por estradiol. Prange-Kiel y Rune (2006) demostraron por primera vez, que los estrógenos se sintetizan de *novo* en las neuronas del hipocampo de rata. Dado que el estradiol como la testosterona pueden llegar al cerebro a través de la circulación sanguínea, se han realizado amplios estudios para comprender su papel en la modulación de la plasticidad y función del hipocampo (Woolley *et al.,* 1997). Anteriormente Woolley y McEwen (1993) han demostrado los efectos del estradiol y la progesterona en ratas ovariectomizadas sobre la densidad de las espinas dendríticas en las células piramidales CA1 del hipocampo, en donde

mostraron un aumento de la densidad dendrítica a partir de las 24 horas posterior a la administración de estradiol y con respecto a la progesterona; esta tiene un efecto bifásico sobre la densidad de las espinas ya que el tratamiento con progesterona después del estradiol inicialmente aumenta, pero luego produce una disminución mucho más aguda en comparación con la disminución que se presenta cuando solamente se administró estradiol. Por otro lado, también se ha asociado cambios en la morfología dendrítica con las concentraciones de prolactina, por ejemplo, en ratas ovariectomizadas seguidas de la administración de ácido kaínico y con postratamiento de prolactina, mostraron los efectos neuroprotectores de la prolactina en neuronas piramidales de la región CA1 y la prevención del déficit cognitivo que provoca el ácido kaínico (Reyes-Mendoza y Morales, 2014). Se ha mostrado, también que en la rata la administración de acetil l-carnitina (ALCAR) provoca un incremento en la secreción de prolactina y estradiol durante el estro (Krsmanovic *et al.,* 1992). Previamente hemos mostrado que, en la rata, la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina al nacimiento, provoca un retraso en el inicio de la pubertad, una disminución en el número de folículos sanos y un incremento en los folículos atrésicos. La administración de acetil l-carnitina en la rata desnervada sensorialmente adelanta la pubertad, incrementa el número de folículos sanos y disminuye los atrésicos, estas respuestas van acompañadas de un incremento de la longitud dendrítica de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo (Castillo, 2020), lo que permite sugerir la posibilidad de que el hipocampo puede participar en la regulación de las funciones reproductivas. Aún no está claro si la conexión entre esta estructura y las gónadas sería por una vía neural o una vía neuroendócrina (eje hipotálamo-hipófisis-gónadas), o incluso por ambas. Los estrógenos, independientemente de su origen, serían un factor que podría modular la morfología dendrítica de las neuronas hipocampales. Se sabe que el hipocampo es exquisitamente sensible a los niveles de E2, por ejemplo, el tratamiento agudo con E2 en roedores hembras jóvenes aumenta la densidad de las espinas dendríticas en la región CA1, la neurogénesis en la circunvolución dentada y diversas formas de plasticidad sináptica (Woolley y McEwen, 1993; Barker y Galea, 2008). En apoyo a lo anterior, el grupo de Hojo (2004) demostró mediante inmunohistoquímica la expresión de la aromatasa P45017 α así como para las enzimas P450 de los citocromos en las neuronas piramidales hipocampales de las regiones CA1-CA3 así como en las células granulares del giro dentado en ratas macho adultas. Los hallazgos realizados por Prange-Kiel y Rune (2006) muestran que la plasticidad sináptica depende en gran medida de los estrógenos endógenos. Woolley y colaboradores (1990) fueron los primeros en mostrar fluctuaciones cíclicas en la densidad de la columna dendrítica, ya que los niveles de estradiol y progesterona varían a lo largo del ciclo estral en ratas hembras adultas. Al mismo tiempo, también informaron que la ovariectomía de ratas hembras resultó en una disminución de la densidad de la columna dendrítica en el hipocampo,

que podría prevenirse mediante el tratamiento sistémico con estradiol. Varios experimentos posteriores confirmaron la conexión entre los estrógenos ováricos y la densidad de sinapsis de la columna en roedores. McEwen (2002) muestra que las hormonas ováricas regulan el recambio de sinapsis en la región CA1 del hipocampo durante el ciclo estral de 4 a 5 días de la rata hembra. La formación de nuevas sinapsis excitadoras es inducida por estradiol e involucra receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), mientras que la regulación negativa de estas sinapsis involucra receptores de progestina intracelulares.

Existen pocos estudios que muestran que el hipocampo participa en la regulación de las funciones reproductivas. Se ha observado que en la rata macho prepúber la orquidectomía unilateral izquierda provoca en la etapa adulta un aumento significativo en la arborización y la longitud dendrítica por número de orden de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, (Santos, 2017) acompañado de un aumento en la producción de espermatozoides en el testículo derecho; interesantemente la orquidectomía unilateral derecha provoca una disminución significativa en la morfología dendrítica acompañado de una disminución significativa en el número de espermatozoides y en el porcentaje de viabilidad (González *et al.,* 2016). Aunado a la participación de las hormonas esteroides sexuales, otras investigaciones se han centrado en el papel de la proteína kisspectina como el candidato regulador para la secreción de GnRH y surge como un desencadenador para iniciar la pubertad y también explica como los estrógenos circulantes o periféricos actúan sobre la secreción de GnRH (Kanasaki *et al.,* 2017), La kisspeptina y GPR54 están presentes no solo en las neuronas GnRH del hipotálamo, sino también en los ovarios. El hecho de que este sistema peptídico se encuentre en diversos órganos implicados en la reproducción sugiere que puede tener una función relacionada en el hipocampo (Arai, 2009). Por todo lo anterior, en este proyecto se decidió analizar si el hipocampo tiene un papel en la regulación de las funciones reproductivas de la rata hembra.

3. JUSTIFICACIÓN

El grupo de Gerendai ha mostrado la existencia de una vía neural entre los ovarios y diversas estructuras del SNC (Gerendai *et al.,* 2002). Curiosamente el hipocampo no se reporta como una estructura involucrada en dicha vía neural, debido a que es una estructura cerebral tradicionalmente asociada a procesos de memoria, aprendizaje, estrés e información emocional, se desconoce si no presentó inmunorreactividad o simplemente no lo consideraron. Sin embargo, existen algunas evidencias que permiten sugerir que el hipocampo participa en la regulación de los mecanismos neuroendócrinos que controlan la reproducción. Previamente hemos mostrado una disminución de la arborización dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo en ratas macho, después de realizarles una orquidectomía unilateral izquierda (Santos, 2017). En la rata hembra la denervación sensorial provoca un retraso en la pubertad y una disminución en el número de folículos ováricos. Estos cambios van acompañados de una disminución en la morfología dendrítica de las neuronas piramidales hipocampales de la región CA1 (Castillo, 2020). Por otro lado, se ha observado que el hipocampo sintetiza estrógenos que modulan la plasticidad sináptica, dado que es una estructura altamente relacionada con otras estructuras cerebrales entre ellas el hipotálamo. El dilucidar si el hipocampo es un componente más en el circuito neuroendocrino que controla las funciones reproductivas permitiría, no sólo brindar una visión más amplia de los mecanismos que regulan la reproducción, sino también de las mismas funciones del mismo hipocampo.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es el hipocampo un neuroregulador de la función ovárica?

5. HIPÓTESIS

La lesión estereotáxica en hipocampo ventral o dorsal de ratas Long-Evans a los 21 días de edad, provoca un retraso en el inicio de la pubertad, una disminución en el número de folículos, disminución de las concentraciones séricas de hormonas esteroides y cambios en la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales hipocampales.

El hipocampo presenta plasticidad neuronal para regular el inicio de la pubertad, las funciones ováricas y en el aprendizaje y memoria de ratas hembras Long-Evans.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar los efectos de la lesión del hipocampo ventral o dorsal realizada en la rata a los 21 días de edad sobre la expresión de la densidad de espinas dendríticas y la función reproductiva de ratas hembras en etapa púber.

6.2 Objetivos específicos

- Examinar los efectos de la lesión del hipocampo ventral o dorsal sobre la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal en ratas hembras púberes.
- Cuantificar los pesos ováricos de las ratas bajo tratamiento.
- Evaluar la memoria a corto y largo plazo de las ratas hembras púberes.
- Identificación no cuantitativa de la ciclicidad vaginal en ratas adultas.
- Determinar el porcentaje de fertilidad en ratas adultas.
- Determinar el número de folículos ováricos: totales, sanos, atrésicos, preantrales y antrales.
- Medir las concentraciones séricas de testosterona, estradiol, progesterona, FSH y LH de ratas bajo estudio.
- Caracterizar los parámetros morfológicos de la densidad y tipificación de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de las áreas hipocampales: CA1, CA3 y GD.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente proyecto se utilizaron 25 ratas hembras prepúberes (21 días de edad) de la cepa Long-Evans mantenidas en condiciones ambientales de temperatura y humedad controladas, con ciclo de luz oscuridad de 12 horas, proporcionadas en el "Bioterio Claude Bernard" de la BUAP, (Numero de proyecto: 100519168-UALVIEP-22/1). Los procedimientos fueron realizados conforme la NOM-062-ZOO 1999, que establece el uso y cuidado de animales de laboratorio. A los 21 días de edad, las ratas se dividieron equitativamente en cinco grupos con una n=5. Al grupo 1 se le realizó una lesión en el hipocampo ventral (LHV), al grupo 2 con lesión en el hipocampo dorsal (LHD). A 2 grupos más en las mismas áreas se les realizó una lesión falsa (HV o HD) (HV-Sham, HD-Sham) y un grupo como testigo absoluto (TA). Se registró la edad de apertura vaginal diariamente y se sacrificaron mediante perfusión intracardiaca al primer estro vaginal (Figura 12).

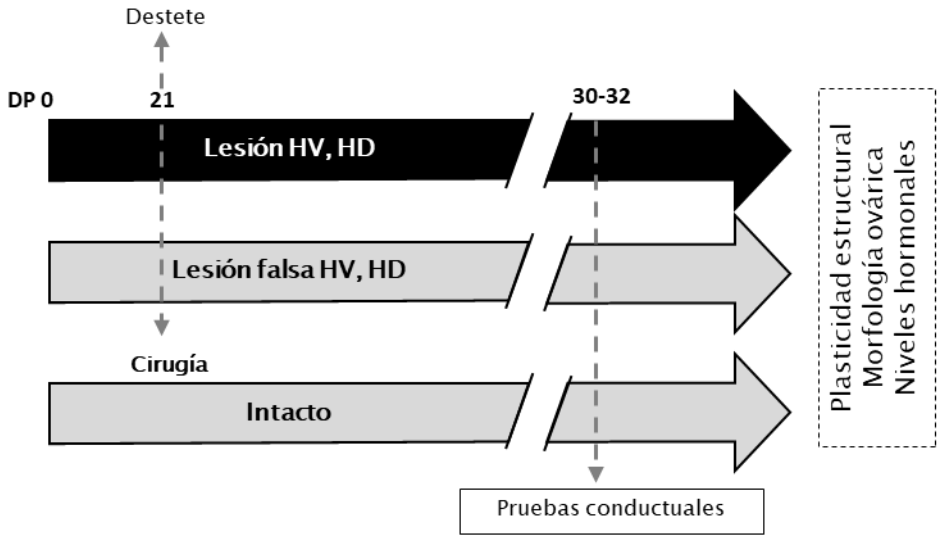


Figura 12. Diagrama de trabajo. Efecto de la lesión en HV e HD sobre la conducta, pubertad, la neuroplasticidad estructural, morfología ovárica y niveles hormonales en ratas Long-Evans, línea temporal de trabajo. Considerando el nacimiento el día postnatal (DP) 0, al DP 21 a las crías hembras se les realizó la cirugía para la lesión en hipocampo ventral y dorsal (HV o HD) (n = 5) y la lesión falsa en hipocampo ventral y dorsal (HV-Sham o HD-Sham; n = 5). Además, se tuvo un grupo intacto (n = 5), al cual no se le realizó ningún procedimiento, hasta que alcanzo la pubertad. En los DP 30-32 se realizaron las pruebas conductuales (Prueba NORT y actividad locomotora) y posteriormente se esperó a que alcanzarán su primer estro vaginal.

7.1 Declaración ética

Todos los protocolos experimentales fueron sometidos a consideración del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), otorgados por el bioterio de Claude Bernard y a los lineamientos de cuidado y uso de animales de laboratorio establecidos por la SAGARPA en la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999. Se hicieron esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados. Los cadáveres después del sacrificio fueron incinerados por parte del personal capacitado del bioterio.

7.2 Cirugía estereotáxica

El modelo de lesión del hipocampo ventral neonatal (NVHL), desarrollado por Barbara Lipska y colegas (Lipska *et al.,* 1993), es una técnica que consiste en una lesión excitotóxica con ácido iboténico en el hipocampo ventral a los 7 días de edad, que en una etapa temprana del neurodesarrollo produce una serie de alteraciones que se asemejan a muchos de los requisitos para un modelo de esquizofrenia. La lesión se realiza en el séptimo día postnatal considerando un punto de tiempo comparable a las fases vulnerables (segundo y tercer trimestre de la gestación) del desarrollo del hipocampo fetal interrumpiendo conexiones entre diferentes regiones del sistema nervioso central (Tseng, Chambers y Lipska, 2009; O'Donnell, 2012).
Estudios en ratas con lesiones similares inducidas en el día 21 de vida, comparable a una edad de 5 años en humano, no muestran deficiencias en el comportamiento social (Daenen *et al.,* 2002).
Para este estudio, se contempló un grupo piloto usando 12 ratas hembras de 21 días de edad con un peso de 35-40 gramos, divididos en dos grupos equitativamente, se administró violeta de cresilo, para la verificación de las lesiones de acuerdo con las coordenadas que se describen a continuación.
La cirugía de lesión hipocampo ventral o dorsal (HV, HD) se realizó a los 21 días de vida posnatal. Sin embargo, se debe prestar atención a las hembras y las crías durante las primeras semanas de vida posnatal. Para la lesión en el hipocampo ventral: las crías de 21 días de vida fueron anestesiadas con ketamina-xilacina con una dosis de 0.20 ml por cada 100g de peso vivo (p.v) vía i.p; posteriormente, se colocaron en un estereotáxico con adaptador especial para animales prepúberes. A cada cría se le realizó una incisión en la piel del cráneo y se le administró 0.3 µl de ácido iboténico (disuelto en *buffer* de fosfatos (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, $NaH_2PO4-2H_2O$ 10 mM, KH2PO4 1.8 mM) 0.1 M, pH 7.4) directamente en el hipocampo ventral y dorsal (AP - 5,2 mm, ML ±5,0 mm, DV -6,5 mm y AP - 4,2 mm, ML ±2,6 mm, DV -3,0 mm respectivamente) durante 2 min con una cánula de acero inoxidable de 23-ga de grosor.

Posteriormente los animales se suturaron y se les administró una dosis de antibiótico enrofloxacina y de analgésico ketoprofeno (0.10 ml por cada 100g de p.v. vía subcutánea) y se dejaron recuperar bajo el calor indirecto de una lámpara para recuperar su temperatura. Los animales operados se regresaron con su respectiva camada hasta el momento de registrar la apertura vaginal y el primer estro vaginal (inicio de la pubertad). Por lo general, en animales intactos dicho evento ocurre alrededor de los 35-40 días. (Lipska *et al.,* 1992; Brady**,** 2016; García-Sustegui *et al.,* 2017).

7.3 Estudios conductuales

Las pruebas conductuales que se realizaron fueron hechas en el laboratorio de Neuropsiquiatría del Instituto de Fisiología de la BUAP en un cuarto aislado de sonido con una iluminación de 30 lux con una tonalidad anaranjada. La conducta se evaluó en la edad prepúber.

7.3.1 Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NORT)

Se ha observado que los roedores dedican más tiempo a explorar un estímulo novedoso del que habían explorado anteriormente y menos tiempo a explorar el estímulo novedoso por segunda vez (Berlyne, 1950; Vidal *et al.,* 2017). Este rasgo de comportamiento se ha utilizado para estudiar el aprendizaje y la memoria en roedores y, por lo tanto, predice el estado de los procesos cerebrales que subyacen a dicha conducta.

La prueba NORT, es de mucha utilidad para comprender mejor la capacidad de reconocimiento y memoria, se realiza en una caja de 60 cm de ancho por 60 cm de largo con paredes oscuras, con recuadros marcados de 20 cm de ancho por 20 cm de largo cada uno, se realizó en un cuarto oscuro con luz roja de 30 luxes, la prueba se divide en 3 fases (Figura 13):

La primera fase o día 1: consiste en la habituación, en esta fase se coloca el roedor en la caja, sin un objeto por un periodo de 10 min pasado este tiempo es regresado a su caja (Figura 13a).

La segunda fase o día 2 (Familiarización): Se realiza a las 24 horas de la habituación y consiste en colocar a la rata en la caja con objetos iguales (uno de estos objetos permanecerá constante durante toda la prueba) equidistante entre ellos y las paredes de la caja para su interacción

con los objetos durante 6 minutos (Figura 13b), al término de este tiempo el roedor regresa a su jaula.

Fase de memoria a corto plazo: Se realiza aproximadamente 2 horas después de la fase 1. En esta ocasión se cambia uno de los objetos familiares por un objeto novedoso y posteriormente se vuelve a introducir al roedor y se le permite la exploración durante 6 minutos (Figura 13c).

Fase de memoria a largo plazo: Se realiza aproximadamente 24 horas después de la fase 2. En esta fase el objeto novedoso es cambiado por otro objeto diferente (nuevo objeto novedoso) y nuevamente se introduce a roedor y le permite interactuar con los objetos durante 6 minutos (Figura 13d).

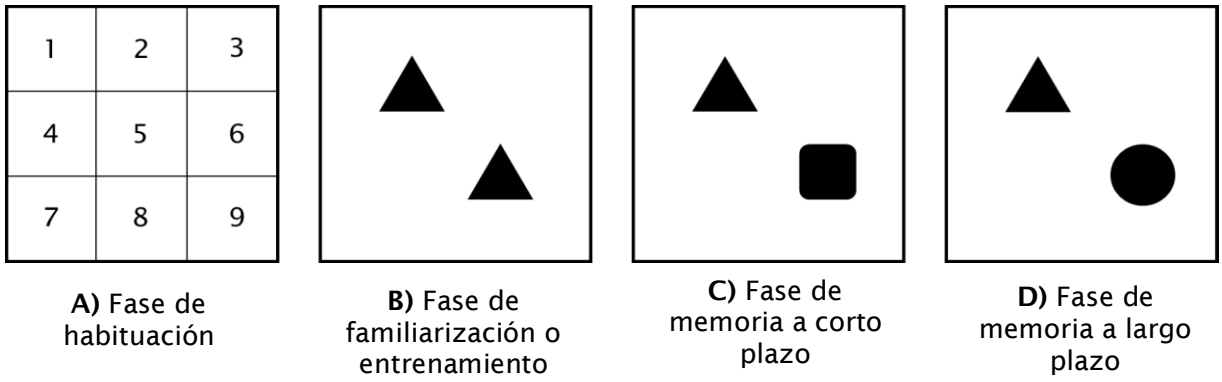


Figura 13. Prueba de NOR. **A**, NORT. La prueba de NOR duró 3 días. En el primer día los animales exploraron una caja de campo abierto por 6 min: habituación (**B**). En el segundo día los animales exploraron un par de objetos idénticos por 6 min: familiarización (**C**). 2 horas después de la familiarización se cambió un objeto por un objeto nuevo, los animales exploraron ambos objetos por 6 min: memoria a corto plazo (**D**). En el tercer día, 24 h después de la memoria a corto plazo, el objeto nuevo se cambió por otro distinto, los animales exploraron ambos objetos por 6 min: memoria a largo plazo.

Al término de la prueba, se obtuvo el índice de reconocimiento o discriminación (IR) utilizando la fórmula siguiente que consiste en obtener la relación del tiempo de permanencia del roedor con el objeto novedoso entre la sumatoria del tiempo de permanencia del roedor con el objeto novedoso más el tiempo de permanencia con el objeto conocido.

$$\text{Índice de discriminación} = \frac{Tiempo\ de\ interacción\ con\ el\ objeto\ novedoso}{Tiempo\ de\ interacción\ con\ el\ objeto\ novedoso + Tiempo\ de\ interacción\ con\ el\ objeto\ familiarizado}$$

7.3.2 Actividad locomotora

Esta prueba se inició colocando al animal en el cuadro 7 de una caja de madera (60x60x60 cm) previamente aseada y dividida en nueve cuadros de 20x20 cm cada una (Figura 14a) durante 10 minutos el observador registró el número de cuadros visitados (Muñoz-Arenas *et al.,* 2020) considerando como visita cuando las cuatro patas del animal se encontraban dentro del cuadro. Después de la prueba se retiró al animal y se procedió con la limpieza correspondiente para evitar influencia en la conducta de los roedores por el olor del animal.

7.3.3 Prueba de ansiedad

Para dicha prueba se utilizaron las mismas grabaciones de cada uno de los sujetos expuestos a prueba de actividad locomotora, en una arena de campo abierto (60×60×60 cm) con paredes oscuras durante 10 min como se describió anteriormente. Se filmó la actividad de cada animal. Los videos adquiridos fueron analizados para evaluar el tiempo de permanencia en el centro y la periferia de la arena (Figura 14b).

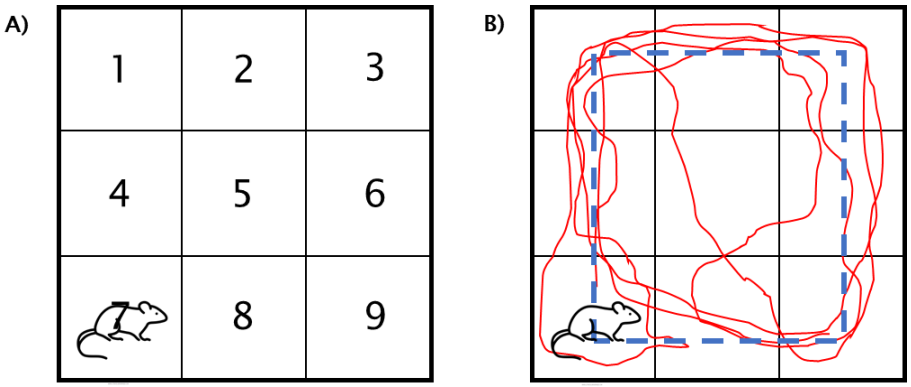


Figura 14. **A)** Esquema de la caja usada para la prueba de actividad locomotora en campo abierto. **B)** Recorrido de exploración del centro/periferia de la arena.

7.4 Pruebas de ciclicidad vaginal

Para determinar el ciclo estral en las ratas se obtuvieron muestras vaginales, para ello se usaron 18 ratas de 75 días de edad distribuidos en 5 grupos (TA, HV-Sham, HD-Sham, HV y HD), se colocó a la rata en una posición decúbito supino, se introdujo una asa bacteriológica estéril en la vagina para obtener una muestra de células con las que se realizó un frotis, se dejó secar

para su tinción inmediata con hematoxilina-eosina (Marcondes *et al.*, 2002). Se procedió con la determinación de la etapa por el monitoreo de tres ciclos estrales completos (cuatro a cinco días de duración por cada ciclo) al tomar una muestra por día, en un horario de 9:00 am.

7.4.1 Tinción Hematoxilina- Eosina

La técnica hematoxilina-eosina consistió en colocar una gota de hematoxilina sobre la muestra previamente colocada en el portaobjetos y dejándolo por un periodo de tres minutos (esta solución permite la tinción de los núcleos de las células) posteriormente, se enjuago con agua estéril evitando el chorro directo sobre la muestra. Inmediatamente se colocó una gota de eosina por 30 segundos sobre la muestra para la tinción del citoplasma y el posterior enjuague con alcohol (Taradach, 1982).
Una vez concluida la tinción, las muestras fueron observadas al microscopio óptico y categorizadas de acuerdo con la etapa del ciclo estral respetivamente, de acuerdo con el tipo celular con mayor proporción en cada frotis se determinó la etapa del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) (Figura 4).

7.5 Pruebas de fertilidad

Para la evaluación de la fertilidad, se usaron ratas de 90 días de edad, distribuidos equitativamente en los 5 grupos ya mencionados. Se les realizó frotis vaginal (9:00 am) y las hembras que fueron encontradas en la etapa de proestro (ver figura 18) , fueron depositadas individualmente en cajas con un macho adulto y de fertilidad comprobada (proporcionado por el Bioterio Claude Bernard), 24 horas después fueron extraídas, se corroboró la presencia de un tapón espermático y realizó un frotis para observar la presencia de espermatozoides y corroborar el posible día cero de preñez.

7.6 Sacrificio de animales

Los animales fueron sacrificados al primer estro vaginal en el Laboratorio de Histofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, mediante anestesia con ketamina-xilacina en dosis (i.p). de 0.2 ml/100 g de peso vivo (este método es de los más utilizados y avalado por los comités de bioética y la NOM-062-ZOO 1999 para realizar la perfusión y evitando el estrés en los animales para su posterior sacrificio, además se han realizado estudios que indican que su uso se caracteriza por la ausencia de la percepción dolorosa para el animal y la respuesta motora a

los estímulos externos). Una vez anestesiado el animal, se le realizó una incisión torácica exponiendo el corazón para realizar la perfusión cardíaca con solución Hartmann (250 ml), por el ventrículo izquierdo del corazón, realizando un corte a la vena cava superior (Figura 15b).

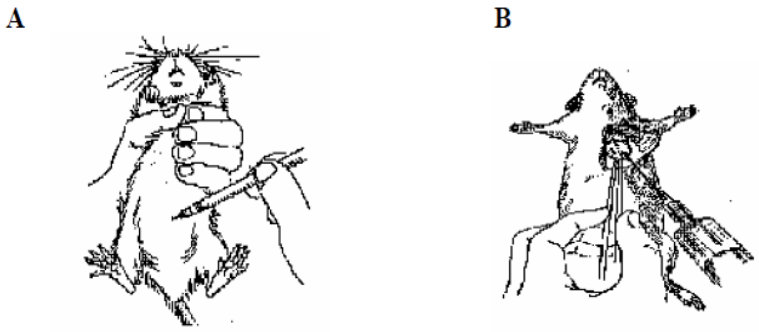


Figura 15. A) Administración vía ip. de ketamina-xilacina. B) Perfusión de la rata, con solución salina (Hartmann). Tomado de Romero, 2009.

7.6 Análisis histológico de los ovarios y del crecimiento folicular

Una vez sacrificados los animales se fijaron los ovarios en solución Bouin durante 24 h y posteriormente se lavaron con una solución de etanol al 70% v/v. Una vez eliminado el exceso del Bouin, se inició la deshidratación con cambios crecientes de alcohol y cloroformo. Pasadas 12 h se realizó un cambio de la solución Bouin por alcohol al 70%, con respectivos lavados sucesivos de alcohol al 70%, con la finalidad de disminuir los excesos de Bouin en los órganos. Posteriormente, los órganos se sometieron a deshidratación, realizando los siguientes cambios crecientes de alcohol y cloroformo.

- 1½ h de alcohol al 96%
- 1½ h de alcohol al 96%
- 1½ h de alcohol al 100%
- 2 h de alcohol al 100%
- Dejar toda la noche en cloroformo usado
- 2 h de cloroformo puro
- 2 h de parafina líquida 1er baño
- Colocar en bloques por 24 h

Una vez deshidratados, los órganos fueron incluidos en parafina durante 2 h. Después de ser incluidos los órganos en parafina, se realizaron cortes histológicos de 10 µm de espesor con

ayuda de un micrótomo manual (modelo: Erma Tokyo). Se utilizó la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina.

- 1.5 min Xilol
- 1.5 min. Xilol
- 1.5 min. alcohol 100%
- 1.5 min. alcohol 96%
- 1.5 min. Agua destilada
- 1.5 min. Hematoxilina de Meyer
- 5 min. Agua
- 5 min. Agua
- 5 min. Agua
- 15 s. Eosina
- 1.5 min. -OH 96%
- 1.5 min. -OH 100%
- 1.5 min. Carbol-Xilol
- 1.5 min. Xilol

Al término de la tinción, los cortes histológicos fueron cubiertos con resina sintética para su análisis mediante un microscopio óptico. A todos los folículos ováricos desde el estado primario al estado terciario, se clasificarán con o sin antro, así como sanos o atrésicos. En este último caso se precisarán la o las características que determinen que el folículo sea considerado como atrésico (picnosis, descamación de las células de la granulosa, alteración del ovocito, engrosamiento de la teca).

7.7 Determinación de hormonas esteroides sexuales

Para poder analizar si las lesiones en las áreas del hipocampo tienen un efecto en la capacidad de secreción de hormonas esteroides y gonadotrópicas se midieron las concentraciones séricas de estradiol, progesterona y testosterona, FSH y LH respectivamente mediante inmunoensayo enzimático (ELISA), siguiendo los procedimientos propuestos por el fabricante (Grupo MEXLAB., CDMX).

7.8 Tinción de Golgi-Cox

Para el proceso de impregnación, los cerebros se mantuvieron en solución Golgi-Cox ($K_2Cr_2O_7$ 170 mM, $HgCl_2$ 200 mM, K_2CrO_4 200 mM) durante 30 días en completa oscuridad, y con un cambio de solución Golgi-Cox a los 15 días después de la perfusión, posteriormente la

solución se reemplazó por una solución de sacarosa al 30% y se almacenó nuevamente en completa oscuridad durante 15 días, con un cambio de sacarosa al 30% a los 7 días antes de ser cortados (este último paso por sacarosa confiere al tejido flexibilidad, por lo que es menos propenso a la resequedad y a la fractura cuando se realizan los cortes).

7.8.1 Impregnación de cortes de cerebro con solución Golgi-Cox

Para los cortes histológicos, se montó el cerebro en un vibratomo motorizado (Camden Instrument, MA750) utilizando cianosacrílico como pegamento para posteriormente ser cubierto con agua destilada, se realizaron cortes coronales de 200 µm, se fijaron en laminillas previamente gelatinizadas al 4% presionándolas uniformemente con papel filtro. Los portaobjetos se almacenaron en una cámara húmeda, posterior a esto, se llevó a cabo el revelado de tinción en completa oscuridad (tomado y modificado de la técnica de Gibb y Kolb, 1998).

- Los portaobjetos se sumergieron en una solución de hidróxido de amonio durante 30 minutos.
- Un primer lavado con agua destilada durante 1 minuto.
- Posteriormente se sumergieron en fijador Kodak para película fotográfica (en una disolución 1:1) durante 30 minutos.
- Un último lavado en agua destilada durante 1 minuto.
- Deshidratación del tejido mediante el uso de concentraciones crecientes del alcohol.
  - 5 minutos en alcohol al 50%
  - 5 minutos en alcohol al 70%
  - 5 minutos en alcohol al 95%
  - 5 minutos en alcohol al 100%
- Finalmente los portaobjetos se sumergieron en xileno durante 15 minutos para aclarar el tejido.
- Los cortes fueron fijados con resina sintética en los portaobjetos y se dejaron secar en la oscuridad durante varios días para su posterior observación.

7.9 Densidad y tipificación de espinas dendríticas

Se localizaron neuronas piramidales de la región CA1, CA3, GD del hipocampo, se usó como guía el atlas estereotáxico de (Paxinos y Watson, 2007). De cada animal por cada región se analizaron 10 segmentos dendríticos (5 por hemisferio), analizándose un total de 750

neuronas. Para cuantificar el número de espinas dendríticas se utilizó un microscopio óptico con una cámara lúcida acoplada (Leica modelo DMSL) y se trazó un segmento de 5.4 cm (1000X), equivalente a 30 µm, de la dendrita más distal de las neuronas (árbol dendrítico basal de las neuronas piramidales), se contaron las espinas en dicho segmento y se obtuvo un promedio del número de espinas por cada 10 µm. De los mismos segmentos dendríticos, se realizó la clasificación morfológica de las espinas dendríticas. Para este propósito, utilizando un magnificador 2X (aumento total: 2000X) se clasificaron cien espinas consecutivas según la forma de su cabeza y su cuello en cinco grupos:

1. **Espinas delgadas**. Aquellas que presentaban una cabeza pequeña y un cuello largo.

2. **Espinas hongo**. Aquellas que presentaban una cabeza de gran tamaño y un cuello pequeño.

3. **Espinas gruesas**. Se caracterizan por ser pequeñas en tamaño, su cuello y cabeza son cortos y menos conspicuos que las espinas hongo.

4. **Espinas bifurcadas**. Aquellas que se encuentren bifurcadas

5. **Espinas sin clasificación**. Aquellas que no entren en las clasificaciones anteriores.

7.10 Análisis estadístico

Los datos sobre la edad de apertura vaginal, primer estro vaginal, el crecimiento folicular, tipo y estado folicular de los animales se analizarán con un ANOVA de dos vías. Los datos resultantes del análisis de Sholl: longitud dendrítica, la cual se analizará utilizando un ANOVA de una vía, arborización dendrítica, número de orden, todos analizados con un ANOVA de dos vías. Para cada uno de estos rasgos se utilizará el test de Tukey como prueba post hoc para comparaciones múltiples cuando se presenten diferencias significativas en las medias. Se utilizará un valor de significancia de $p \leq 0.05$ utilizando el programa Graph Pad Prism versión 8.0.

8. RESULTADOS

A continuación, se mostrarán los resultados del efecto de la lesión con ácido iboténico o lesión falsa en ratas hembras prepúberes de 21 días de edad.

En cuanto a pesos ováricos, solo se mostraron diferencias significativas en el ovario izquierdo. Los resultados de la prueba conductual de NORT muestran una disminución en la memoria a corto y largo plazo en animales con lesiones en comparación con los animales testigo absoluto.

8.1 Parámetros de pubertad

El registro de las edades de apertura vaginal y primer estro de los animales lesionados a los 21 días de edad en hipocampo dorsal o ventral y un grupo control mostraron diferencias significativas (Lesión: $F_{(4, 28)} = 27.49$ $p<0.0001$; parámetros de pubertad: $F_{(1, 7)} = 22.18$, $p=0.0022$; Lesión x parámetros de pubertad: $F_{(4, 28)} = 3.025$, $p=0.0342$.

La lesión con ácido iboténico realizada en las regiones del hipocampo dorsal y ventral en las ratas de 21 días de vida postnatal provocó un retraso en la edad de la apertura vaginal (HV: 47.38±1.9 vs HV-Sham: 44.63±1.9 vs TA: 39.50±1.9; HD: 48.63±1.9 vs HD-Sham: 44.13±1.9 vs TA: 39.50±1.9;) en comparación a las ratas con sólo lesión mecánica y en los animales sin ningún tipo de daño. Al analizar la edad del primer estro se presentaron diferencias significativas en todos los grupos experimentales (HV: 47.63±1.9 vs HV-Sham: 44.88±1.9 vs TA: 39.50±1.9; HD: 49.50±1.9 vs HD-Sham: 44.63±1.9 vs TA: 39.50±1.9) (Figura 16).

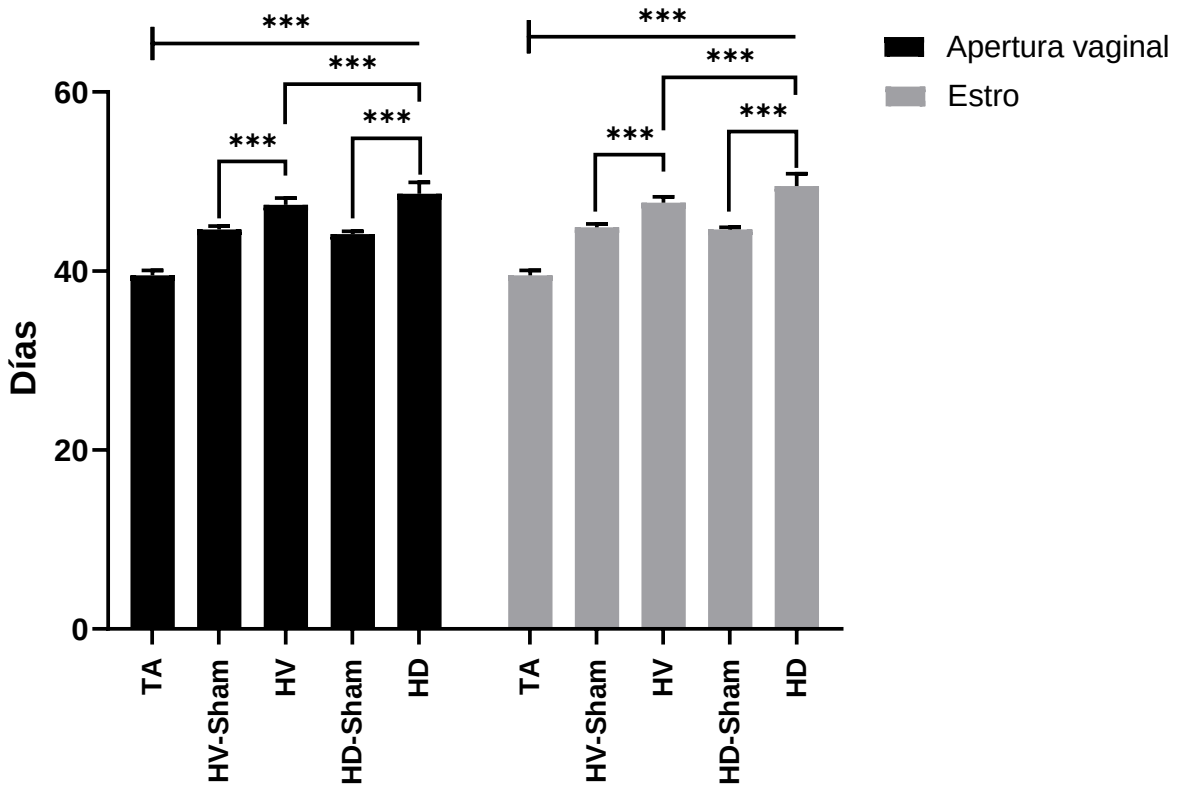


Figura 16. Comparación de edad de apertura vaginal y primer estro en ratas hembras púberes con lesión en hipocampo dorsal, ventral, lesión falsa y grupo testigo absoluto de la cepa Long-Evans. Se presentan las medias ± SEM con una n=8 ratas por grupo. ***p<0.001. (**TA**: Testigo absoluto; **HV**: Hipocampo Ventral; **HD**: Hipocampo Dorsal; **Sham**: Control).

8.2 Pesos ováricos

La lesión con ácido iboténico realizada en las regiones del hipocampo ventral en las ratas de 21 días de vida postnatal provocó un aumento de peso en el ovario izquierdo en comparación con los animales intactos ($F_{(1, 4)} = 12.18$, $p = 0.0251$) (HV: 22.48±1.7 vs TA: 14.10±1.5) por otro lado también se observó un aumento de los pesos ováricos de los animales con lesión falsa, comparándolos con los animales testigos (HV-Sham: 25.52±2.02 vs TA: 14.10±1.5). No se observaron cambios significativos en los pesos del ovario derecho en ninguno de los grupos experimentales, sin embargo, si hay una diferencia significativa entre el peso del ovario izquierdo y derecho del grupo HV-Sham (Figura 17), estos datos fueron obtenidos en relación con el peso del animal, por cada 100g p.v.

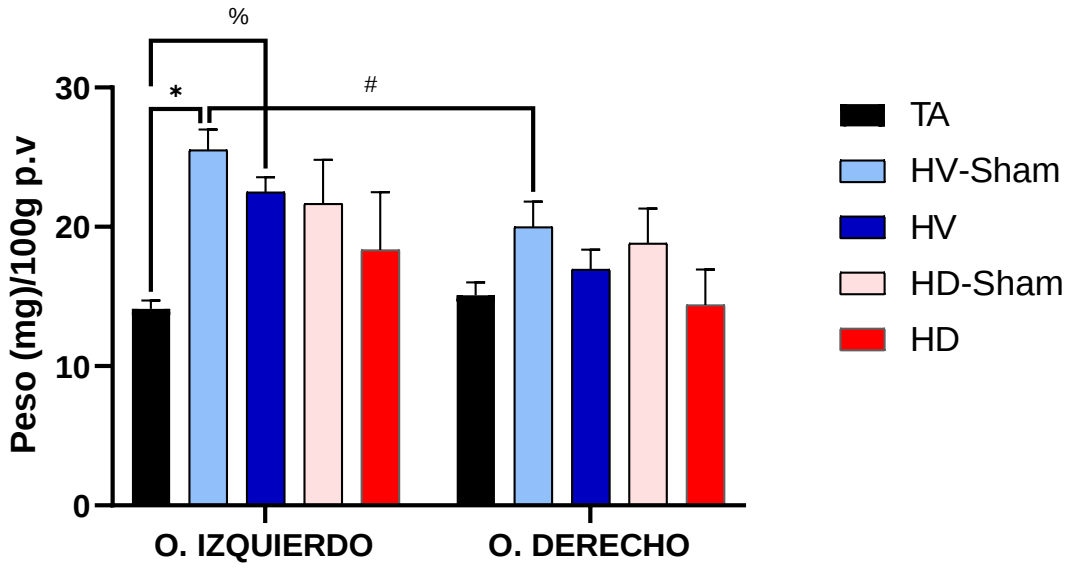


Figura 17. Comparación de los pesos ováricos de ratas hembras púberes con lesión en hipocampo ventral. Se presentan las medias ± SEM con una n=5 ratas por grupo, *p=0.03, %p= 0.04, #p= 0.01. (**TA**: Testigo absoluto; **HV**: Hipocampo Ventral; **HD**: Hipocampo Dorsal; **Sham**: Control).

8.3 Ciclicidad vaginal

Se realizó diariamente una evaluación semi cuantitativa general del frotis, de 3 ratas por grupo, considerando el porcentaje de células observadas en el exudado para clasificar las etapas del ciclo estral. Las ratas experimentales no muestran en su mayoría ciclos completos, excepto el animal 8 del grupo con lesión falsa en hipocampo ventral (HV-Sham). Por otro lado, los tres animales del grupo Testigo Absoluto presentaron de 2-3 ciclos completos, (tabla 1). En la figura 18 se muestran las células representativas de cada etapa del ciclo estral de la rata, considerando el estro como el comienzo de un nuevo ciclo.

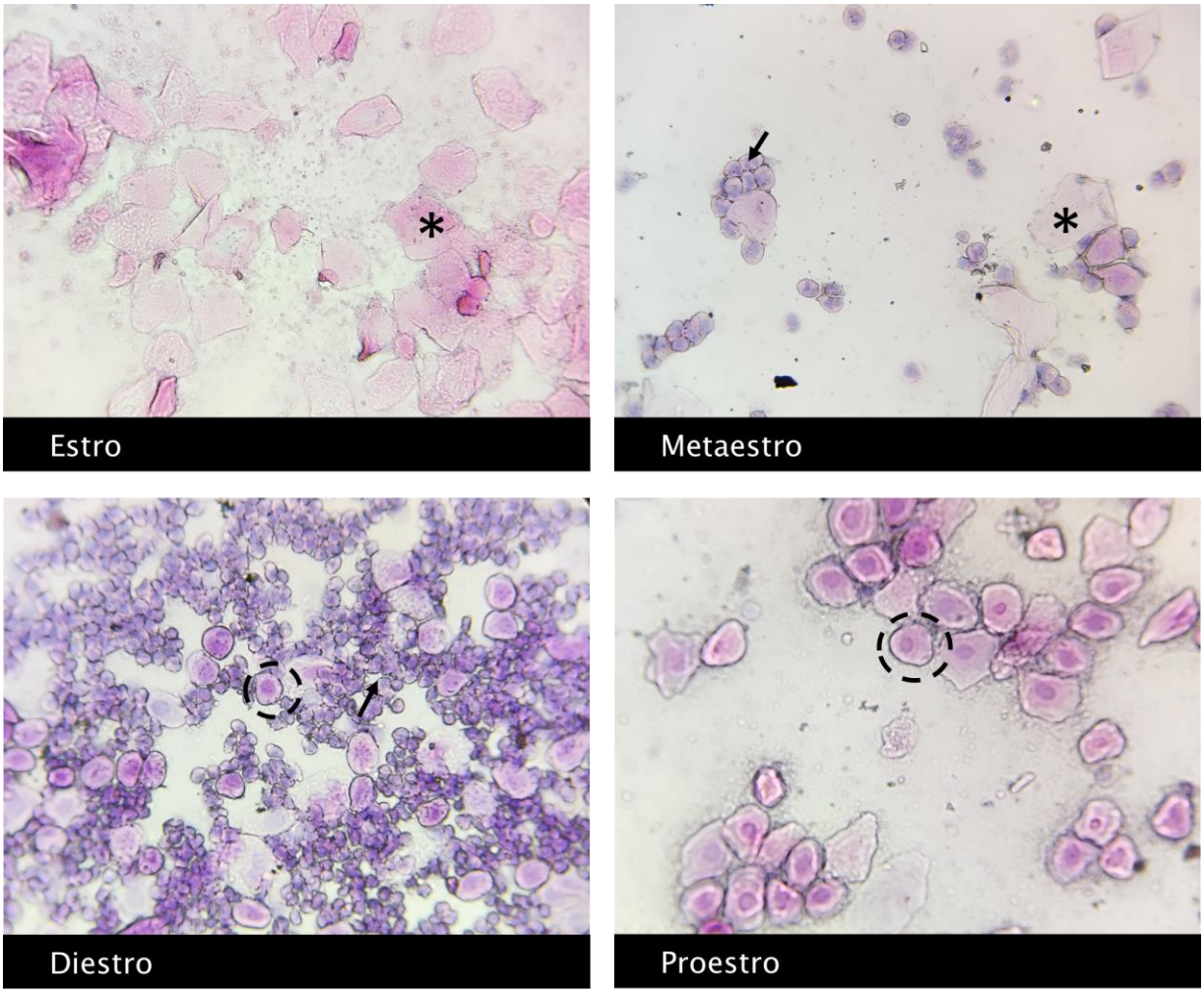
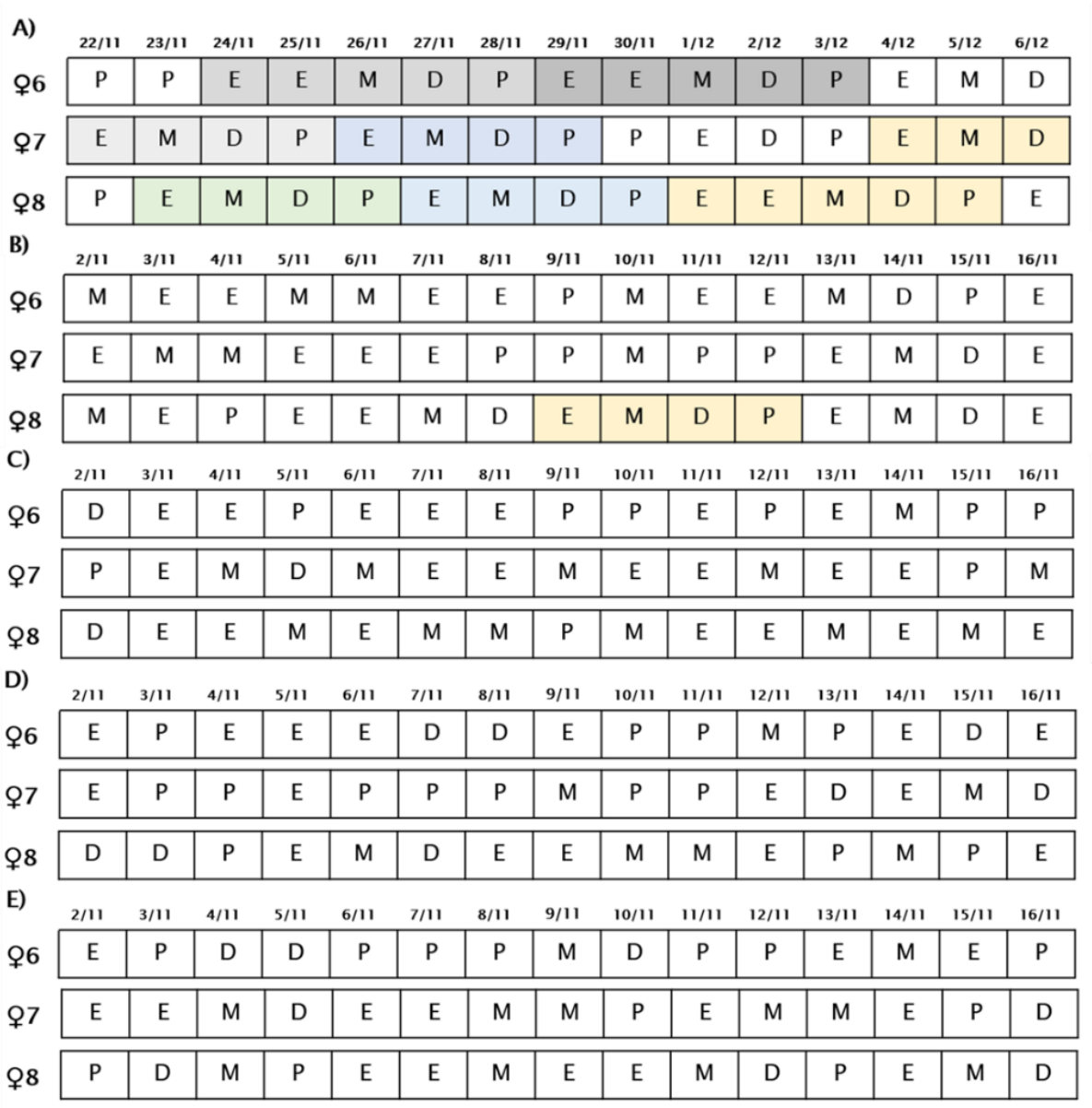


Figura 18. Células representativas de cada etapa del ciclo estral, se pueden diferenciar las células típicas: cornificadas *, leucocitos → y nucleadas ---, señaladas en la imagen (40x).

Tabla 1. Durante el período representado, los grupos **B**) HV-Sham, **C)** HV, **D**) HD-Sham, **D**) HD muestran un período prolongado de celo vaginal, el grupo **A**) Testigo Absoluto, presentan de 2-3 ciclos completos (con una n=3 ratas por grupo) (E= Estro, M= Metaestro, D= Diestro, P= Proestro).



A)

	22/11	23/11	24/11	25/11	26/11	27/11	28/11	29/11	30/11	1/12	2/12	3/12	4/12	5/12	6/12
♀6	P	P	E	E	M	D	P	E	E	M	D	P	E	M	D
♀7	E	M	D	P	E	M	D	P	P	E	D	P	E	M	D
♀8	P	E	M	D	P	E	M	D	P	E	E	M	D	P	E

B)

	2/11	3/11	4/11	5/11	6/11	7/11	8/11	9/11	10/11	11/11	12/11	13/11	14/11	15/11	16/11
♀6	M	E	E	M	M	E	E	P	M	E	E	M	D	P	E
♀7	E	M	M	E	E	E	P	P	M	P	P	E	M	D	E
♀8	M	E	P	E	E	M	D	E	M	D	P	E	M	D	E

C)

	2/11	3/11	4/11	5/11	6/11	7/11	8/11	9/11	10/11	11/11	12/11	13/11	14/11	15/11	16/11
♀6	D	E	E	P	E	E	E	P	P	E	P	E	M	P	P
♀7	P	E	M	D	M	E	E	M	E	E	M	E	E	P	M
♀8	D	E	E	M	E	M	M	P	M	E	E	M	E	M	E

D)

	2/11	3/11	4/11	5/11	6/11	7/11	8/11	9/11	10/11	11/11	12/11	13/11	14/11	15/11	16/11
♀6	E	P	E	E	E	D	D	E	P	P	M	P	E	D	E
♀7	E	P	P	E	P	P	P	M	P	P	E	D	E	M	D
♀8	D	D	P	E	M	D	E	E	M	M	E	P	M	P	E

E)

	2/11	3/11	4/11	5/11	6/11	7/11	8/11	9/11	10/11	11/11	12/11	13/11	14/11	15/11	16/11
♀6	E	P	D	D	P	P	P	M	D	P	P	E	M	E	P
♀7	E	E	M	D	E	E	M	M	P	E	M	M	E	P	D
♀8	P	D	M	P	E	E	M	E	E	M	D	P	E	M	D

8.4 Pruebas de fertilidad en ratas Long-Evans

Cada animal se sometió a pruebas de fertilidad, siendo 6 pruebas el número máximo, se observó que la lesión con ácido iboténico realizada en las regiones del hipocampo dorsal en las ratas de 21 días de vida postnatal provocó un aumento en el número de oportunidades de preñez realizadas por animal ($F_{(4, 20)} = 9.179$, $p=0.0002$), en comparación de su grupo control y el grupo de animales intacto (TA), siendo 5 el número de animales por grupo (HD: 4.2±0.5 vs HD-Sham: 2.0± 0.5 vs TA: 1±0.5) por otro lado también se observó que animales con lesión en hipocampo ventral no se encontraron diferencias significativas con su grupo control, pero sí con animales intactos (HV: 3.0±0.5 vs TA: 1±0.5) La tasa del número de preñez se redujo en animales con lesión en hipocampo dorsal [3/5], siendo solo 3 individuos los que alcanzaron un éxito de preñez en la tercera prueba (Figura 19).

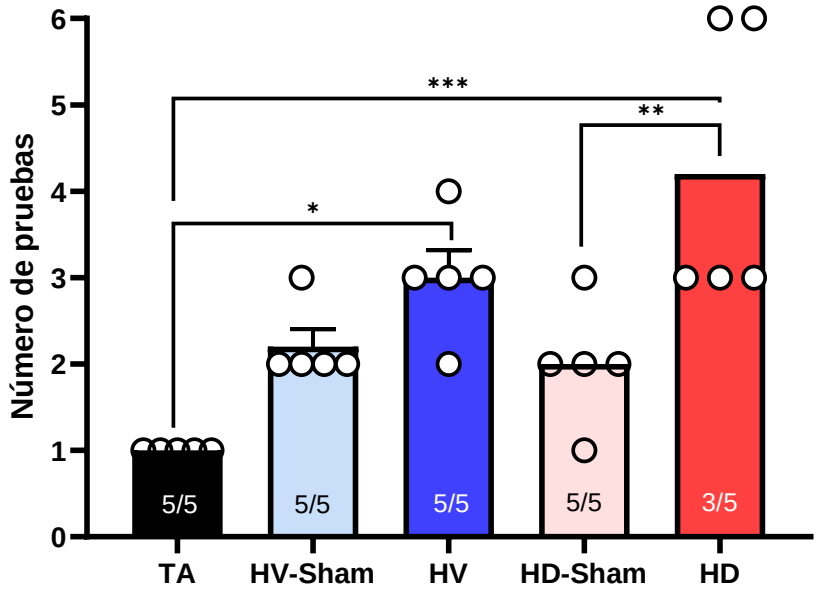


Figura 19. Pruebas de fertilidad en ratas de 90 días de edad. Se muestra la proporción de ratas [/5] preñadas por grupo experimental. Se presentan las medias ± SEM con una n=5 ratas por grupo. *p=0.0143, **p= 0.0065, ***p< 0.0001. (**TA**: Testigo absoluto; **HV**: Hipocampo Ventral; **HD**: Hipocampo Dorsal; **Sham**: Control).

8.5 Morfologia ovárica

8.5.1 Población folicular

Al analizar la población folicular los resultados mostraron una disminución significativa en el número de folículos sanos y un aumento de los folículos atrésicos en los grupos experimentales en comparación a los grupos HV-Sham, HD-Sham y el grupo TA ($F_{(1.733, 5.198)} = 120.3$) (Figura 20).

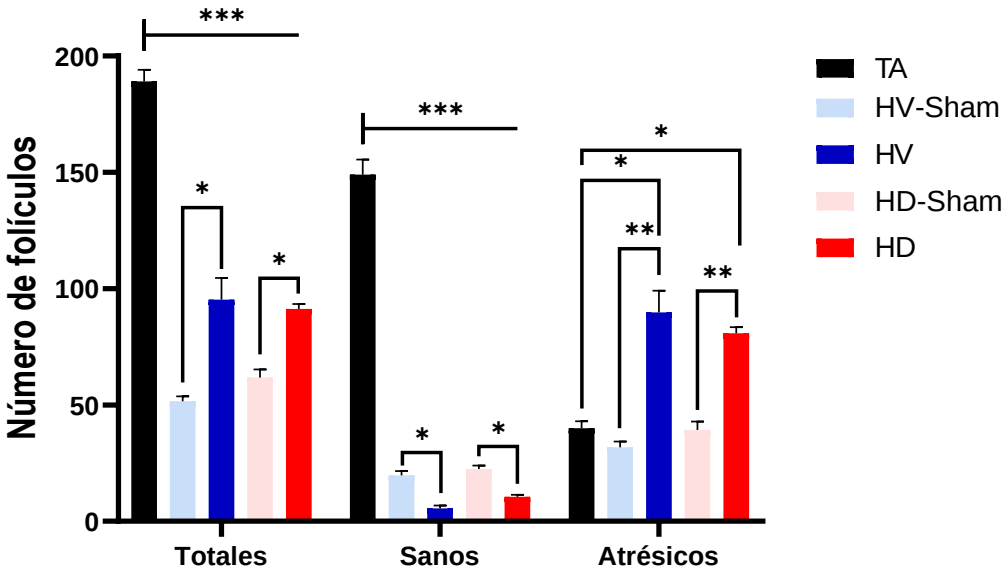


Figura 20. Población folicular. Las lesiones realizadas en hipocampo ventral y dorsal provocan una disminución de folículos sanos y un aumento en los folículos atrésicos en comparación con sus grupos controles y el grupo intacto. Se presentan las medias ± SEM con una n=5 ratas por grupo (ANOVA de dos vías, prueba de Tukey para comparaciones múltiples: *p=0.03, ***p=0.0007.

8.5.2 Crecimiento folicular

La clasificación de los folículos en preantrales y antrales, muestra que la lesión del hipocampo ventral o dorsal provoca una disminución significativa de ambos tipos de folículos observados en comparación con el grupo intacto, (Figura 21).

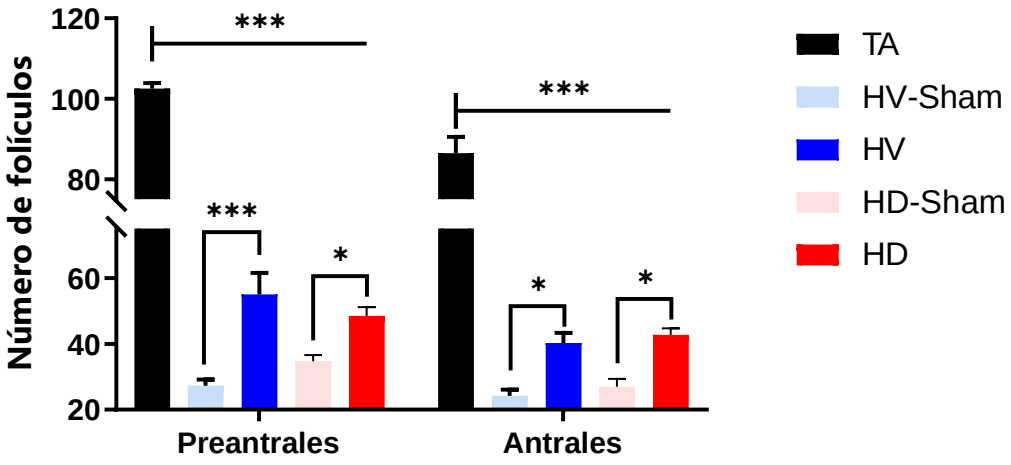


Figura 21. Crecimiento folicular. Las lesiones realizadas en hipocampo ventral y dorsal provocan una disminución de folículos preantrales y antrales en comparación con el grupo intacto, y un aumento en comparación con sus grupos controles. Se presentan las medias ± SEM con una n=5 ratas por grupo (ANOVA de dos vías, prueba de Tukey para comparaciones múltiples: *p=0.01, ***p<0.0001.

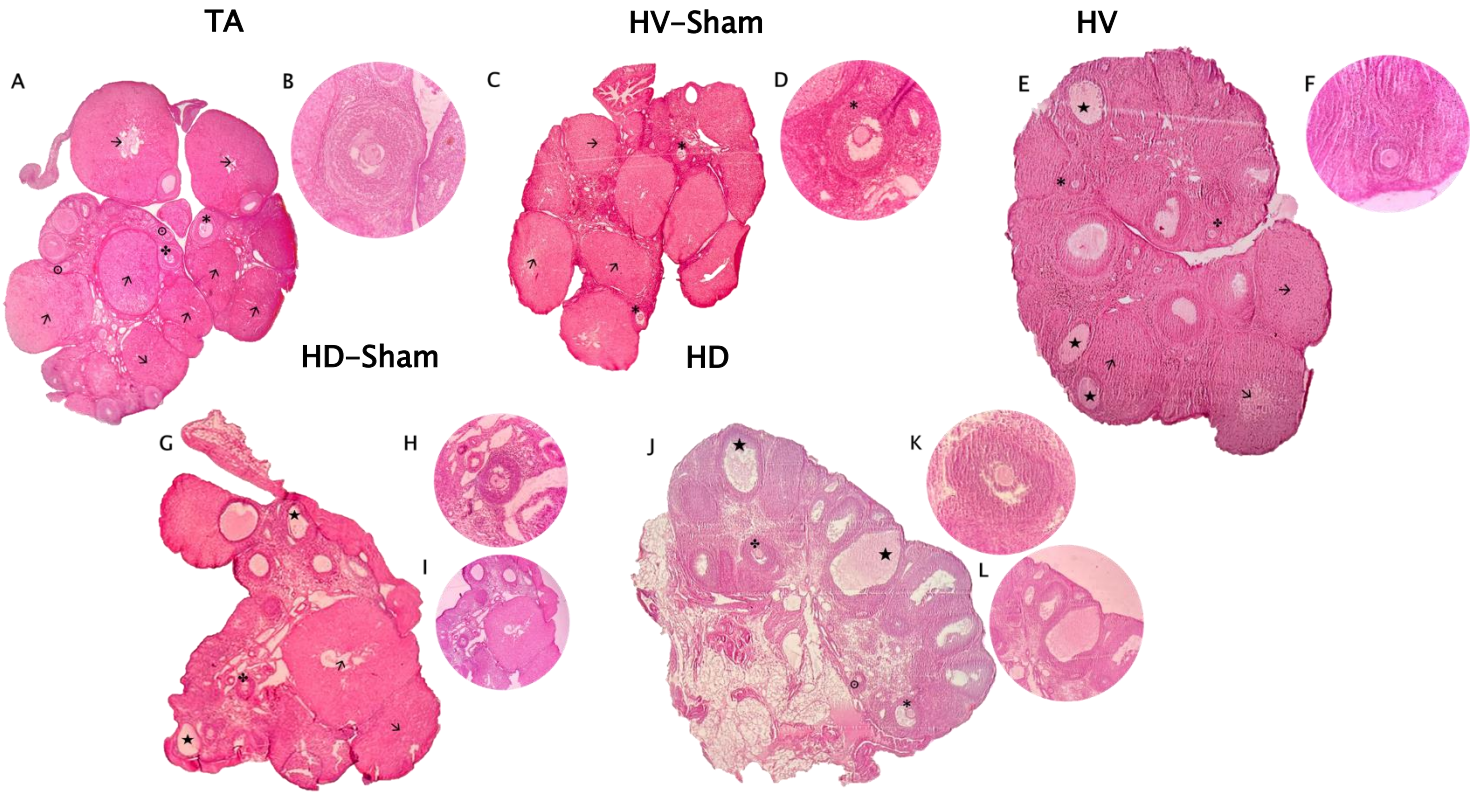


Figura 22. **Fotomicrografías de la morfología ovárica**. Cortes de ovarios de ratas en edad púber, sacrificados al primer estro vaginal. **A.** Vista panorámica de ovario de animal intacto, en edad prepúber **(TA)**. Se observa la presencian de folículos primarios multilaminar (⊙), folículo secundario (✤), cuerpos lúteos (🡪), folículo terciario (*)(Aumento 5x). **B.** Folículo secundario formado por varias capas de células granulosas en proliferación rodeando al ovocito y un pequeño antro (40x). **C**. Vista panorámica de ovario de animal con lesión falsa en hipocampo ventral a los 21 días de edad **(HV-Sham).** Se observa la presencian de folículos terciarios (*), abundantes cuerpos lúteos (🡪) (Aumento 5x). **D**. Folículo terciario (*) formado por varias capas de células granulosas en proliferación rodeando al ovocito y un antro pequeño (40x). **E.** Vista panorámica de ovario de animal con lesión con ácido iboténico en hipocampo ventral a los 21 días de edad (**HV**). Se observa la presencian de folículos primarios multilaminar (⊙), cuerpos lúteos (🡪), quiste (★)(Aumento 5x). **F**. Folículo primario multilaminar formado por tres capas de células granulosas en proliferación rodeando al ovocito (40x). **G**. Vista panorámica de ovario de animal con lesión falsa en hipocampo dorsal a los 21 días de edad (**HD-Sham).** Se observa la presencian de folículo secundario (✤), cuerpos lúteos (🡪), quistes (★)(Aumento 5x). **H**. Folículo primario secundario (✤) formado por varias capas de células granulosas en proliferación rodeando al ovocito y un pequeño antro (40x). **I**. Cuerpo lúteo (10x). **J**. Vista panorámica de ovario de animal con lesión con ácido iboténico en hipocampo dorsal a los 21 días de edad (**HD**). Se observa la presencian de folículo secundario (✤), folículos terciarios (*), quistes (★,)(Aumento 5x). **K**. Folículo primario secundario (✤) formado por varias capas de células granulosas en proliferación rodeando al ovocito y un pequeño antro (40x). **L.** Cuerpo lúteo (10x).

8.6 Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales en ambiente novedoso fueron utilizadas para evaluar a la memoria a corto y largo plazo, así como la LHV y LHD y las lesiones falsas de las ratas correspondientes a cada región y un grupo testigo absoluto, mediante el reconocimiento de objetos novedosos.

8.6.1 Reconocimiento de objetos novedosos después de la lesión, en ratas de 30 días de edad

A continuación, se muestran los resultados de la prueba conductual de NORT en ratas de la cepa Long-Evans, estas pruebas se realizaron después de la lesión, a los 30 días de vida postnatal con un (IR) que evalúa el tiempo que pasa con un objeto novedoso contra uno ya conocido, se realizó un ANOVA de dos vías con $F(8, 60) = 7.650$, $p < 0.001$ para la fase de la lesión seguido de la prueba de Tukey $p < 0.05$. Se observa que en la fase de entrenamiento los índices de discriminación de ambos grupos son cercanos a 0.5, esto sugiere que los grupos no presentan ninguna preferencia para alguno de los objetos. Posterior a dos horas de la primera fase de exposición, se puede observar una disminución en el índice de discriminación de los grupos experimentales (HV, HV-Sham, HD, HD-Sham) en comparación con el grupo intacto, y por último a las 24 horas después de la última exposición, se muestra una disminución en el índice de discriminación en los mismos grupos experimentales. Por otro lado, el grupo HV presenta un índice de discriminación disminuido tanto para la fase de memoria a corto como a largo plazo comparado con su grupo control HV-Sham (Figura 23).

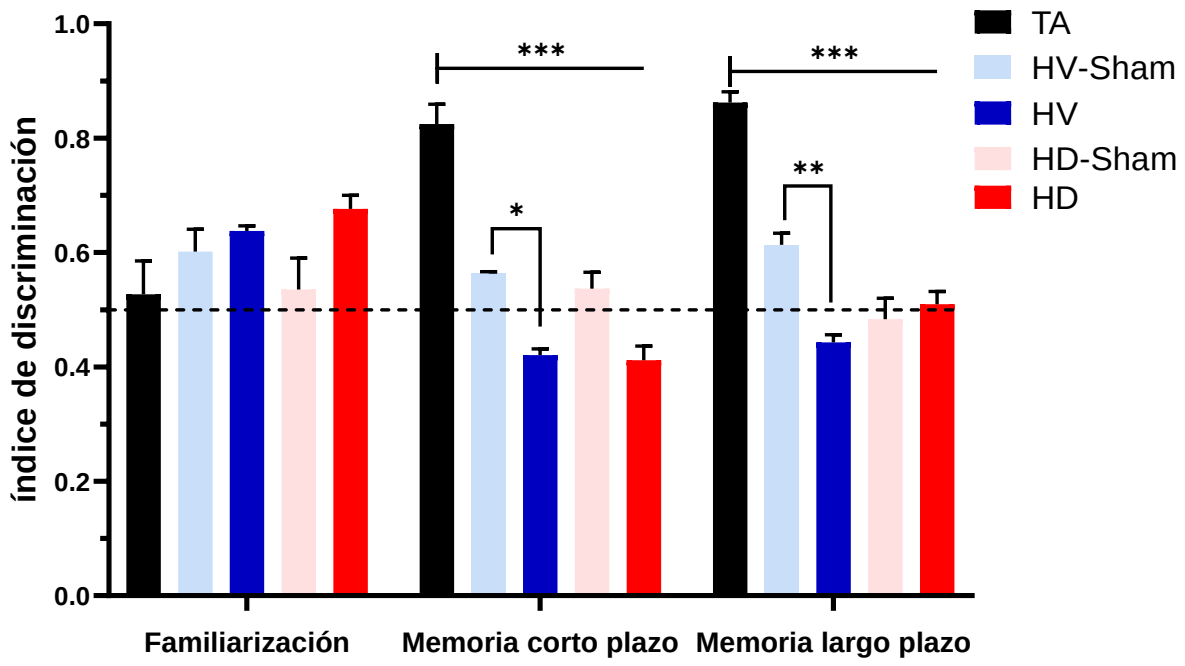


Figura 23. NORT después de la lesión a los 30 días de vida postnatal (memoria a corto y largo plazo) de la cepa Long-Evans con lesión HV, HD, lesión falsa y grupo testigo absoluto. Los valores indican el índice de reconocimiento o discriminación (IR) a objetos a 0 h, 2h y 24 h. La estadística se realizó mediante la prueba ANOVA de dos vías para datos pareados tomando a los grupos y el tiempo como variables independientes, se presentan las medias ± SEM con una n=5 ratas por grupo y valores de ***p< 0.001, **p= 0.009, *p= 0.028 como significativo.

8.6.2 Efecto de la lesión sobre la actividad locomotora en ratas Long-Evans

Se evaluó el efecto de las lesiones en hipocampo ventral (HV) y dorsal (HD). El análisis muestra que las ratas lesionadas en hipocampo dorsal (HD) tienen una mayor actividad motora $F_{(4, 20)} = 6.492$, p =0.0016) comparado con el grupo intacto (TA) $^{**}p = 0.0020$ y su grupo control (HD-Sham) $^{*}p = 0.0117$, (figura 24).

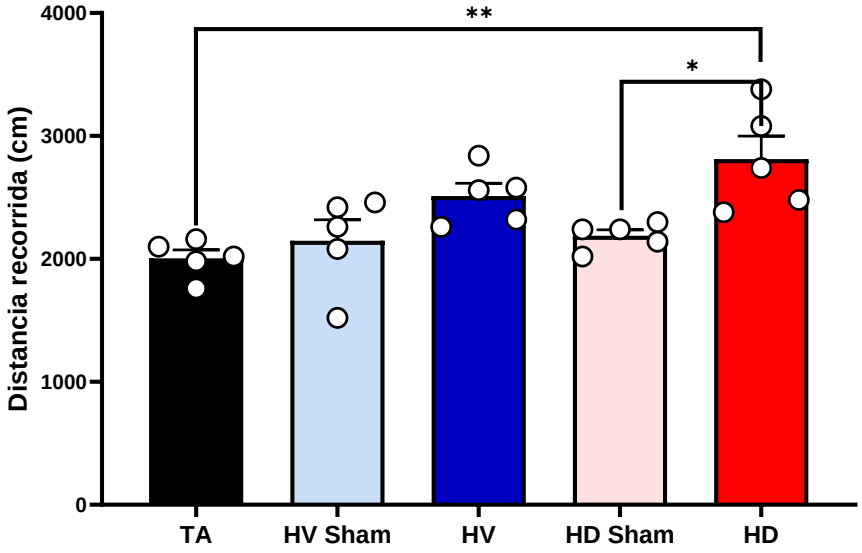


Figura 24. Actividad locomotora después de la lesión a los 30 días de vida postnatal de la cepa Long-Evans. Animales con lesión HV, HD, lesión falsa y grupo testigo absoluto. Los valores indican la distancia recorrida (cm) durante 10 minutos. Se presentan las medias ± SEM con una n=5 ratas por grupo (ANOVA de una vía, prueba de Tukey para comparaciones múltiples: **p= 0.002 contra intacto (TA), p = 0.019 contra lesión falsa (HD-Sham).

8.7 Efecto de la lesión sobre secreción de hormonas esteroideas en ratas Long-Evans

La lesión con ácido iboténico en las áreas de hipocampo ventral y dorsal aumentaron significativamente la concentración de **testosterona sérica** (Figura 25A), ($F_{(4, 20)} = 136.5$, p=0.0001), $p < 0.0001$ contra intacto, $p < 0.0001$ contra lesión falsa). Respecto a las concentraciones de **estradiol séricos** se observó una disminución (Figura 25B), ($F_{(4, 20)} = 52.71$, $p < 0.0001$), $p < 0.0001$ HV, HD vs contra intacto, p=0.0413 HV vs HV Sham y $p < 0.0001$ HD vs HD Sham), en cuanto lo resultados de **progesterona sérica** también se observó un disminución significativa (Figura 25C), ($F_{(4, 20)} = 27.85$, $p < 0.0001$), $p < 0.0001$ HV, HD vs contra intacto, p=0.0020 HV vs HV Sham y $p < 0.0001$ HD vs HD Sham.

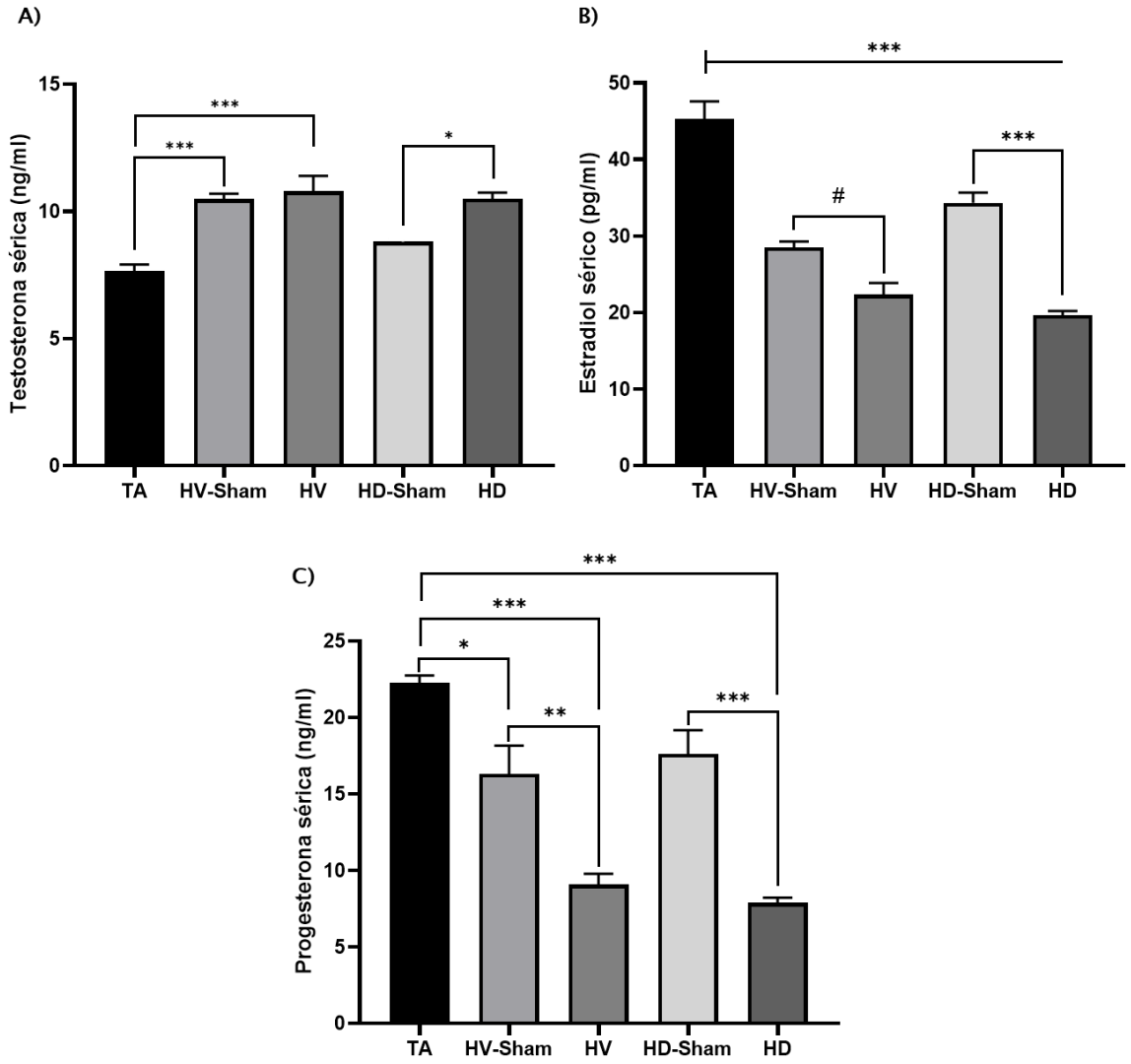


Figura 25. Concentraciones séricas de hormonas esteroideas. **A**) La LHV y LHD aumenta la secreción de testosterona sérica con respecto a sus grupos controles. **B**) Las lesiones realizadas en hipocampo ventral y dorsal provocan una disminución en la liberación de estradiol sérico. **C)** La liberación de progesterona sérica disminuyo considerablemente en los grupos con lesión en hipocampo ventral y dorsal. La estadística se realizó mediante la prueba ANOVA de dos vías, prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se presentan las medias ± SEM con una n=5 ratas por grupo: *p = 0.0143, #p =0.0121, **p = 0.0020, ***p < 0.001.

8.8 Efecto de la lesión sobre secreción de gonadotropinas en ratas Long-Evans

La lesiones realizadas en las áreas de hipocampo ventral y dorsal disminuyo significativamente la concentración de **FSH sérica** (Figura 26A), ($F_{(4, 20)} = 164.7$, $p < 0.0001$), $p = 0.0127$ HV vs TA, $p = 0.0074$: HD vs TA, p= 0.399 HD vs HD-Sham. Respecto a las concentraciones de **LH séricos** (Figura 26B), ($F_{(4, 20)} = 136.5$, $p < 0.0001$), $p = 0.0074$ HV vs TA, $p < 0.0003$: HD vs TA.

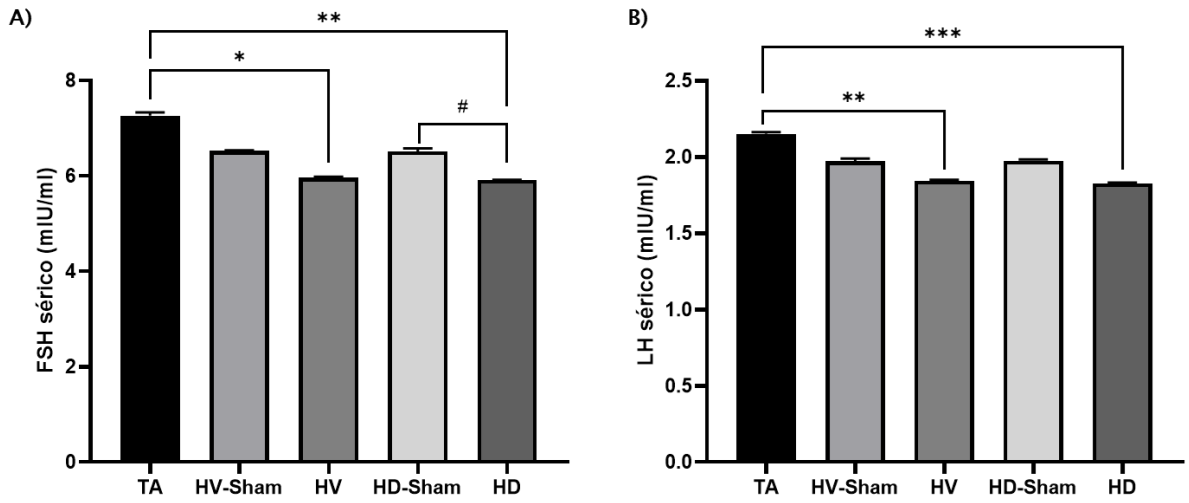


Figura 26. Concentraciones séricas de hormonas gonadotrópicas. **A**) La lesión HV y HD disminuye la secreción de FSH sérica. **B**) Muestra la disminución de la concentración de LH sérica en animales con lesión en hipocampo ventral y dorsal. (ANOVA de dos vías, prueba de Tukey para comparaciones múltiples, se presentan las medias ± SEM con una n=5 ratas por grupo, *p = 0.0127, #p = 0.0399, **p = 0.0074,
***p =.0003.

8.9 Verificación de la lesión

Las secciones teñidas con violeta de cresilo obtenidas de animales con lesiones en HD o HV en una edad prepuberal (21 días de edad) revelaron un daño bilateral del hipocampo dorsal o ventral. Dichas lesiones en animales de un grupo piloto permitieron verificar las coordenadas para localizar hipocampo dorsal o ventral (Figura 27), para posteriormente aplicarlas al grupo experimental, administrando ácido iboténico.

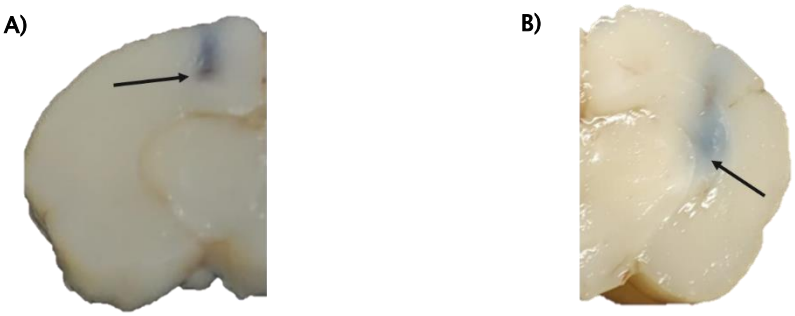


Figura 27. Fotografía de secciones coronales del hipocampo dorsal o ventral. A. Hipocampo dorsal. **B.** Hipocampo ventral. Secciones coronales del hipocampo teñidas con violeta de cresilo en ratas hembras de un grupo piloto con una lesión prepuberal (21 días de edad). La flecha indica la zona de administración.

8.9 Efecto de las lesiones sobre la neuroplasticidad estructural en regiones del hipocampo de ratas Long-Evans

En el área del Hipocampo dorsal (Figura 28A), la lesión en hipocampo ventral (LHV) redujo la densidad de espinas dendríticas basilares de las células piramidales y granulares ($F_{(2, 8)} = 33.69$, p=0.0001), $p < 0.0001$ contra intacto, $p < 0.0001$ contra lesión falsa), en las tres regiones del hipocampo evaluadas. Respecto a la clasificación morfológica de las espinas dendríticas la LHV redujo el número de espinas hongo en la **región CA1** (Figura 28B), ($F_{(2, 12)} = 184.2$, $p < 0.0001$; $p < 0.0001$ contra intacto y lesión falsa) y de espinas delgadas ($F_{(2, 12)} = 8.960$, p=0.0042; $p = 0.005$ contra lesión falsa), pero aumentó el número de espinas gruesas ($F_{(2, 12)} = 59.15$, p <0.0001; p <0.0001 contra intacto, p <0.001 contra lesión falsa). La LHV no tuvo efecto sobre el número de espinas bifurcadas y sin clasificación de estas neuronas.

La clasificación morfológica de las espinas dendríticas la LHV redujo el número de espinas hongo en la **región CA3** (Figura 28C), ($F_{(2, 12)} = 51.61$, p <0.0001; $p < 0.0001$ contra intacto y lesión falsa) y de espinas delgadas no se observaron diferencias significativas ($F_{(2, 12)} = 2.295$, p=0.1432), pero si aumentó el número de espinas gruesas ($F_{(2, 12)} = 86.26$, $p < 0.0001$; p

<0.0001 contra intacto y lesión falsa). La LHV tampoco tuvo efecto sobre el número de espinas bifurcadas y sin clasificación de estas neuronas.

Por último, en la **región de GD** también hubo una disminución de las espinas tipo hongo (Figura 28D), ($F_{(2, 12)} = 75.32$, $p < 0.0001$; $p < 0.0001$ contra intacto y lesión falsa) y de espinas delgadas no se observaron diferencias significativas, pero si aumentó el número de espinas gruesas ($F_{(2, 12)} = 8.196$, $p = 0.0057$; $p = 0.0005$ contra intacto y $p = 0.001$ lesión falsa). La LHV no tuvo efecto sobre el número de espinas bifurcadas y sin clasificación de estas neuronas.

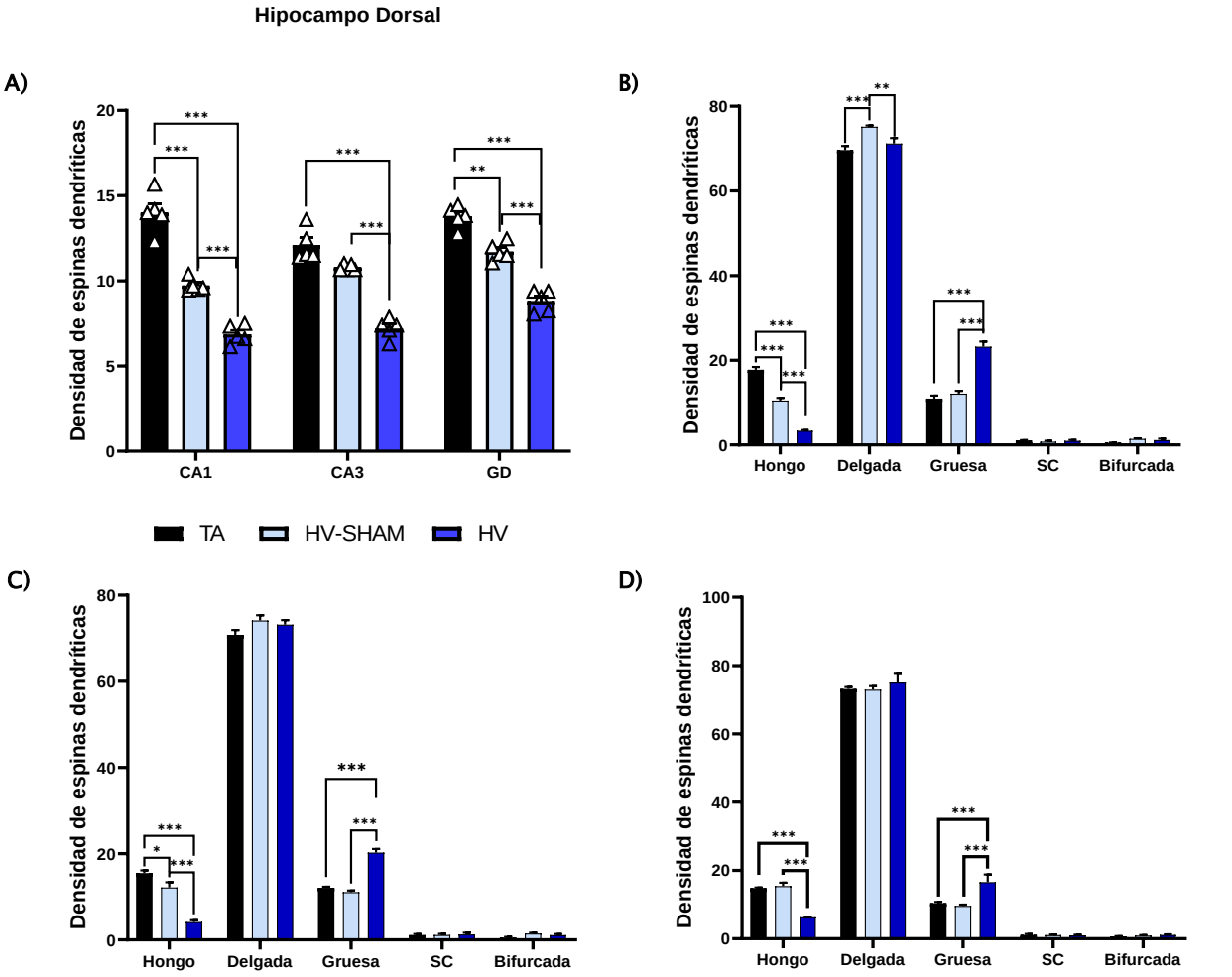


Figura 28. Neuroplasticidad estructural del hipocampo dorsal de ratas Long-Evans con LHV. **A**) La LHV disminuye el número de espinas en estas neuronas (CA1, CA3 y GD). **B-D**, clasificación morfológica de las espinas dendríticas. **B**) número de espinas en la región CA1. La LHV reduce el número de espinas hongo y delgadas, y aumenta el número de espinas gruesas. **C-D**, Número de espinas dendríticas de la región CA3 y GD, la LHV disminuye el número de espinas hongo y aumenta el número de espinas gruesas (ANOVA de dos vías, prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples: *p = 0.033, **p = 0.005, ***p < 0.001.

En el área del Hipocampo Ventral (Figura 29A), la lesión en hipocampo dorsal (LHD) redujo la densidad de espinas dendríticas basilares de las células piramidales ($F_{(2, 8)} = 25.95$, p=0.0003), $p < 0.0001$ contra intacto, $p < 0.0001$ contra lesión falsa), en las tres regiones del hipocampo evaluadas. Respecto a la clasificación morfológica de las espinas dendríticas la LHD redujo el número de espinas hongo en **región CA1** (Figura 29B), ($F_{(2, 12)} = 139.2$, $p < 0.0001$; $p < 0.0001$ contra intacto y lesión falsa) y de espinas delgadas ($F_{(2, 12)} = 13.40$, p=0.0009; $p = 0.001$ contra lesión falsa), pero aumentó el número de espinas gruesas ($F_{(2, 12)} = 59.6$, $p < 0.0001$; $p < 0.0001$ contra intacto y contra lesión falsa). La LHD no tuvo efecto sobre el número de espinas bifurcadas y sin clasificación de estas neuronas.

La clasificación morfológica de espinas dendríticas de la **región CA3** (Figura 29C), se observó una disminución de espinas tipo hongo ($F_{(2, 12)} = 61.78$, $p < 0.0001$; $p < 0.0001$ contra intacto y lesión falsa) y de espinas delgadas ($F_{(2, 12)} = 10.63$, p =0.0022; $p = 0.0266$ contra lesión falsa), pero si aumentó el número de espinas gruesas ($F_{(2, 12)} = 94.77$, $p < 0.0001$; $p < 0.0001$ contra intacto y lesión falsa). La LHD tampoco tuvo efecto sobre el número de espinas bifurcadas y sin clasificación de estas neuronas.

Por último, la clasificación morfológica de espinas dendríticas de la **región de GD** (Figura 29D), también se observó una disminución de espinas tipo hongo en la ($F_{(2, 12)} = 48.18$, $p < 0.0001$; $p < 0.0001$ contra intacto y lesión falsa) y de espinas delgadas no se observaron diferencias significativas, pero si aumentó el número de espinas gruesas ($F_{(2, 12)} = 61.16$, $p < 0.0001$; $p < 0.0001$ contra intacto y lesión falsa). La LHD no tuvo efecto sobre el número de espinas bifurcadas y sin clasificación de estas neuronas.

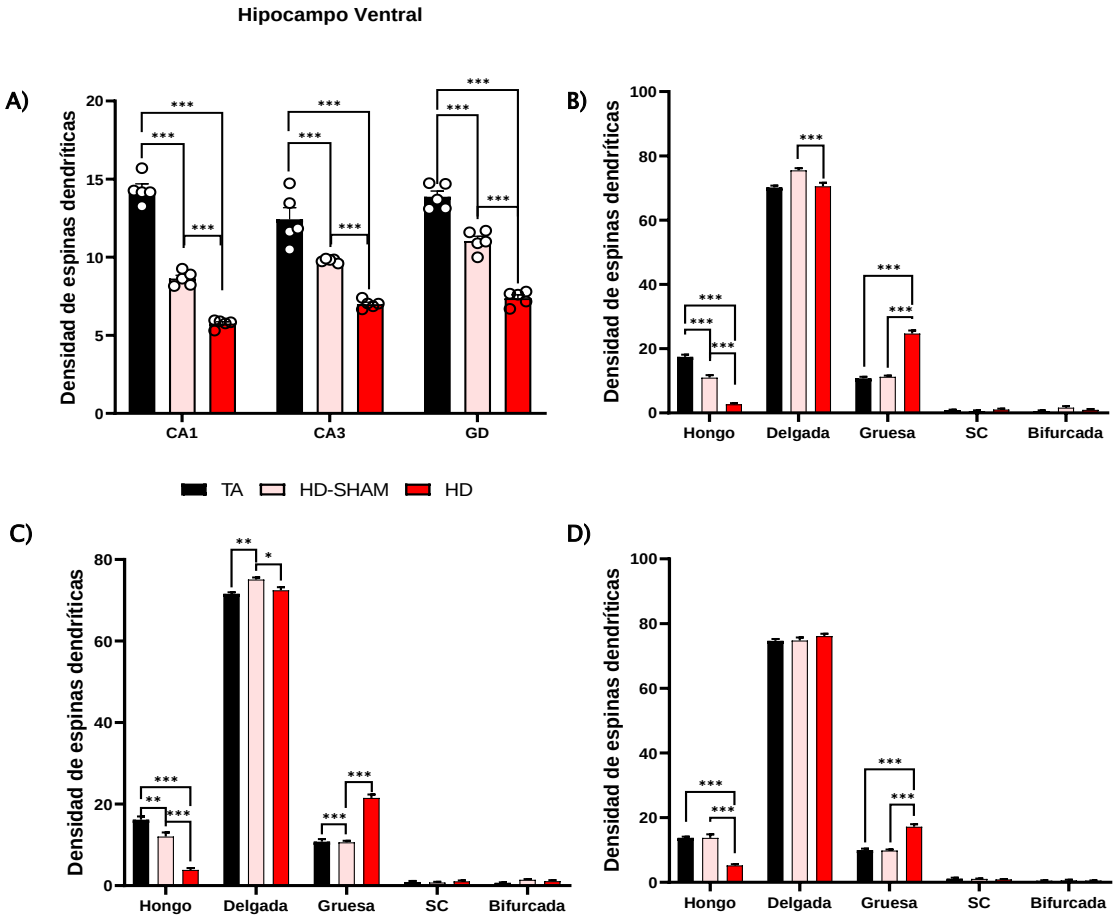


Figura 29. Neuroplasticidad estructural del hipocampo ventral de ratas Long-Evans con LHD. A) La LHD disminuye el número de espinas en estas neuronas (CA1, CA3 y GD). **B-D**, Clasificación morfológica de las espinas dendríticas. **B**) número de espinas en la región CA1. La LHD reduce el número de espinas hongo y delgadas, y aumenta el número de espinas gruesas. **C-D**, Número de espinas dendríticas de la región CA3 y GD, la LHD disminuye el número de espinas hongo y aumenta el número de espinas gruesas porcentajes de estos tipos de espinas (ANOVA de dos vías, prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples: *p= 0.02, ***p = 0.001.

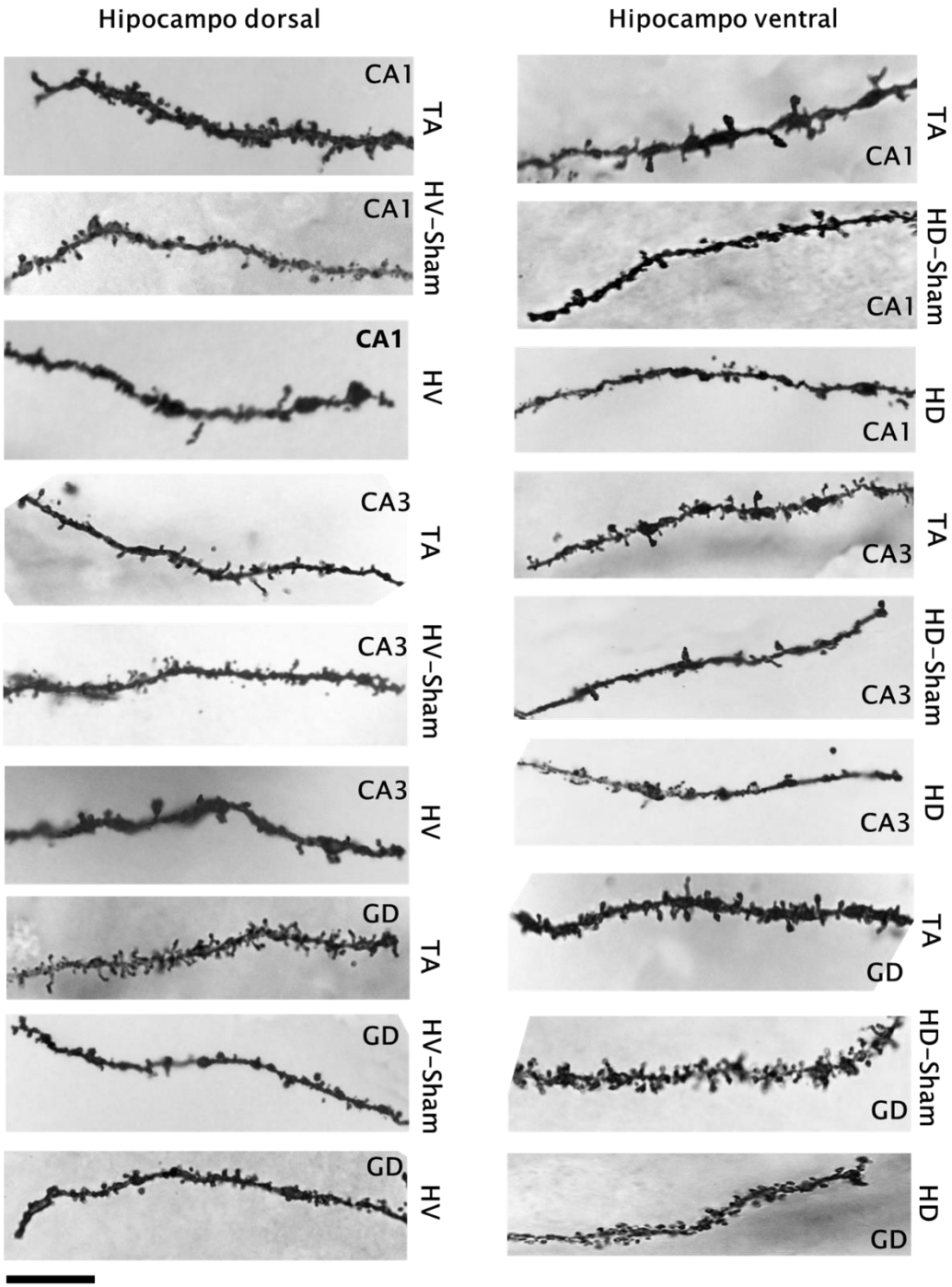


Figura 30. Fotomicrografías representativas de segmentos distales del árbol dendrítico basal de neuronas piramidales de las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo de cada uno de los grupos (n=5 por grupo; barra de escala = 10 µm), objetivo 200x.

9. DISCUSIÓN

Los resultados antes presentados apoyan la idea de la participación del hipocampo en los procesos reproductivos, la lesión hipocampal provocó cambios en los parámetros reproductivos, en la concentración de hormonas esteroideas y gonadotrópicas, en la morfología ovárica y la modulación de la plasticidad neuronal.

Nuestros resultados mostraron que la lesión realizada en las áreas de hipocampo ventral y dorsal provocan un retraso en la edad de la apertura vaginal y el primer estro en comparación a los animales con lesión falsa y el grupo testigo. La pubertad es un período importante para el desarrollo de las funciones cognitivas y de integración de señales y determina la función del hipocampo en la edad adulta (Yildirim *et al.,* 2008). Existen pocos datos que evidencian el papel de la participación del hipocampo en el inicio de la pubertad, aunque se cuenta con la información que permite inferir que dicha estructura puede ser mediador de procesos reproductivos, las hormonas como el estrógeno regulan la plasticidad sináptica en el hipocampo de roedores hembra (Woolley *et al.,* 1990; Woolley y McEwen, 1992). Tanto el estradiol como la testosterona pueden llegar al cerebro a través de la circulación sanguínea, se han realizado amplios estudios comprobando su papel en la modulación de la plasticidad y función del hipocampo (Woolley, *et al.,* 1997). Por otro lado, se observó un aumento significativo en los pesos gonadales en ratas con lesión bilateral del hipocampo ventral y dorsal en comparación con nuestros animales intactos, además de un aumento mucho más marcado en animales con lesión falsa, estos resultados concuerdan con lo reportado por el grupo de Riss *et al.,* (1963) encontraron que el daño hipocampal bilateral y del lóbulo piriforme está asociado con un desarrollo gonadal disminuido y cuerpos de timo más grandes a los 75-80 días de edad, tanto en ratas machos como hembras. Con base en evidencias experimentales, es importante considerar la posibilidad de que el hipocampo participe también como un neuroregulador en los circuitos involucrados en la respuesta endocrina y no sólo como una estructura asociada a la memoria y el aprendizaje.

En el presente estudio, se llevó a cabo la realización de frotis vaginales en ratas adultas durante un periodo de 15 días, antes de las pruebas de memoria y aprendizaje, estos resultados mostraron irregularidades del ciclo estral tanto en los animales con lesión hipocampal como con lesión Sham. Es probable que el procedimiento de la estereotáxica para alcanzar a las zonas de interés haya afectado parte de la comunicación neural que está involucrada con el eje neuroendócrino que regula el ciclo estral. Utilizando otros modelos de desnervación química (Lara *et al.,* 1990a,b) o quirúrgicas (Burden y Lawrence, 1977; Morales-Ledesma *et al.,* 2004) que bloquean la comunicación neural entre los ovarios y el SNC provocan aciclicidad

vaginal y cambios en la secreción de hormonas esteroides sexuales, tal y como lo observamos en nuestro estudio. Los animales se sometieron a pruebas de fertilidad y se observó que las ratas con lesión en hipocampo dorsal presentan una tendencia a un grado mayor de infertilidad que las ratas con lesión en hipocampo ventral. Estos resultados indican que hay una diferencia funcional en las regiones del hipocampo. Si bien se tiene establecido que la región ventral (anterior en primates) se relaciona con el estrés, la emoción y el afecto. Sorprendentemente, la expresión génica en el hipocampo dorsal se correlaciona con las regiones corticales involucradas en el procesamiento de la información, mientras que los genes expresados en el hipocampo ventral se correlacionan con las regiones involucradas en la emoción y el estrés (amígdala e hipotálamo) (Swanson y Cowan, 1977; Moser *et al.,* 1995; Fanselow y Dong, 2010; Dedovic *et al.,* 2009).

Evaluamos también el desarrollo de la prueba de objetos novedosos para tener un índice de la memoria a corto y largo plazo. Sabemos que el aprendizaje es esencial para que los organismos se adapten a los cambios en su entorno evidenciando así la importancia de la plasticidad conductual y con ello la plasticidad del sistema nervioso para tener más posibilidades de aprendizaje, el cual puede resultar en cambios duraderos de la conducta (Morgado, 2005). Se ha reportado que los roedores dedican una mayor cantidad de tiempo interactuando o explorando objetos novedosos en comparación a aquellos objetos que les resultan familiares. La conducta exploratoria en respuesta a la novedad podría basarse en los siguientes postulados (Berlyne, 1950):

- Cuando un estímulo nuevo afecta los receptores de un organismo ocurrirá una respuesta dirigida hacia el estímulo (llamada curiosidad).
- Mientras un estímulo novedoso continúe afectando los receptores del organismo la curiosidad disminuirá.

Por lo tanto, para evaluar la memoria de trabajo se utilizó el NORT, que es una prueba sin refuerzos basada exclusivamente en la conducta exploratoria y la neofilia innata de las ratas (Ennaceur y Delacour, 1988; Lueptow, 2017; Bevins, 2006).

La cantidad de tiempo que dedica el roedor a explorar el objeto nuevo provee un índice de su memoria de reconocimiento. En nuestro estudio, los resultados de esta prueba muestran que hay una disminución significativa en el índice de retención de memoria a corto y largo plazo en las ratas con lesión en hipocampo ventral en comparación con el grupo intacto y lesión falsa, indicando su incapacidad para discriminar al objeto novedoso del objeto constante, por otro lado, los animales con lesión en hipocampo dorsal también reflejan una disminución de la memoria a corto y largo plazo comparados con el grupo intacto. Hay evidencias que sugieren que los estrógenos pueden mejorar o perjudicar el aprendizaje y la memoria dependiendo de

las cualidades de la tarea. Una de las regiones más estudiadas es la formación del hipocampo dorsal, que gobierna la formación de recuerdos espaciales y episódicos (Dohanich, 2002; Zurkovsky *et al.,* 2006).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Ma *y colaboradores en* 2020, ellos observaron la lesión inducida por la isquemia cerebral global en ratones que habían experimentado privación de estrógenos tanto a corto plazo y largo plazo (ovariectomizadas), mostraron una disminución de las proteínas receptoras de estrógenos en el hipocampo y la disminución de la expresión de aromatasa en el hipocampo. Esto podría estar relacionado con la capacidad de discriminar tareas, el aprendizaje y la memoria. Una revisión más exhaustiva por el grupo Zafer (2019) indican que la participación de los receptores de estrógenos (ERα, ERβ) es fundamental para mediar los efectos protectores de los niveles fisiológicos de estradiol después de una isquemia cerebral en roedores hembras adultas, concluyen que la mediación de estrógenos sobre la neuroprotección del hipocampo estaría desempeñando un papel importante en la preservación de la memoria (Zafer *et al.,* 2019).

Interesantemente, el análisis de la actividad locomotora mostró en nuestros animales una mayor hiperactividad en los animales con lesión en hipocampo dorsal en comparación con los animales intactos y lesión falsa. La actividad locomotora ante ambiente novedoso permite evaluar el tono dopaminérgico en el NAcc de manera indirecta (Flores *et al.,* 1996). Por lo tanto, el aumento en la actividad locomotora sugiere la hiperactividad de la vía mesolímbica en las ratas con LHD, alterando la conectividad del sistema corticolímbico, además de mediar en parte los efectos de estímulos biológicamente significativos (de refuerzo) sobre el aprendizaje (Beninger, 1983).

En cuanto al análisis del crecimiento folicular, nuestros resultados mostraron que los animales con lesión en HV e HD presentaron una menor población de folículos en crecimiento y un incremento del porcentaje de folículos con características atrésicas. El grupo de Morán *et al.,* (2003) mostraron que en la rata hembra neonata la desnervación sensorial inducida por la administración de capsaicina, retrasó la edad de la pubertad, además de una disminución de los folículos ováricos, curiosamente estos folículos se presentan en estado atrésico, lo que concuerda con nuestros resultados. En nuestro laboratorio también hemos observado que la administración de capsaicina en ratas hembras neonatas, provoca un retraso en la pubertad y un aumento en folículos atrésicos que está acompañado en una disminución de la longitud dendrítica y número de orden en la región CA1 del hipocampo. Estos resultados permiten apoyar la idea de que la inervación sensorial del ovario envía la información al Sistema Nervioso Central necesaria para la regulación de la función ovárica. En esta misma dirección, los resultados ya presentados muestran una mayor concentración de testosterona en animales

lesionados en HV e HD en comparación con sus grupos controles, curiosamente la secreción ovárica no es similar para las tres hormonas esteroideas estudiadas, observamos que los niveles de E_2 y progesterona (P_4) se encuentran disminuidos en los animales experimentales en comparación con los grupos controles y los animales intactos, así como una disminución en las concentraciones de FSH y LH. Apoyando lo anterior, hemos demostrado que la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina provoca una disminución significativa en la secreción de estrógenos (Morán *et al.,* 2003; Quiroz *et al.,* 2014). Se ha observado también que las señales neuronales que llegan al ovario a través del nervio ovárico superior modulan la secreción de P_4 , T y E_2, en un estudio realizado por el grupo de Morales-Ledesma (2012), demuestran que la sección del SON, provoca en animales púberes una disminución en las concentraciones séricas esteroideas y gonadotrópicas, si bien nuestro modelo no involucra la sección del nervio ovárico superior, es importante reconocer que las fibras neurales que surgen de los ovarios transportan información neural al hipotálamo, y no podemos excluir la posibilidad de que la información neuronal que proviene del hipocampo module a través de las conexiones que tiene con el hipotálamo los procesos de secreción para cada hormona, fenómeno que observamos en nuestros resultados. Por otro lado, la posible disminución de estrógenos en el grupo de animales con lesión hipocampal explicaría la disminución de la densidad de espinas dendríticas, específicamente las que presentan características tipo hongo.

Las lesiones en HV e HD en ratas Long-Evans redujo el porcentaje de espinas hongo y aumentó el porcentaje de espinas gruesas en las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA3 y GD. Estas alteraciones de la plasticidad estructural de las neuronas se estarían relacionando con la hiperactividad locomotora en ambiente novedoso en los animales con lesión en HD y con la alteración en la memoria y aprendizaje de estos animales. Por otro lado, es posible que también que los cambios en la morfología dendrítica estén asociados a la disminución de las concentraciones séricas de estrógenos. Se sabe que el estrógeno es una hormona esteroide gonadal que influye mucho en el comportamiento y las respuestas fisiológicas neuroendocrinas. También desempeña un papel importante en el cerebro, por ejemplo, en la regulación del neurodesarrollo, la plasticidad y el comportamiento reproductivo (Hösli y Hösli,1999). Dado que el estradiol como la testosterona pueden llegar al cerebro a través de la circulación sanguínea, se han realizado amplios estudios para investigar su papel en la modulación de la plasticidad y función del hipocampo (Woolley *et al.,* 1997). Anteriormente Woolley *et al.,* (1993) demostraron el efecto del estradiol y la progesterona en ratas ovariectomizadas sobre la densidad de las espinas dendríticas en las células piramidales CA1 del hipocampo de ratas hembras, en donde observaron el aumento de la densidad dendrítica a partir de las 24 horas posterior a la administración de estradiol, por otro lado, mostraron

que la progesterona tiene un efecto bifásico sobre la densidad de las espinas, es decir, que la administración de progesterona después del estradiol provoca un aumento inicial, pero luego causa una disminución mucho más aguda. Estos resultados son similares a los encontrados previamente por Gould *et al.,* (1990) quienes sugieren fluctuaciones naturales de la densidad de las espinas dendríticas y de la expresión de receptores a estrógenos durante el ciclo estral, contrario a lo propuesto por Andrade *et al.,*(2000) quienes reportan que no hay variaciones en la densidad de espinas dendríticas por influencia del ciclo estral mientras que Brusco *et al.,* (2008) y Chen *et al.,* (2009) demuestran que durante las etapas del ciclo estral la densidad de espinas dendríticas varía. No se puede descartar que los cambios observados en la morfología dendrítica de neuronas piramidales CA1, CA3 y GD en los animales con lesiones en HV e HD estén asociados a un estímulo en la vía neural ovario-hipotálamo-hipocampo que estimuló un retraso de la pubertad y los cambios en el crecimiento folicular ya mencionados.

La disminución de las espinas hongo y el aumento de las espinas gruesas en las regiones del hipocampo estudiadas de las ratas Long-Evans con lesión HV e HD, sugiere que la neuroplasticidad funcional y estructural está alterada. Además de otros fenómenos que puedan modificar la neuroplasticidad, por ejemplo, la disfunción de la actividad de los factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), actividad glutamatérgica, la neuroinflamación y el estrés oxidativo podrían estar contribuyendo a las alteraciones de la neuroplasticidad de las espinas dendríticas. Además, la plasticidad de las espinas dendríticas puede verse modificada por varios factores, como la actina que está regulada por GTPasas de la familia Rho y los receptores AMPA que promueven la formación de espinas dendríticas mediante la activación al aumentar los niveles de Ca^{2+} en las neuronas del hipocampo. Los receptores NMDA regulados por estrógenos también se han asociado con un aumento en el tamaño y la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales del hipocampo (Ethell y Pasquale, 2005).

El grupo de Kolb (1998), sugieren que los cambios en la morfología neuronal pueden ser complemente independientes. El daño hipocampal puede tener implicaciones importantes en no sólo la función del hipocampo y en los procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje, sino también para comprender el comportamiento del individuo. Además de la participación e influencia de las hormonas ováricas puede tener implicaciones especialmente importantes para la plasticidad sináptica diferencial en diferentes momentos del ciclo menstrual. Además de estudios realizados mediante la administración de benzoato de estradiol se ha observado que promueve la maduración de espinas dendríticas, el grupo del Dr. Li (2004) sugiere que algunas espinas cambian de una estructura delgada similar a un

filopodio a espinas con cuello y cabezas más grandes y bien definidos (espinas tipo hongo) (Li *et al.,* 2004).

Nuestros resultados respaldan la idea de que los cambios a nivel hipocampal pueden tener una influencia en los ovarios a través de una inervación neural, formado por estructuras hipotalámicas y extrahipotalámicas (como el hipocampo). En este sentido, sugerimos un posible eje hipocampo-hipotalámico-pituitario-gonadal, que regule la secreción de hormonas esteroides, el crecimiento folicular y la ovulación, además de la modulación de la neuroplasticidad de espinas dendríticas.

10. CONCLUSIONES

- La lesión con ácido iboténico realizada en hipocampo dorsal y ventral de manera bilateral en ratas de 21 días de vida postnatal provocó un retraso de la pubertad.
- La lesión realizada en las regiones del hipocampo ventral provocó un aumento de peso en el ovario izquierdo en comparación con los animales intactos en la edad púber.
- Las ratas experimentales no muestran en su mayoría ciclos completos, es decir, presentaron aciclicidad vaginal.
- La lesión realizada en las regiones del hipocampo dorsal en ratas prepúber provocó un aumento en el número de oportunidades de preñez realizadas por animal.
- La población folicular mostró una disminución significativa en el número de folículos sanos y un aumento de los folículos atrésicos en los grupos experimentales.
- Se observó una disminución significativa en el índice de retención de memoria a corto y largo plazo en las ratas con lesión en hipocampo ventral y dorsal.
- Los animales con lesión en hipocampo dorsal presentan una mayor hiperactividad motora.
- Los resultados indican una mayor concentración de testosterona en animales que presentan una lesión en HV e HD. La secreción de los niveles de E2, P4, FSH y LH se encuentran disminuidos en los animales experimentales.
- La lesión en hipocampo dorsal y ventral en ratas Long-Evans a los 21 día de edad, presentan en etapa púber una disminución de las espinas hongo y el aumento de las espinas gruesas en las regiones del hipocampo estudiadas.

11. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo aportan más evidencias sobre una relación bidireccional entre los ovarios y el hipocampo. Sería pertinente explorar si esta relación bidireccional está sustentada por una vía neural directa entre los ovarios y el hipocampo o bien es el resultado de una interacción neuroendocrina del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en el cual también participarían estructuras extrahipotalámicas como el hipocampo.

12. REFERENCIAS

Altamirano Bautista, A (1994). Manual para manejo de animales de laboratorio. México, *Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM*. (pp. 98).

Amaral, D. G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. Current opinion in neurobiology, 3(2), 225-229.

Amaral, D. y Lavenex, P. (2007). Hippocampal neuroanatomy. In: En P. M Andersen, The Hippocampus Book. (pp. 60-80). New York, USA: *Oxford University Press*, Inc.

Amaral, D.G. y Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591.

Antunes, I. B., Silva, A. D., Kawakami, R., y Andersen, M. L. (2016). The female rat. In Rodent model as tools in ethical biomedical research (pp. 95-109). *Springer*, Cham.

Arai, A. C. (2009). The role of kisspeptin and GPR54 in the hippocampus. Peptides, 30(1), 16-25.

Asselin, E., Xiao, C. W., Wang, Y. F., y Tsang, B. K. (2000). Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis. *Neurosignals*, *9* (2), 87-95.

Barker, J. M., y Galea, L. A. (2008). Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuroscience*, 152(4), 888-902.

Basu, S., y Lamprecht, R. (2018). The role of actin cytoskeleton in dendritic spines in the maintenance of long-term memory. *Frontiers in molecular neuroscience*, *11*, 143.

Bello-Medina, P., Gómez-Pérez, E., Quirarte, G., Prado-Alcalá, R., y Medina, A. (2018). Consolidación de la memoria: de las moléculas a las espinas dendríticas. En: De la actividad neuronal a la conducta. *Editorial Universidad de Guadalajara* pp. 103-125.

Bello-Medina, P.C., González-Franco, D.A. y Andrea, C. M. (2018). El hipocampo: historia, estructura y función. TEPEXI Boletín Científico de la Escuela Superior Tepeji del Río, 5(10).

Beninger, R. J. (1983). The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Research Reviews*, *6*(2), 173-196.

Benítez, A., Riquelme, R., Del Campo, M., Araya, C., y Lara, H. E. (2021). Nerve growth factor: A dual activator of noradrenergic and cholinergic systems of the rat ovary. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 636600.

Berlyne, D. E. (1950). Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *British journal of psychology*, *41*(1), 68.

Berry, K. P., y Nedivi, E. (2017). Spine dynamics: are they all the same? *Neuron,* 96(1), 43-55.

Bevins, R. A., y Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study'recognition memory'. *Nature protocols*, *1*(3), 1306-1311.

Bonilla-Quintana, M., y Wörgötter, F. (2021). Exploring new roles for actin upon LTP induction in dendritic spines. *Scientific Reports*, *11*(1), 7072.

Brady, A. M. (2016). The neonatal ventral hippocampal lesion (NVHL) rodent model of schizophrenia. *Current protocols in neuroscience*, 77(1), 9-55.

Brusco, J., Wittmann, R., de Azevedo, M. S., Lucion, A. B., Franci, C. R., Giovenardi, M., y Rasia-Filho, A. A. (2008). Plasma hormonal profiles and dendritic spine density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats. *Neuroscience letters*, *438*(3), 346-350.

Burden, H.W., y Lawrence, I.E. (1977). The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology*, 23(6): 368-378.

Cajal, S. R. (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Revista Trimestral de Histología Normal y Patológica*, (1), pp 1-10.

Caron MG., Goldstein S., Savard K. y Marsh J., (1975). Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *Journal of Biological Chemistry*, 250(13), 5137-5143.

Castillo, E. (2020). La acetil L-Carnitina induce plasticidad neuronal en el hipocampo de ratas hembras púberes desnervadas sensorialmente, posible rol del hipocampo en la regulación de la reproducción. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Chen, J. R., Yan, Y. T., Wang, T. J., Chen, L. J., Wang, Y. J., y Tseng, G. F. (2009). Gonadal hormones modulate the dendritic spine densities of primary cortical pyramidal neurons in adult female rat. *Cerebral cortex*, *19*(11), 2719-2727.

Cora, M. C., Kooistra, L., y Travlos, G. (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic pathology*, 43(6), 776-793.

Daenen, E. W., Wolterink, G., Gerrits, M. A., y Van Ree, J. M. (2002). The effects of neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus on social behaviour later in life. *Behavioural brain research*, *136*(2), 571-582.

D'Albora, H., Anesetti, G., Lombide, P., Dees, WL, y Ojeda, SR (2002). Neuronas intrínsecas en el ovario de los mamíferos. Investigación y técnica en microscopía, 59 (6), 484-489.

Dedovic, K., Duchesne, A., Andrews, J., Engert, V. y Pruessner, J.C. (2009). The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *Neuroimage*; 47:864-871.

Dohanich, G. (2002). Gonadal steroids, learning, and memory. *Hormones, brain and behavior*, 265-327.

Domínguez R., Chávez R., y Cruz M. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos selectos de biología de la reproducción. Miguel Ángel Porrúa. Pp. 161-192.

Domínguez R., Morales L., y Cruz M. (2003). Ovarian Asymmetry. Annual Review of Biomedical *Sciences*, 5: 95-104.

Downs, J. L., y Wise, P. M. (2009). The role of the brain in female reproductive aging. *Molecular and cellular endocrinology*, 299(1), 32-38.

Ennaceur, A., y Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*, *31*(1), 47-59.

Ethell, I. M., y Pasquale, E. B. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Progress in neurobiology*, *75*(3), 161-205.

Fanselow, M. S., y Dong, H. W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron*, *65*(1), 7-19.

Fernández Romero, T., Suárez Román, G., y Clapés Hernández, S. (2021). Protocolo para la citología vaginal directa de ratas de laboratorio. Revista Habanera de Ciencias Médicas, 20(3).

Flores, G., Barbeau, D., Quirion, R., y Srivastava, L. K. (1996). Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *16*(6), 2020-2026.

Flores, G., Morales-Medina, J. C. y Diaz, A. (2016). Neuronal and brain morphological changes in animal models of schizophrenia. *Behavioural brain research*, 301, 190-203.

Fritz, S., Fohr, K. J., Boddien, S., Berg, U., Brucker, C., y Mayerhofer, A. (1999). Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology y Metabolism*, *84*(5), 1744-1750.

García-Sustegui, W. A., Ochoa-Ramos, A., Handal-Silva, A., y Morán-Perales, J. L. (2017). Parámetros reproductivos básicos en ratas hembras adultas (Rattus norvergicus) de una cepa mutante alopécica hipotímica mantenida en condiciones convencionales de bioterio. Revista Ciencias de la Salud, 4(11), 1-10.

Gartner, L. P., yamp; Hiatt, J. L. (2011). Histología básica (1st ed., pp. 272-280). Elsevier.

Geinisman, Y., Disterhoft, J. F., Gundersen, H. J. G., McEchron, M. D., Persina, I. S., Power, J. M., y West, M. J. (2000). Remodeling of hippocampal synapses after hippocampus-dependent associative learning. *Journal of Comparative Neurology*, *417*(1), 49-59.

Gerendai I., Banczerowski P. y Halasz B. (2005). Funtional significance of the Innervation of the gonads. *Endocrine*. 28(3): 209-318.

Gerendai I., Rotsztejn W., Marchetti B., Kordon C. y Scapagnini U. (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of mediobasal hypothalamus. *Neuroscience letters*, 9(4): 333-336.

Gerendai, I. (1987). Laterality in the neuroendocrine system. In *Duality and Unity of the Brain: Unified Functioning and Specialisation of the Hemispheres* (pp. 17-28). London: Palgrave Macmillan UK.

Gerendai, I., (1984). Lateralization of neuroendocrine control. In: Galaburda, A.M., Geschwind, N. (Eds.), Cerebral Dominance, Biological Foundations (pp.167-176). Harvard University Press, Cambridge, MA.

Gerendai, I., Kocsis, K. y Halász, B. (2002). Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. Microscopy research and technique, 59(6), 474-483.

Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogköi, Z., Medveczky, I. y Halász, B. (2000). CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of the autonomic nervous system*, 80(1-2), 40-45.

Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkői, Z., Medveczky, I. y Halász, B. (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology*, 68(4), 244-256.

Gerendai, I., y Halász, B. (1997). Neuroendocrine asymmetry. *Frontiers in neuroendocrinology*, 18(3), 354-381.

Gibb, R. y Kolb, B. (1998). A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*. 79, 1-4.

Goldman, J. M., Murr, A. S., y Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Research Part B: *Developmental and Reproductive Toxicology,* 80(2). 84-97.

González, F., Cordero, N., Santos, N., López, G., Reyes, R., López, D. y Quiróz U. (2016). Efectos de la hemicastración sobre la fertilidad de la rata macho. Cartel #24. En M. L. (presidencia), XII Reunión anual de la academia de investigación en biología de la reproducción, A. C. Querétaro.

Greiner, M., Paredes, A., Araya, V., y Lara, H. E. (2005). Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine*, *28*, 319-324.

Grover, L. M., y Teyler, T. J. (1990). Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature*, *347*(6292), 477-479.

Hamid, H. Y., y Zakaria, M. Z. A. B. (2013). Reproductive characteristics of the female laboratory rat. *African Journal of Biotechnology*, 12(19), 2510-2514.

Harris, K. M. (2020). Structural LTP: from synaptogenesis to regulated synapse enlargement and clustering. *Current opinion in neurobiology*, *63*, 189-197.

Harris, K. M., Jensen, F. E., y Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published erratum appears in J Neurosci 1992 Aug; 12 (8): following table of contents]. *Journal of Neuroscience*, *12*(7), 2685-2705.

Hayashi, Y., y Majewska, A. K. (2005). Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. *Neuron*, *46*(4), 529-532.

Hernández, J. D. O., Aguilar, E. J., y García, F. G. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. Rev Med UV, 21-28.

Hillier SG. (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular and cellular endocrinology*, 179: 39-46.

Hoffman, B. L., Schorge, J. O., Schaffer, J. I., Halvorson, L. M., Bradshaw, K. D. y Cunningham, F. G. (2009). Endocrinologia de la reproducción. En: Williams ginecología. (2 ed.). México: McGraw-Hill pp. 400-439.

Hojo, Y., Hattori, T. A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H. T. y Harada, N. (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017α and P450 aromatase localized in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(3), 865-870.

Hösli, E. y Hösli, L. (1999). Cellular localization of estrogen receptors on neurones in various regions of cultured rat CNS: coexistence with cholinergic and galanin receptors. *International journal of developmental neuroscience*, 17(4), 317-330.

Hsueh, A. J., Billig, H., y Tsafriri, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine reviews*, *15*(6), 707-724.

Jara, A. A. (2001). Hipogonadismos femeninos primarios. En: Endocrinología. (2 ed.). Madrid, España: *Médica Panamericana* pp. 463-468.

Kanasaki, H., Tselmeg, M., Oride, A., Sukhbaatar, U., Hara, T., y Kyo, S. (2017). Pulsatile kisspeptin effectively stimulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Gynecological Endocrinology,* 33(9), 721-727.

Kang, S. K., Choi, K. C., Yang, H. S., y Leung, P. C. K. (2003). Potential role of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II in the ovary and ovarian cancer. *Endocrine-related cancer*, 10(2), 169-177.

Kessels, H., Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61: 340-350

Klein, S. B. (2015). What memory is. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, *6*(1), 1-38.

Kolb, B., Forgie, M., Gibb, R., Gorny, G., y Rowntree, S. (1998). Age, experience and the changing brain. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, *22*(2), 143-159.

Krsmanović, L. Z., Virmani, M. A., Stojilković, S. S. y Catt, K. J. (1992). Actions of acetyl-L-carnitine on the hypothalamo-pituitary-gonadal system in female rats. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 43(4), 351-358.

Kruijssen, D. L., y Wierenga, C. J. (2019). Single synapse LTP: a matter of context?. *Frontiers in cellular neuroscience*, *13*, 496.

Kunz, L., Thalhammer, A., Berg, F. D., Berg, U., Duffy, D. M., Stouffer, R. L. y Mayerhofer, A. (2002). Ca2+-activated, large conductance K+ channel in the ovary: identification, characterization, and functional involvement in steroidogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *87*(12), 5566-5574.

Kwiecien, G. J. (2015). Fallopian Tube Anastomosis. In Plastic and Reconstructive Surgery (pp. 39-43). *Springer*, London.

Lara, H. E., McDonald, J. K., Ahmed, C. E., y Ojeda, S. R. (1990b). Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology*, *127*(5), 2199-2209.

Lara, H. E., McDonald, J. K., y Ojeda, S. R. (1990a). Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology*, *126*(1), 364-375.

Lavenex, P., Lavenex, P. B., y Amaral, D. G. (2007). Postnatal development of the primate hippocampal formation. *Developmental neuroscience*, 29(1-2), 179-192.

Lawrence, I. E., y Burden, H. W. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*, 196(1), 51-59.

Lee, K. F., Soares, C., y Béïque, J. C. (2012). Examining form and function of dendritic spines. *Neural plasticity*, 2012.

Li, C., Brake, W. G., Romeo, R. D., Dunlop, J. C., Gordon, M., Buzescu, R., y McEwen, B. S. (2004). Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(7), 2185-2190.

Lipska BK., Jaskiw GE. y Weinberger DR. (1993). Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*; 9:67-75.

Lipska, B.K., Jaskiw, G.E., Chrapusta, S., Karoum, F., y Weinberger, D.R. (1992). Ibotenic acid lesion of the ventral hippocampus differentially affects dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*; 585(1-2):1-6.

Lorente de Nó, R. (1934). Studies in the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal of Psychology and Neurology*. 46, 111-117.

Lueptow, L. M. (2017). Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (126), e55718.

Ma, Y., Liu, M., Yang, L., Zhang, L., Guo, H., Hou, W., y Qin, P. (2020). Loss of estrogen efficacy against hippocampus damage in long-term OVX mice is related to the reduction of hippocampus local estrogen production and estrogen receptor degradation. *Molecular Neurobiology*, *57*, 3540-3551.

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology*, 62, 609-614.

Maren, S., Aharonov, G., y Fanselow, M. S. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behavioural brain research*, *88*(2), 261-274.

Martínez P. S., y Dierssen, M. (2014). Desarrollo y plasticidad cerebral. Implicaciones en la discapacidad intelectual. Atención temprana en el ámbito hospitalario. En Piñero Peñalver Jessica, Perez-Lopez Julio, Vargas Torcal Fernando, Candela Sempere Ana Belen, "Atención temprana en el ámbito hospitalario" Editorial Pirámide, Madrid, España pp 60-67

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

Mayerhofer, A., Föhr, K. J., Sterzik, K., y Gratzl, M. (1992). Carbachol increases intracellular free calcium concentrations in human granulosa-lutein cells. *The Journal of Endocrinology*, 153-159.

Mayerhofer, A., y Fritz, S. (2002). Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microscopy Research and Technique*, *59*(6), 503-508.

Mayerhofer, A., y Kunz, L. (2005). A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, *187*(5-6), 521-528.

McEwen, B. (2002). Estrogen actions throughout the brain. Recent progress in hormone research, 57, 357-384.

Mitra, S. W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H. A., Hayashi, S. y Alves, S. E. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain: comparison with estrogen receptor α. Endocrinology, 144(5), 2055-2067.

Moghadami, S., Jajanshahi, M., Sepehri, H., y Amini, H. (2016). Gonadectomy reduces the density of androgen receptor – inmunorreactive neurons in male rat's hippocampus: testosterone replacement compensates it. Behavioral and brain functions. 12(5).

Molina, P.E. (2006). Fisiología endocrina -Serie Lange de Fisiología. p. 213-218. McGrawHill, 2a Ed. México.

Moore, K., Persaud, T., y Torchia, M. (2008). Embriología clínica (9th ed., pp. 23-27). Ámsterdam: Elsevier.

Morales-Ledesma, L., Betanzos-García, R., y Domínguez-Casalá, R. (2004). Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepubertal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Archives of medical research*, *35*(4), 279-283.

Morgado-Bernal, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria. *Cic: cuadernos de información y comunicación*, (10), 221-233.

Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., y Morris, R. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(21), 9697-9701.

Muñoz-Arenas, G., Pulido, G., Treviño, S., Vázquez-Roque, R., Flores, G., Moran, C., y Díaz, A. (2020). Effects of metformin on recognition memory and hippocampal neuroplasticity in rats with metabolic syndrome. *Synapse*, 74(9), e22153.

NOM-062-ZOO-1999, N. O. M., y LA PRODUCCION, E. T. P. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

O'Donnell, P. (2012). Cortical disinhibition in the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia: new vistas on possible therapeutic approaches. Pharmacology & therapeutics, 133(1), 19-25.

O'Donnell, P. (2012). Cortical disinhibition in the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia: new vistas on possible therapeutic approaches. *Pharmacology & therapeutics*, *133*(1), 19-25.

Ojeda, S. y Skinner, M. (2006). Puberty in the Rat. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 2061-2126.

Pacheco, J. (2010). Falla ovárica precoz. Anales de la Facultad de Medicina UNMSM. 71(3), 191-200.

Palermo, R. (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. Reproductive biomedicine online, 15(3), 326-337.

Park, E., Cockrem, J. F., Han, K. H., Kim, D. H., Jung, M. H., y Chu, J. P. (2012). Stress-induced activation of ovarian heat shock protein 90 in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *38*(2), 396-407.

Parnass, Z., Tashiro, A., y Yuste, R. (2000). Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*, 10(5), 561-568.

Pastelín, C. F., Rosas, N. H., Morales-Ledesma, L., Linares, R., Domínguez, R., y Morán, C. (2017). Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. Journal of ovarian research, 10(1), 18.

Paxinos, G., y Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier.

Pichardo, E. H., Reyes, F. F., y Suárez, S. C. (1999). Fundamentos teórico práctico de la citología exfoliativa en medicina veterinaria, manual. Universidad Autónoma Metropolitana.

Plant, T. M., Zeleznik, A. J., yamp; Albertini, D. F. (2014). The Mammalian Oocyte. In Knobil and Neill's physiology of reproduction. (4th ed., pp. 59–61). essay, Academic Press.

Prange-Kiel, J. y Rune, G. M. (2006). Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. Neuroscience, 138(3), 765-772.

Prevot, V. (2015). Puberty in mice and rats. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. New York: Elsevier, 1395-1439.

Reyes-Mendoza, J. y Morales, T. (2016). Post-treatment with prolactin protects hippocampal CA1 neurons of the ovariectomized female rat against kainic acid-induced neurodegeneration. Neuroscience, 328, 58-68.

Riquelme, R., Ruz, F., Mayerhofer, A., y Lara, H. E. (2019). Role of ovarian sympathetic nerves and cholinergic local system during cold stress. *Journal of Endocrinology*, *242*(2), 115-124.

Riss, W., Burstein, S. D., y Johnson, R. W. (1963). Hippocampal or pyriform lobe damage in infancy and endocrine development of rats. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *204*(5), 861-866.

Rochefort, N. L., y Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO reports*, *13*(8), 699-708.

Romero, V. M. A. (2001). Texto de neurociencias cognitivas. *UNAM*, pp. 44-47.

Sala, C., y Segal, M. (2014). Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiological reviews*, *94*(1), 141-188.

Sánchez, M. (2009). Efectos de los cuidados maternos sobre la actividad motora y la morfología dendrítica de las neuronas piramidales del hipocampo dorsal y las espinas medianas del núcleo accumbens. México: Tesis para obtener el título de Maestría en Ciencias Biológicas.

Santos, N. (2017). Efectos de una orquidectomía unilateral sobre la morfología dendrítica de neuronas piramidales del hipocampo de la rata adulta. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Selvamani, A., y Sohrabji, F. (2010). Reproductive age modulates the impact of focal ischemia on the forebrain as well as the effects of estrogen treatment in female rats. *Neurobiology of aging*, *31*(9), 1618-1628.

Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. Journal of anatomy, 874), 387- 406.

Shughrue, P. J. y Merchenthaler, I. (2000). Estrogen is more than just a "sex hormone": novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. Frontiers in neuroendocrinology, 21(1), 95-101.

Silva-Gómez, A. B., Bermudez, M., Quirion, R., Srivastava, L. K., Picazo, O., y Flores, G. (2003). Comparative behavioral changes between male and female postpubertal rats following neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. Brain research, 973(2), 285-292.

Song, Y. H. (2013). A memory molecule, Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II and redox stress; key factors for arrhythmias in a diseased heart. Korean Circulation Journal, 43(3), 145-151.

Spencer, J. L., Waters, E. M., Romeo, R. D., Wood, G. E., Milner, T. A., y McEwen, B. S. (2008). Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. Frontiers in neuroendocrinology, 29(2), 219-237.

Steckler, T., Drinkenburg, W. H. I. M., Sahgal, A., y Aggleton, J. P. (1998). Recognition memory in rats—I. Concepts and classification. *Progress in Neurobiology*, *54*(3), 289-311.

Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., y Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. Nature Reviews Neuroscience, 15(10), 655-669.

Swanson, L. W., y Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *journal of Comparative Neurology*, *172*(1), 49-84.

Tapia, C. R. J., y Anaya, M. M. (2016). El reloj circadiano ovárico: un segundero en la fisiología de la reproducción. Entreciencias: Diálogos en la sociedad del conocimiento, 4(10), 147-163.

Taradach, C. (1982). Monitoring of the oestrus cycle in the rat by measurement of vaginal impedance. In *New Toxicology for Old: A Critique of Accepted Requirements and Methodology* (pp. 184-186). Springer Berlin Heidelberg.

Tendilla-Beltran, H. Antonio Vazquez-Roque R, Judith Vázquez-Hernández A, Garcés-Ramírez L, Flores, G. (2019) Exploring the dendritic spine pathology in a schizophrenia-related neurodevelopmental animal model. *Neuroscience*, 396(36-45).

Tóth, I. E., Wiesel, O., BoldogkőI, Z., Bálint, K., Tapaszti, Z., y Gerendai, I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. Microscopy research and technique, 70(8), 710-718.

Tseng, K. Y., Chambers, R. A., y Lipska, B. K. (2009). The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. Behavioural brain research, 204(2), 295-305.

Ultanir, S. K., Kim, J. E., Hall, B. J., Deerinck, T., Ellisman, M., y Ghosh, A. (2007). Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(49), 19553-19558.

Urbanski, H. F., and Ojeda, S. R. (1985). In vitro simulation of prepubertal changes in pulsatile luteinizing hormone release enhances progesterone and 17β-estradiol secretion from immature ovaries. Endocrinology 117, 638-643.

Urbanski, H. F., y Ojeda, S. R. (1986). Development of afternoon minisurges of luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats is ovary dependent. Endocrinology 118, 1187–1193.

Urroz, C. (1991). Elementos de anatomía y fisiología animal (1st ed., pp. 200–204). UNED.

Valencia Segura, R. K., Colín Barenque, L., y Fortoul van der Goes, T. I. (2018). Las espinas dendríticas, su función y algunas alteraciones. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 61(1), 46–55.

Vidal, B., Vázquez-Roque, R. A., Gnecco, D., Enríquez, R. G., Floran, B., Díaz, A., y Flores, G. (2017). Curcuma treatment prevents cognitive deficit and alteration of neuronal morphology in the limbic system of aging rats. *Synapse*, *71*(3), e21952.

Woolley, C. S. (2007). Acute effects of estrogen on neuronal physiology. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 47, 657–680.

Woolley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M. y McEwen, B. S. (1990) Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. J Neurosci 10:4035–4039.

Woolley, C. S., Weiland, N. G., McEwen, B. S. y Schwartzkroin, P. A. (1997). Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. Journal of Neuroscience, 17(5), 1848–1859.

Woolley, C. S., y McEwen, B. S. (1992). Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. Journal of Neuroscience, 12(7), 2549–2554.

Woolley, C. S., y McEwen, B. S. (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. Journal of Comparative Neurology, 336(2), 293–306.

Yildirim, M., Mapp, O. M., Janssen, W. G., Yin, W., Morrison, J. H., y Gore, A. C. (2008). Postpubertal decrease in hippocampal dendritic spines of female rats. *Experimental neurology*, *210*(2), 339–348.

Yoshikawa, T., Sellix, M., Pezuk, P., y Menaker, M. (2009). Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology*, 150(9), 4338–4347.

Yuste, R. (2010). Dendritic Spines. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 19–23.

Zafer, D., Aycan, N., Ozaydin, B., Kemanli, P., Ferrazzano, P., Levine, J. E., y Cengiz, P. (2019). Sex differences in hippocampal memory and learning following neonatal brain injury: is there a role for estrogen receptor-α?. *Neuroendocrinology*, *109*(3), 249–256.

Zangeneh, F. Z., Abdollahi, A., Tavassoli, P., y Naghizadeh, M. M. (2011). The effect of cold stress on polycystic ovary syndrome in rat: before and during modeling. *Archives of gynecology and obstetrics*, *284*, 651-657.

Zurkovsky, L., Brown, S. L., y Korol, D. L. (2006). Estrogen modulates place learning through estrogen receptors in the hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*, *86*(3), 336-343.

Mo, L., Yang, Z., Zhang, A., & Li, X. (2010). The repair of the injured adult rat hippocampus with NT-3-chitosan carriers. *Biomaterials*, *31*(8), 2184-2192.

12. ANEXOS

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Depto. Bioquímica y Biología Molecular
Laboratorio de Neurobioquímica.
Centre for Neurobiochemical Studies in Endocrine Diseases

SANTIAGO, Julio 03, 2023

Dr.
Salvador Galicia Isasmendi
Director Facultad de Ciencias Biológicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Estimado Dr. Galicia,

Por medio de la presente hago constar que C. Estrella del Mar Castillo López, alumna de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ha concluido satisfactoriamente con la realización de la estancia en el laboratorio de Neurobioquímica, cumpliendo con lo acordado sugerido en carta previa, para la continuación de su investigación, durante el período 15 de mayo al 30 de junio 2023. Quiero informar además que Estrella del Mar cumplió cada una de las actividades enmendadas con especial dedicación y esmero, logrando reproducir todas las actividades a las que fue entrenada. Si hay que calificar esta actividad, no tengo dudas en sugerir la nota máxima una vez que analice el informe escrito de su actividad.

Saluda muy Atte.,

Prof. Dr. Hernan Lara

Sergio Livingstone 1007 -8380492 Independencia- Santiago *FONO:+562-29782882 e-mail: hlara@ciq.uchile.cl*

"Este Documento es una fiel copia de un documento electrónico"
"Para convalidar la información de este documento, favor ingresar al sitio https://gc.ucc.edu.co:16201/vco/, ingresar el radicado

UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA
Radicado: NEI-02-2023-110542
Fecha : 15/12/23 9:32
Sede: Neiva

La Universidad Cooperativa de Colombia
certifica que

ESTRELLA CASTILLO LÓPEZ

P.S. N07.612.924

Cumplió a cabalidad los requisitos exigidos por la normatividad de la Universidad,
por lo cual se le expide el presente certificado:

VI CONGRESO INTERNACIONAL DE NEUROCIENCIAS Y NEUROPSICOLOGÍA "HACIA LA CONSTRUCCIÓN DE LA POLÍTICA PÚBLICA EN SALUD CEREBRAL"

Llevado a cabo en la ciudad de **Neiva**, del **01** de **Noviembre** del año **2023** al **03** de **Noviembre** del año **2023**, con una duración de **24** horas.

Anotado en el folio N° **153** del libro de registro y diplomas N° **2** refrendado en **Neiva** a los **23** días del mes de **2023** del año **2023**.

En testimonio de ello se firma en **Neiva** a los **23** días del mes de **Noviembre** de **2023**.

Olga Patricia Sanchez Rubio
DIRECTOR(A) CAMPUS

El presente documento no tiene validez sin la firma o si presenta borrón o enmendadura. La información contenida en este certificado es extraída directamente del sistema de información académica.

Proyectó: Judith Bermeo Alvarez
Revisó: Martha Estella Cadena Manjarres
Olga.sanchez@ucc.edu.co
Vigilada Mineducación

LA COORDINACIÓN DE INTERNACIONALIZACIÓN Y EL PROGRAMA DE PSICOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA CAMPUS NEIVA

Hace constar que:

El trabajo de investigación titulado "¿El hipocampo dorsal de la rata, modula no sólo procesos de memoria sino también reproductivos?" fue presentado en modalidad poster en el **VI CONGRESO INTERNACIONAL DE NEUROCIENCIAS Y NEUROPSICOLOGÍA: HACIA LA CONSTRUCCIÓN DE LA POLÍTICA PÚBLICA EN SALUD CEREBRAL.**

Autores

Yarey Maldonado Calixto, Estrella del Mar Castillo López, Andrea Coba de Ita, Daniel Vázquez Piñan, Lorena Milflores Flores, Rosalina Flores Álvarez, Ubaldo Quiroz López

Realizado en Neiva los días 1,2 y 3 del mes de Noviembre de 2023

EXAMARY VILLAREAL RUIZ
Coordinadora Programa Psicología

ERICA LAGUNA ROJAS
Coordinadora de Internacionalización y Egresados

V Meeting of DOHaD Latin American Regional Society
XXXIV Annual Meeting of the Chilean Society of Reproduction and Development

THE ORGANIZING COMMITTEE OF THE MEETING

CERTIFICATES THE ORAL/POSTER PRESENTATION

Estrella Del Mar Castillo López *et al.*

"Hippocampal lesions not only affect memory and learning but also reproductive functions"

Dra. Dolores Busso, SChRD

Dr. Bernardo Krause, LA-DOHaD

Valdivia, Chile, September, 2023

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Facultad de Ciencias Biológicas

otorga la presente

CONSTANCIA

A: **Biol. Estrella del Mar Castillo López**

Por impartir el Curso Práctico Verano 2022:

"Prácticas de Biología Molecular"

Actividad realizada del 13 al 24 de junio de 2022

con un total de 25 horas prácticas de valor curricular y No de registro 07FCBDIR

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 10 de agosto de 2022

Dr. Salvador Galicia Isasmendi

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

No de registro 07FCBDIR

BUAP

Facultad de Ciencias Biológicas
BUAP

BIO TECNOLOGÍA

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Facultad de Ciencias Biológicas

otorga la presente

CONSTANCIA

A: **Estrella de Mar Castillo López**

Por impartir el Curso Práctico Verano 2022:

"Técnicas básicas de microscopía aplicadas a la biología de la reproducción"

Actividad realizada del 20 al 24 de junio de 2022

con un total de 08 horas prácticas de valor curricular y No de registro 22FCBDIR

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 10 de agosto de 2022

Dr. Salvador Galicia Isasmendi

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

No de registro 22FCBDIR

BUAP

Registro:
DGEC – BUAP – Fac. Cs. Biol. – P / CT – 053 /22
Folio: 13, Foja 373
Del libro de Registros 01/22

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Facultad de Ciencias Biológicas
otorga la presente

CONSTANCIA

A: **Biol. Estrella del Mar Castillo López**

Por haber impartido el Curso - Taller
Curso Básico de Histología Animal
Realizado del 27 de junio al 08 de julio de 2022
Con una duración de 40 horas

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 18 de agosto de 2022

Dr. Carlos Contreras Cruz
Director General de Educación Continua

BUAP

Registro:
DGEC - BUAP - Fac. Cs. Biol. - P / CT - 019 / 23
Folio: 20, Foja 445
Del libro de Registros 01/23

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Facultad de Ciencias Biológicas

otorga la presente

CONSTANCIA

A: **Biol. Estrella del Mar Castillo López**

Por haber impartido 10 horas del Curso - Taller

Básico de Histología Animal

Realizado del 23 de marzo al 04 de mayo de 2023

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 28 de junio de 2023

Dr. Carlos Contreras Cruz
Director General de Educación Continua

Todos tenemos batallas que librar. Y a menudo es en esas batallas donde estamos más vivos: es en el frente de batalla de nuestras vidas donde ganamos sabiduría, creamos alegría, forjamos amistades, descubrimos la felicidad, encontramos el amor y hacemos un trabajo con propósito. – *Eric Greitens*