



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

---

---

Facultad de Ciencias Biológicas

**“Morfología dendrítica de neuronas de la corteza motora primaria de  
ratas hembra Long Evans a lo largo del ciclo estral”**

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciatura en:

**Biología**

PRESENTA:

**Susana Castillo Fernández**

DIRECTOR DE TESIS:

**Dra. Adriana Berenice Silva Gómez**



Diciembre 2018

*A mi familia*

## **Agradecimientos**

Primeramente agradezco a mi institución la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de ser partícipe de sus aspiraciones con la sociedad, a través del lema "*Pensar Bien, Para Vivir Mejor*", así como a todos los docentes a cargo de la organización y mantenimiento de la misma, desde el rector Alfonso Esparza Ortiz como docentes y personal administrativo, dignos de emulación y admiración por su consagración a su oficio.

Al bioterio Claude Bernard y todo su personal, por su dedicación y paciencia a su trabajo, asesoría y atenciones conmigo a lo largo del proyecto, les agradezco profundamente.

A mi tutora la Dra. Adriana Berenice Silva Gómez por su paciencia, entrega y perspicacia en asesorarme durante todo este proceso, sus enseñanzas superaron todo lo que me llevó años comprender, mi aprecio y cariño por usted es incuestionable, le debo mucho y le estoy muy agradecida doctora, en especial por jamás dudar de mi o mi capacidad; además, por acrecentar mi entusiasmo e interés en la neurobiología, la quiero mucho y le deseo luz, felicidad y fuerza de todo corazón para usted y su familia.

A Adriana Bravo por su temple y tutela conmigo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis notables profesores Montserrat Vázquez Balbuena y Ernesto Mangas Ramírez, cuya constante autoexigencia y dedicación por sus alumnos fue sumamente trascendente para mí, les estoy muy agradecida por su increíble pasión por su profesión, deseándoles que jamás se permitan amainar ante críticas destructivas ni resultados desalentadores, su perseverancia motiva; y siempre, en la oscuridad habrá alguien para quien serán luz, como lo fue su guía para mí.

De igual forma agradezco también a mis muy apreciados profesores Guadalupe Díaz Carranza, Pedro Serrano Sánchez, Rosalina Reyes Luna, Salvador Galicia Isasmendi, José Fermín Gómez Reyes, César Sandoval Ruiz, Guillermo Tello Romo, Dalia Molina Romero, Rocío Pérez y Terrón y Ubaldo Quiroz López, cuyas enseñanzas a lo largo de la carrera nunca dejaron de ser un estímulo para mí.

Agradezco a mi familia por ser el sostén y el principio de mis aspiraciones cuyo reflejo de una de ellas esta materializado en la presente.

Agradezco a mis padres Gilberto Castillo y Blanca Fernández cuya armonía de idiosincrasias tan opuestas forjaron mi individualidad; por su devoción al mostrarme con el

ejemplo el continuar por el camino que dictan nuestros principios, los mismos que me permiten la esperanza en la ideología de un mundo mejor.

A mis hermanos y hermanas por su ejemplo a través de su impetuosa resiliencia a lo largo de sus vidas.

A Gilberto por mostrarme que la disciplina en pequeñas cosas forma parte del principio para un objetivo mayor y ser el precursor de nuestras metas como hermanos, quizás no estés consiente, pero eres el movimiento inicial necesario para nosotros.

A Francisco por ser una fuente de inspiración tanto como mi arquetipo personal como en valor en su búsqueda inagotable de nuevos mundos y sueños.

A mi Faty con quien las palabras no me bastan para agradecerle su inagotable (y solo algunas veces exasperante) perseverancia, altruismo, nobleza y humanitarismo, quien no solamente me obliga a verle como un modelo a seguir sino que además, me inunda de una fe y fortaleza tan características de ser promovidas solo por ella para sobreponerme a cualquier adversidad; también le agradezco el mostrarme el valor de la autoexigencia y el brindarme la oportunidad de conocerme y realizarme a través del ejemplo para otros como mi Gil.

A Ingrid por su tan inconsistente *playlist* que me mantuvo despierta en la redacción de mi tesis (broma), te agradezco por tu apoyo a través de comentarios que me exhortan a valorar el acierto de la inocencia de tu edad.

A mi tío David por jamás dudar de mí y motivarme en cada momento, apoyándome sin miramientos en todo, así como por el increíble amor que me profesa con Leonor López y su familia: Fernanda y Dalia Morales.

A Rafael Vallejo quien me mostró el creer en mi misma y confiar sin miramientos en todo aquello que puedo cambiar y aceptar lo que no, agradezco mucho el haberte conocido y que formes parte de esta etapa, con cada día lleno de experiencias completamente nuevas, llevándome a conocer aspectos de mí que desconocía y disfruto, aún con tu muy peculiar y agobiante sentido del humor.

A mi hermano Diego Argüelles quien me impulsa a mantener mi esperanza por la bondad de las personas y es ejemplo de la dedicación.

A mis amigos Imelda Gorgonio, Omar Mendoza, Marco Castro, Leonardo Aguilar, Luis Ibargüen, Eduardo Palacios, Alfredo Rebollar y Karen Gutiérrez quienes cumplen con la analogía de un tesoro, que con sus personalidades tan diversas han trascendido en mí y me han enseñado el atesorar de cada detalle y etapa de mi vida.

## Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>9</b>
1.1 Corteza motora primaria.....	9
1.2 Organización neuronal en la corteza motora primaria.....	11
1.3 Vías motoras .....	14
1.4 Vía piramidal o corticoespinal.....	14
1.5 Endocrinología reproductiva.....	17
1.6 Ciclo estral.....	19
1.7 Conexiones gónadas y corteza motora primaria .....	21
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Justificación .....</b>	<b>25</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>25</b>
<b>5. Objetivo general .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>6. Materiales y Métodos.....</b>	<b>27</b>
6.1 Sujetos .....	28
6.2 Actividad locomotora (Lote 1).....	29
6.3 Obtención de la muestra vaginal .....	30
6.4 Tinción Hematoxilina- Eosina .....	30

6.5	Anestesia y obtención de tejidos (Lote 2).....	31
6.6	Tinción Golgi-Cox.....	31
6.7	Análisis morfológico.....	32
6.8	Análisis de Sholl.....	33
6.9	Análisis estadístico.....	34
6.9.1	Actividad locomotora en campo abierto.....	34
6.9.2	Morfometría neuronal.....	34
<b>7.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>36</b>
7.1	Citología vaginal.....	36
7.2	Actividad locomotora.....	37
7.3	Morfología neuronal.....	39
7.4	Arborización dendrítica total.....	42
7.5	Longitud dendrítica por orden de ramificación.....	44
7.6	Longitud dendrítica total.....	46
7.7	Densidad de espinas dendríticas.....	48
<b>8.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>50</b>
8.1	Actividad locomotora.....	50
8.2	Morfología dendrítica y el ciclo estral.....	51
<b>9.</b>	<b>Conclusión.....</b>	<b>53</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>54</b>

## Resumen

El ciclo reproductivo de las ratas hembra conocido como ciclo estral se caracteriza por presentar 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro; estas etapas presentan diferentes niveles de hormonas que provocan cambios emocionales y conductuales. Además de las hormonas, los estímulos ambientales y las experiencias como el aprendizaje motor, sensorial y cognitivo, tienen un impacto en la morfología de las neuronas piramidales de hipocampo y de cortezas sensoriales, efecto que se refleja con cambios en la densidad de espinas dendríticas principalmente. Sin embargo, regiones diferentes a esas y que se encuentran relacionadas con el control motor han sido poco estudiadas, por lo que en el presente trabajo se analizó la morfología de neuronas de corteza motora primaria a lo largo del ciclo estral. Se utilizaron ratas hembra de la cepa Long Evans adultas con un peso de 210-300 gramos asignadas a un grupo experimental ( $n=8$ ) de acuerdo con la etapa del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) en la que se encontraban durante la prueba de actividad locomotora en campo abierto, y un grupo de ratas no sometidas al monitoreo del ciclo estral (grupo intacto) para la conformación de un primer lote con 5 grupos experimentales. Además, en un segundo lote de los mismos 5 grupos experimentales, se analizó la morfología neuronal de corteza motora primaria por medio de tinción Golgi-Cox y análisis de Sholl. Nuestros resultados muestran que al evaluar la actividad locomotora no se observaron diferencias en la distancia recorrida por las ratas en relación con las etapas del ciclo estral. Así mismo no se encontraron diferencias significativas con respecto de la longitud dendrítica de las neuronas, en ninguno de los arboles dendríticos al comparar entre ninguna etapas del ciclo estral ni respecto del grupo intacto; sin embargo los resultados del análisis de densidad de espinas dendríticas, muestran que los árboles apicales de las neuronas de ratas que se encontraban en la etapa de metaestro fue mayor en comparación al grupo intacto ( $p=0.0428$ ). Estos resultados, sugieren la necesidad de realizar más estudios para determinar si existe una influencia real del factor hormonal en la remodelación dendrítica y de otros factores, tales como los relacionados con la manipulación durante la toma de muestras vaginales para la determinación de la etapa del ciclo estral, las condiciones de crianza en el bioterio o factores ambientales, están relacionados con los cambios en la densidad de espinas dendríticas observados en la etapa de metaestro.



## **1. Introducción**

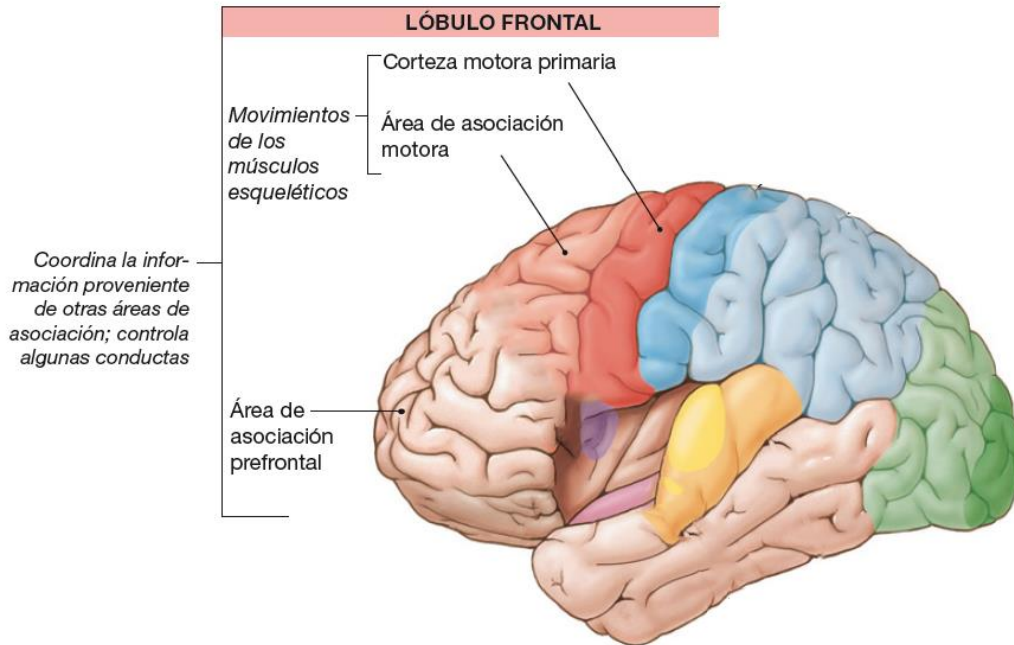
El control motor es posible debido a la interacción de subsistemas tales como los ganglios basales, el cerebelo, los circuitos de la médula espinal y los sistemas descendentes que incluyen a las neuronas motoras superiores a cargo de la corteza motora y los núcleos del tronco del encéfalo (Purves *et al.*, 2007).

### **1.1 Corteza motora primaria**

La corteza motora, responsable de la planificación, iniciación y dirección de los movimientos voluntarios, incluye específicamente a la corteza motora primaria, a la corteza motora lateral, a la corteza motora suplementaria y a la corteza premotora. La corteza motora se encuentra principalmente integrada por el área motora primaria y las áreas motoras secundarias o programadoras, que se encuentran conectadas entre sí por medio de fibras de asociación y que reciben aferencias de los núcleos basales y del cerebelo por medio del tálamo (García-Porrero *et al.*, 2015; Purves *et al.*, 2007).

Las áreas corticales se identifican por su susceptibilidad a la estimulación eléctrica, cuya respuesta con respecto a la intensidad y amplitud a esta estimulación puede provocar movimientos dependientes de las mismas. En específico, el área motora primaria, es activada a una baja intensidad de estimulación, sin embargo esta es de vital importancia para la planeación, activación y ejecución muscular contralateral del cuerpo. En contraste, las áreas motoras secundarias o programadoras son capaces de activarse por estimulación eléctricas más intensas, enfocadas principalmente para la planificación de un movimiento específico considerando la fuerza, el orden, la dirección y la distancia, entre otros elementos (García-Porrero *et al.*, 2015).

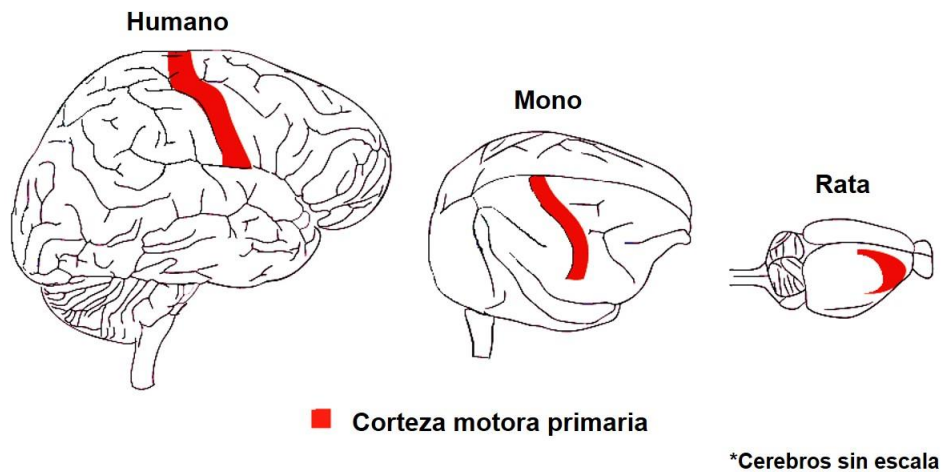
La corteza motora primaria se encuentra ubicada en el área 4 de Brodmann, anterior al surco central y ocupa los dos tercios posteriores del giro frontal ascendente (Figura 1); a su vez, es la responsable de la movilidad contralateral del cuerpo, es decir que se ocupa de la estimulación de zonas que provocan una contracción de músculos del lado opuesto al hemisferio que se estimule (Puelles *et al.*, 2008; García-Porrero *et al.*, 2015; Trans Cranial Technologies LTD, 2012).



**Figura 1.** Áreas funcionales de la corteza cerebral en humano relacionadas con el control del movimiento (Imagen tomada y modificada de Silverthorn, 2008)

La corteza motora primaria participa principalmente en funciones motoras del cuerpo, aunque también se ve involucrada en funciones somatosensoriales, en codificaciones verbales de procesos no semánticos, toma de decisiones acción-atención, memoria motora y puntos de referencia en la visión; de acuerdo a esto la corteza motora primaria se encuentra conectada recíprocamente con otras regiones de la corteza cerebral así como de la médula espinal o de los núcleos motores del tronco del encéfalo (Picard & Strick, 1996; Trans Cranial Technologies LTD., 2012).

La corteza motora primaria posee una organización cortical similar en los mamíferos (Figura 2); específicamente en ratas, el desarrollo de la misma desde el nacimiento es conforme al patrón de las conexiones corticales ya programadas (Whitlock, 2017; Serradj *et al.*, 2017).



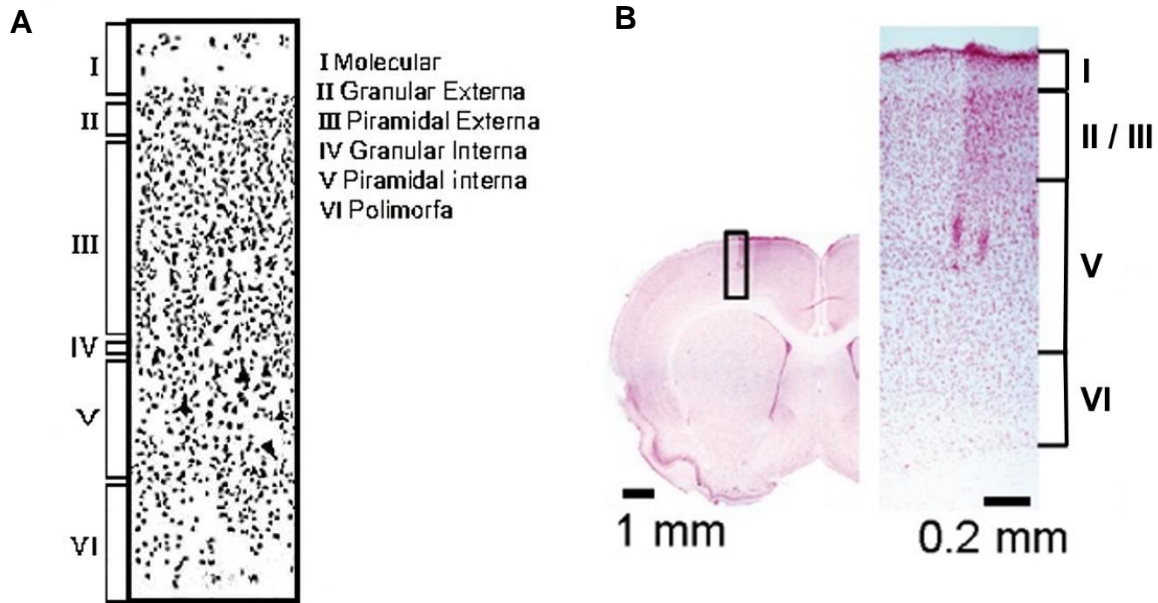
**Figura 2.** Mapa cortical de la corteza parietal de diferentes especies vista lateral, corteza motora primaria resaltada (Imagen tomada y modificada de Whitlock, 2017).

## 1.2 Organización neuronal en la corteza motora primaria

La corteza motora primaria como se mencionó anteriormente se encarga de la asociación de información y de la codificación del movimiento tanto de forma independiente como de su interacción con el aprendizaje motor, lo que es posible a partir de la tasa de disparo y de la diferencia de dependencia de un estímulo de neuronas propias de dicha corteza (Martín-Vázquez *et al.*, 2018).

El prototipo de la isocorteza heterotípica de la corteza motora primaria es agranular, cuya citoarquitectura dividida en láminas corticales forma las siguientes capas (Figura 3): La capa I molecular, conformada por interneuronas y en su mayoría por axones y dendritas de neuronas de otras capas, la capa II granular externa y IV granular interna, se encuentran poco desarrolladas y son prácticamente inexistentes a pesar que estas capas reciben conexiones talámicas desde el núcleo ventral lateral; la capa III piramidal externa, cuya composición es principalmente de células piramidales típicas que van aumentando de tamaño y cuyos axones se proyectan hacia áreas corticales de fibras de asociación y proyección; la capa V piramidal interna, cuyas neuronas son principalmente células gigantes o de Betz cuyas proyecciones se dirigen hacia áreas subcorticales como el tallo cerebral, la médula espinal y el núcleo estriado, y cuyos gruesos axones contribuyen a formar aproximadamente el 5% de la vía piramidal que descarga ráfagas

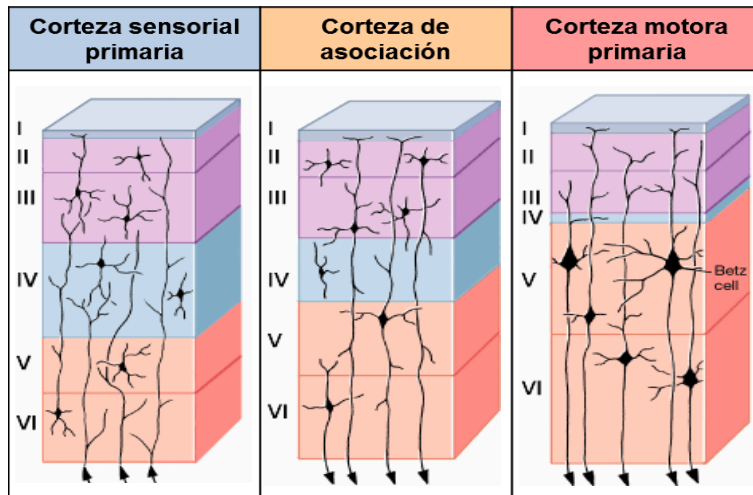
de potenciales de acción que coinciden con los movimientos, en especial los de tipo flexor. Por último, la capa VI formada son neuronas que proyectan al tálamo (Shepherd, 2003; Braak & Braak, 1976; Puelles *et al.*, 2008; García-Porrero *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Organización laminar de la corteza motora primaria en humano (A) y rata (B), se distingue el mínimo tamaño de las capas II y IV y el aumento de la capa V y VI (Imágenes tomadas y modificadas de Garey, 2006; Saiki *et al.*, 2014).

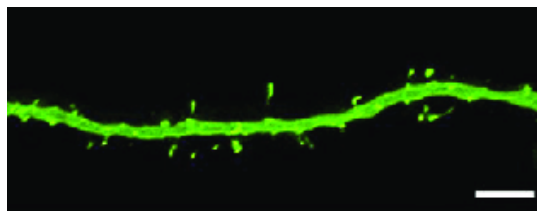
Las neuronas de Betz de la capa V de la corteza motora primaria son células piramidales que poseen un soma en forma triangular con un diámetro que va desde 10  $\mu\text{m}$  hasta más de 50  $\mu\text{m}$  y que además presentan un axón principal que surge de dicho soma y cuenta con dendritas basales y apicales esparcidas que se proyectan del soma.

La corteza motora primaria es la única corteza que contiene estas células que son más grandes que el promedio de las células piramidales ya que pueden llegar a medir hasta 100  $\mu\text{m}$  de largo (Figura 4; Antúnez, 1979); estas neuronas específicamente, fungen como las neuronas motoras superiores de la corteza motora primara en el tracto corticoespinal lo que les otorga una mayor relevancia para la planeación y ejecución del movimiento, además de que estas neuronas se han visto ampliamente relacionadas en patologías neurodegenerativas con atrofas musculares como la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson (Purves *et al.*, 2007; Rivara, *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Citoarquitectura de corteza motora primaria en contraste con otras cortezas, se distingue principalmente la composición de la corteza motora primaria por neuronas gigantes de Betz (Imagen tomada y modificada de Ramón *et al.*, s.f.).

Estas neuronas suelen estar recubiertas por pequeñas prominencias llamadas espinas dendríticas (Figura 5) las cuales aumentan la superficie de contacto sináptico; estas se encuentran conformadas por un engrosamiento esférico que va de 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro que se une por un pedículo a la dendrita, además posee una “cabeza” que es la encargada de recibir las terminaciones axonales para que se establezcan los contactos sinápticos. Se ha encontrado que en roedores las dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales de las capas III, IV y V de corteza representan las principales células diana para la comunicación con fibras tálamo-corticales, las cuales son consideradas como capaces de procesar y analizar diferentes aferencias corticales, en específico para contactos sinápticos excitatorios (Valverde, 2002).



**Figura 5.** Espinas dendríticas basales de neuronas piramidales de capa V de la corteza motora primaria de ratona teñidas con amarillo Luciferasa, la barra de escala es de 5  $\mu\text{m}$  (Imagen tomada de Ueno *et al.*, 2017).

### 1.3 Vías motoras

Las principales vías del movimiento voluntario se dividen por el nivel de las estructuras involucradas y el tipo de movimiento:

**Vía piramidal:** A cargo de la corteza y responsable de movimientos voluntarios.

**Vía extrapiramidal:** Relacionada con el cerebelo, núcleos basales y tronco del encéfalo responsable de movimientos automáticos y asociados con la postura y el tono muscular.

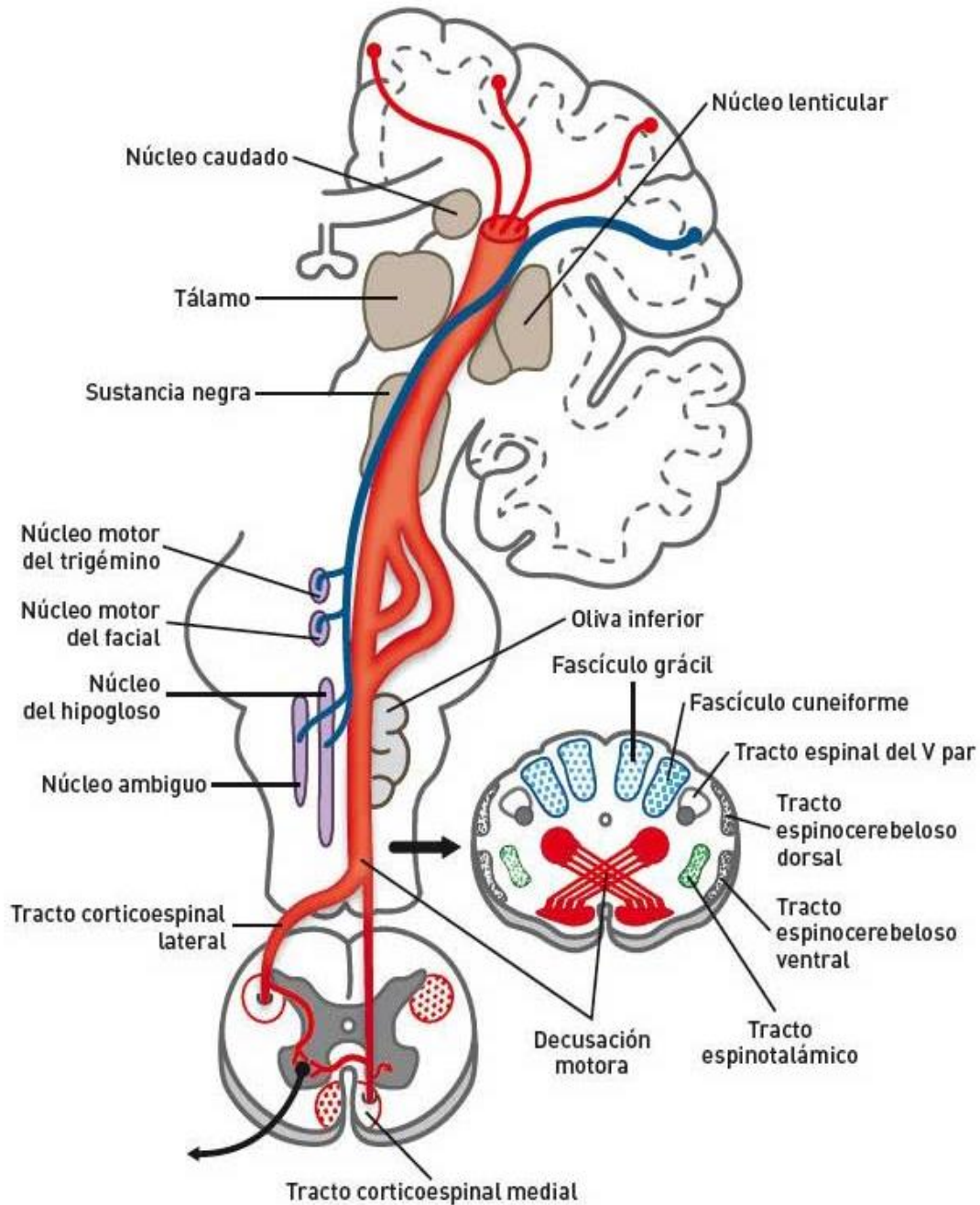
Cabe recalcar como se mencionó anteriormente, que estas vías en su mayoría tienen su origen en la corteza motora primaria (García-Porrero *et al.*, 2015; Cuadrado *et al.*, 2001).

### 1.4 Vía piramidal o corticoespinal

Esta vía está conformada por el tracto corticoespinal y el tracto corticonuclear o corticobulbar que contactan con la medula espinal. El primero relacionado con la musculatura del tronco y de las extremidades; el segundo relacionado con la musculatura mímica, músculos masticadores, lingual y faringe, respectivamente (García-Porrero *et al.*, 2015, Afifi *et al.*, 2006).

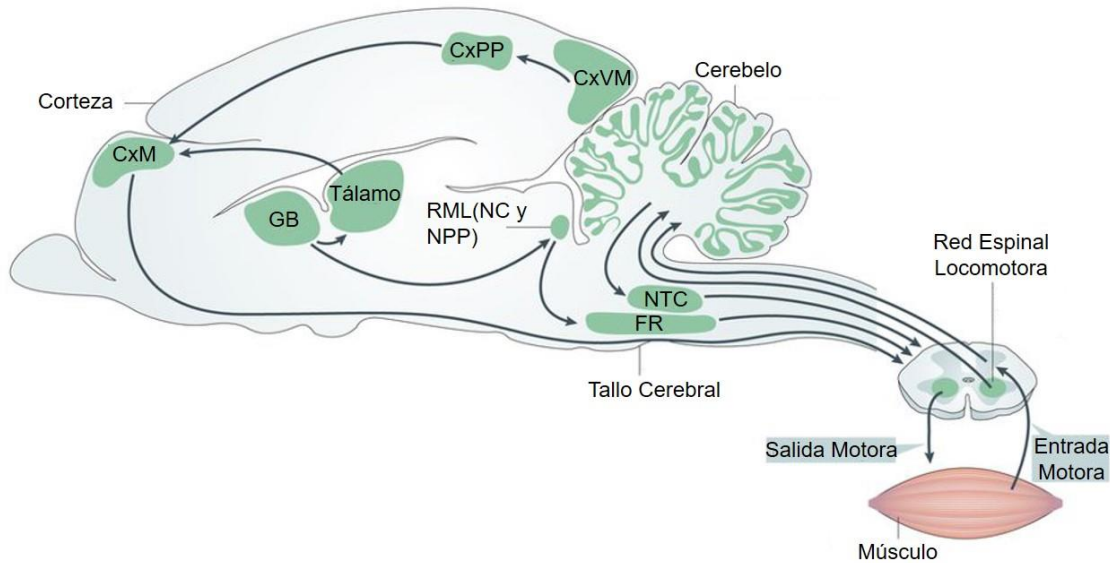
Esta vía inicia a partir de las neuronas de Betz en la capa V de la corteza motora primaria, en el área premotora, en la corteza motora suplementaria y en la corteza somatoestésica. Las fibras nerviosas descienden en la cápsula interna para reunirse en la superficie ventral del mesencéfalo, en el interior de la parte media del pedúnculo cerebral del tronco cerebeloso donde en la base del puente de Varolio se fragmentarán para continuar en varios fascículos por el bulbo raquídeo, donde nuevamente se reagruparán formando una pirámide y descenderán por una parte para la formación del tracto corticoespinal lateral con aproximadamente un 80% de las fibras que cruzan la línea media descendiendo a los niveles inferiores de la médula espinal. Los axones colaterales que llegan hasta la sustancia gris medular harán sinapsis, por medio de interneuronas, en motoneuronas alfa y gamma de la parte lateral del asta anterior de la médula espinal pertenecientes a músculos distales de las extremidades. Por otra parte, la formación del tracto corticoespinal ventral, que contiene el 20% restante de las fibras,

se caracteriza por cruzar y descender hasta la medula espinal a través de la comisura blanca anterior, penetrará a la sustancia gris contralateral para hacer sinapsis de manera directa en motoneuronas alfa y gamma de la parte medial del asta anterior para inervar la musculatura axial del tronco y músculos proximales de las extremidades (Figura 6; Afifi *et al.*, 2006, García-Porrero *et al.*, 2015; Purves *et al.*, 2007, Puelles *et al.*, 2008).



**Figura 6.** Vía piramidal, visión en sección transversal del bulbo raquídeo en la decusación motora, tracto corticoespinal (Imagen tomada de García-Porrero *et al.*, 2015).

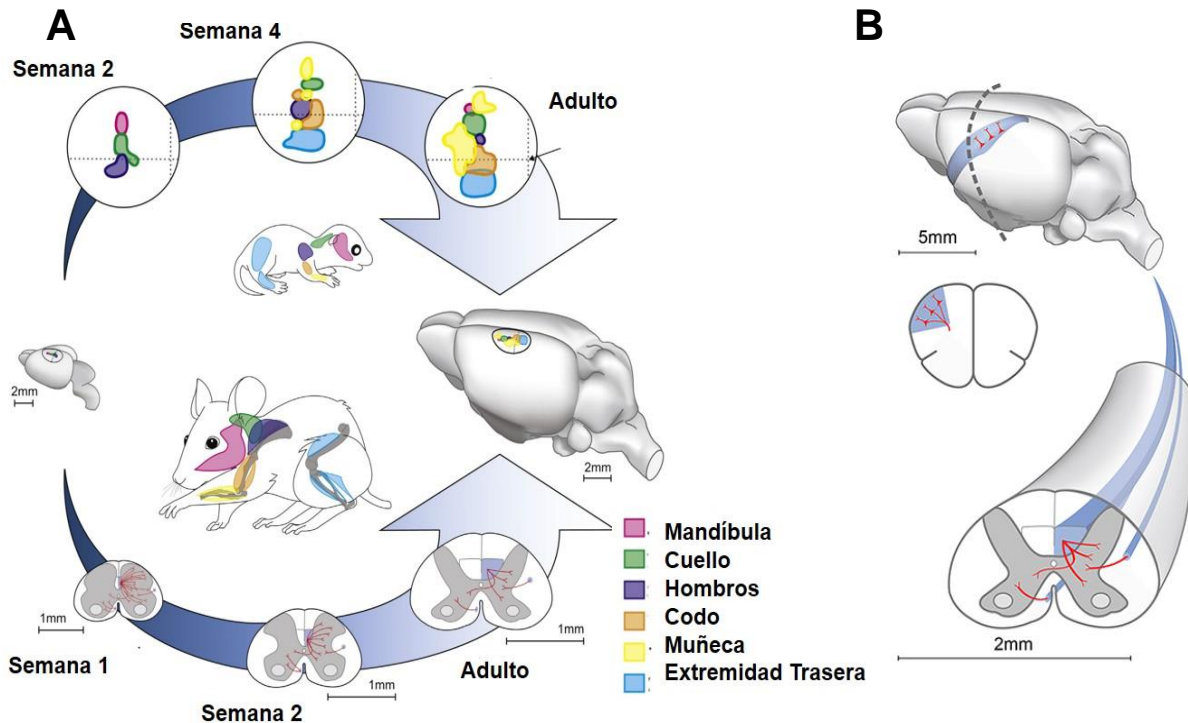
En los roedores, el circuito corticoespinal difiere de los primates en que entre el 80% y 85% de los axones del tracto corticoespinal cruzan la línea media y decusan por el tracto dorsal corticoespinal que se encuentra en la parte ventral de la médula espinal (Figura 7; Vogelaar & Estrada, 2016; Welniarz et al., 2015; Canty & Murphy, 2008).



**Figura 7.** Vía corticoespinal en roedores. Corteza Motora (CxM), Ganglios Basales (GB), Corteza posterior parietal (CxPP), Corteza visual motora (CxVM), Núcleo del Tallo Cerebral (NTC), Formación Reticular (FR), Región mesencefálica locomotora (RML), Núcleo Cuneiforme (NC), Núcleo Pedunculopontino (NPP) (Imagen tomada y modificada de Kiehn, 2016).

Además, en los roedores, específicamente en la rata, se ha visto que el desarrollo de los mapas motores ocurre a lo largo del crecimiento del individuo, desde la regionalización en el cerebro de dichas áreas hasta la formación de conexiones conforme a sus respectivas representaciones somatotópicas de la vía corticoespinal; esta vía permanece a lo largo del crecimiento (Figura 8A). Cabe mencionar que el patrón de las proyecciones motoras corticoespinales de roedores se caracteriza por la presencia de axones corticoespinales que proyectan dentro del área ventral contralateral de la columna y terminan en circuitos premotores (Figura 8B; Serradj *et al.*, 2017).





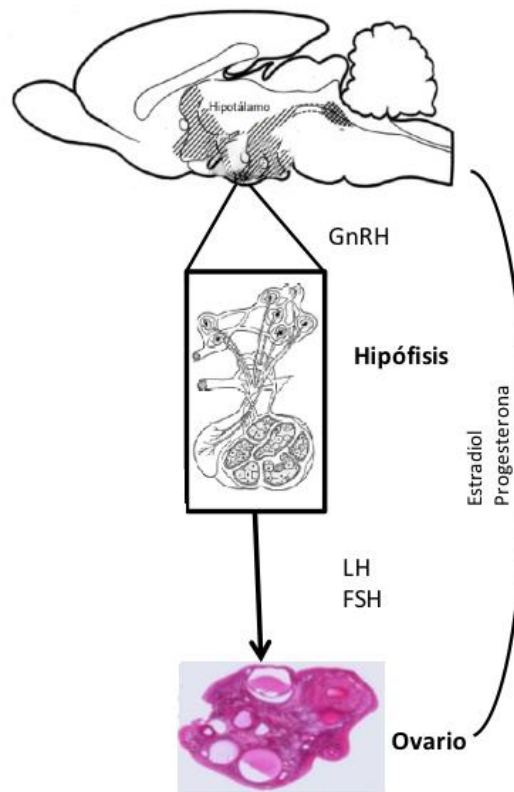
**Figura 8.** A. Desarrollo del circuito corticoespinal y mapa somatotópico de la rata a partir de 1 semana de edad hasta la madurez. B. Proyecciones corticoespinales del roedor en un corte transversal y la decusación en la vía piramidal a nivel de corteza cerebral (Imagen tomada de Serradj *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que el desarrollo a nivel cortical así como el control motor en su mayoría se encuentran ligados a procesos hormonales para modular y producir respuestas y conductas en los individuos ante diversos estímulos (López *et al.*, 2011).

### 1.5 Endocrinología reproductiva

Los diferentes cambios en el organismo a lo largo de la pubertad que permiten alcanzar un desarrollo viable para la reproducción; son procesos de importancia biológica y ecológica para las especies. En este periodo, la activación de glándulas endócrinas y el aumento en la síntesis y liberación de hormonas promueve el incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis, ovario y útero en conjunto con el sistema nervioso donde los estímulos por parte del sistema nervioso llegan al hipotálamo para la secreción de factores de liberación que llegarán a la adenohipófisis para la liberación de hormonas gonadotrópicas que a su vez, producen esteroides sexuales en la gónada para la maduración de los caracteres sexuales y de los gametos (Rosell, 2004; Jara, 2001; Purves *et al.*, 2007).

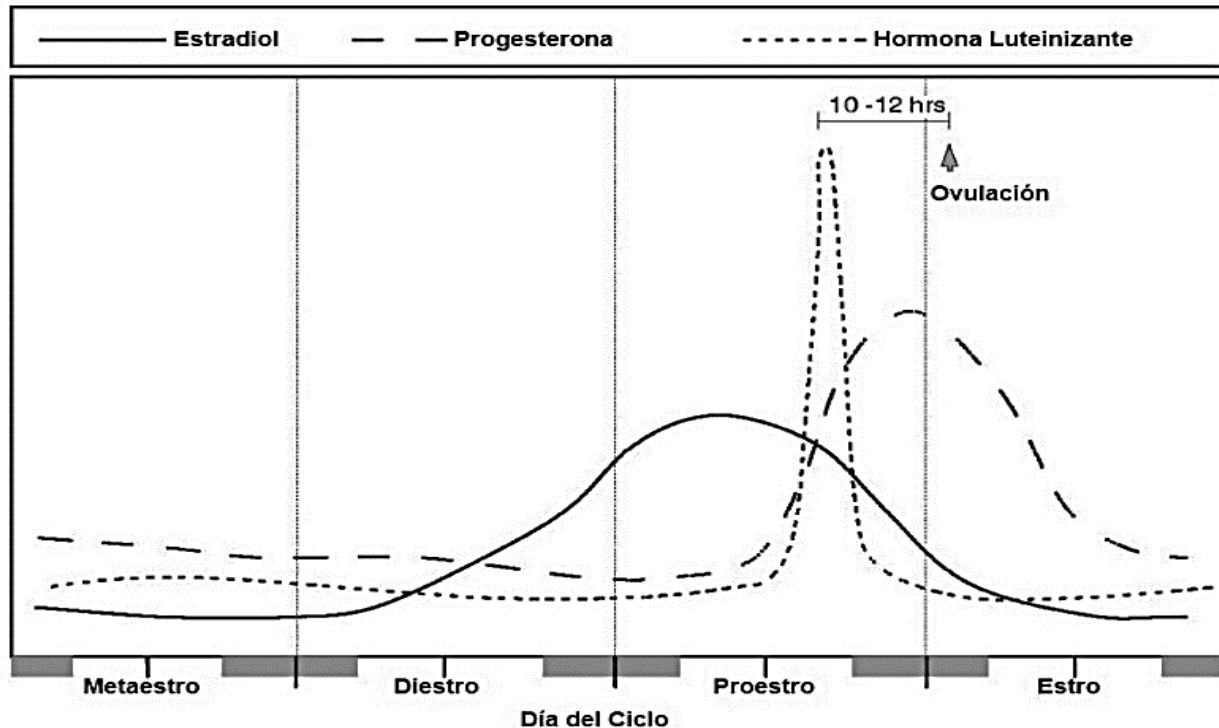
El eje hipotálamo-hipófisis-ovario, se rige por la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual secreta a nivel de la adenohipófisis a la hormona foliculoestimulante (FSH) encargada del crecimiento de los folículos ováricos y la producción de estrógenos. La hormona luteinizante (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 (gónadas) por medio de receptores de membrana. El cuerpo lúteo además de la producción de estrógenos y de progesterona produce inhibina que establece una retroalimentación negativa con la adenohipófisis y el hipotálamo, lo que inhibe la producción de FSH y LH (Figura 9; Jara, 2001; Gómez & Paniagua, 2002; Hoffman *et al.*, 2009; Pacheco, 2010).



**Figura 9.** 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 (Imagen tomada y modificada de Tapia & Anaya, 2016).

## 1.6 Ciclo estral

El periodo reproductivo en ratas hembras en promedio inicia entre los 60-70 días de edad con una duración de 4 a 5 días, es llamado ciclo estral; este se rige por medio de las hormonas hipofisarias y ováricas como el estradiol, la progesterona, la prolactina, la hormona luteinizante y la hormona folículo estimulante, que tienen diferentes niveles de liberación lo largo del ciclo estral (Figura 10; Goldman *et al.*, 2007; Westwood, 2008; Hamid & Zakaria, 2013).



**Figura 10.** Fluctuaciones de las hormonas progesterona, luteinizante y estradiol a lo largo de las diferentes etapas del ciclo estral de una duración en promedio de 4 a 5 días (Imagen tomada de Goldman *et al.*, 2007).

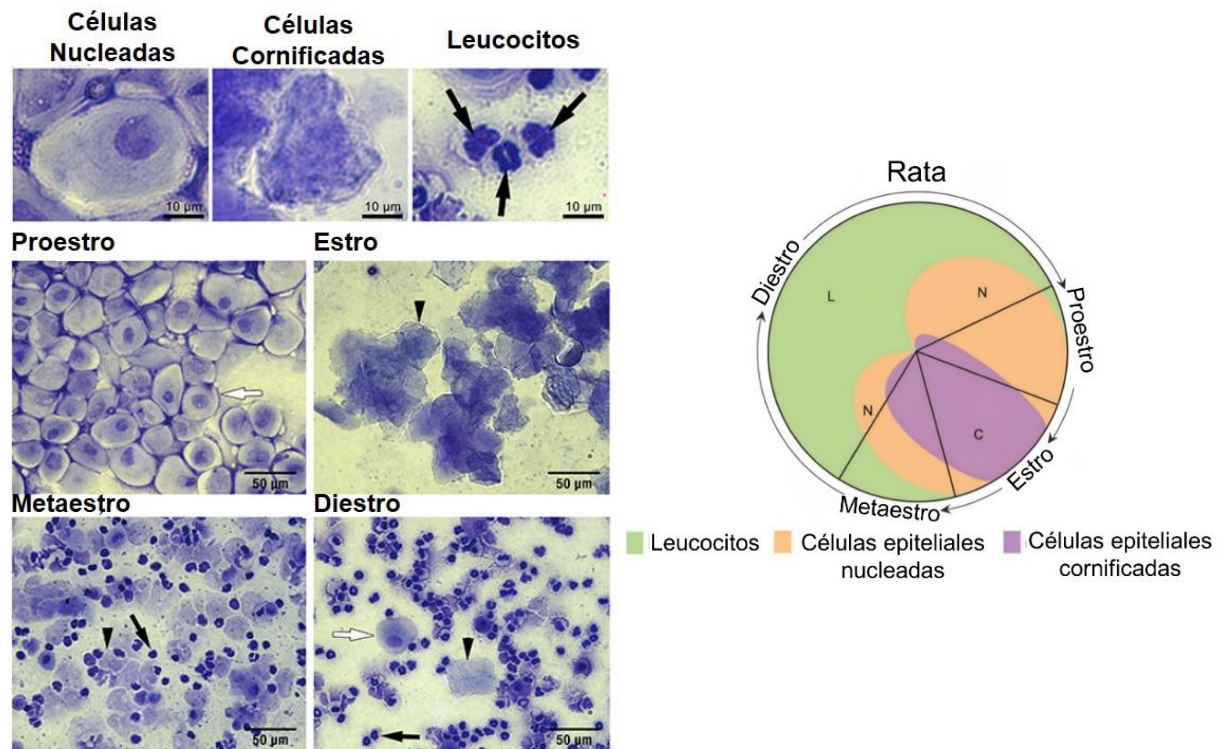
El ciclo estral se caracteriza por la presencia de cuatro fases que dependen de la progresión del estado de la mucosa vaginal del útero, de los ovarios, de las fluctuaciones hormonales, así como de factores ambientales como la temperatura, ciclo luz-oscuridad y moléculas odoríferas; dichas fases fueron categorizadas por Heape, (1900), y nombradas como: proestro, estro, metaestro (diestro 1) y diestro (diestro 2) principalmente por la cantidad y tipo de células vaginales (células nucleadas, células cornificadas y leucocitos) que se presentan a lo largo de cada etapa (Figura 11; Sepúlveda *et al.*; 2012; Hamid & Zakaria 2013; Westwood, 2008).

**Proestro.** Dura aproximadamente 12 a 14 horas; comienza con la luteolisis del ciclo anterior y con niveles de progesterona bajos. El aumento de FSH y LH provoca el crecimiento de un folículo preovulatorio donde del resto de los folículos que pueden desarrollarse sólo uno es seleccionado como el dominante y será el que llegue a la ovulación lo que provocará a su vez el aumento de la síntesis y liberación de estrógenos, y con ello el aumento en el diámetro folicular de la cavidad antral.

**Estro.** En promedio dura de 25 a 27 horas, es el periodo en donde la hembra está sexualmente receptiva. Los estrógenos producidos por células de la pared del folículo en desarrollo aumentan y ocurre la ovulación. Pasadas 12 horas desde el comienzo del celo, el sistema nervioso central se hace refractario y propicia la disminución de estrógenos desapareciendo las manifestaciones del celo (mostrándose más receptiva ante el macho), también se provoca que la vagina posea un amplio número de células epiteliales escamosas cornificadas irregulares sin núcleo visible.

**Metaestro.** En esta etapa con una duración de 6 a 8 horas, la secreción de progesterona se eleva para alcanzar el segundo pico hacia el crecimiento y dominio del cuerpo lúteo en el ovario debido a la falta de fertilización; después de la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre (cuerpo hemorrágico) y por lo tanto la vagina posee un gran número de leucocitos con pocas células epiteliales, a esta etapa también se le conoce como Diestro 1.

**Diestro.** Es la fase más larga del ciclo, dura alrededor de 57 horas, conocida también como Diestro 2. En esta etapa se prepara el tracto para la llegada del óvulo fertilizado y el cuerpo lúteo maduro finaliza con luteólisis; la vagina se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de leucocitos pequeños (Sepúlveda *et al.*, 2012; Marcondes *et al.*; 2002; Guáqueta, 2009; Westwood, 2008).

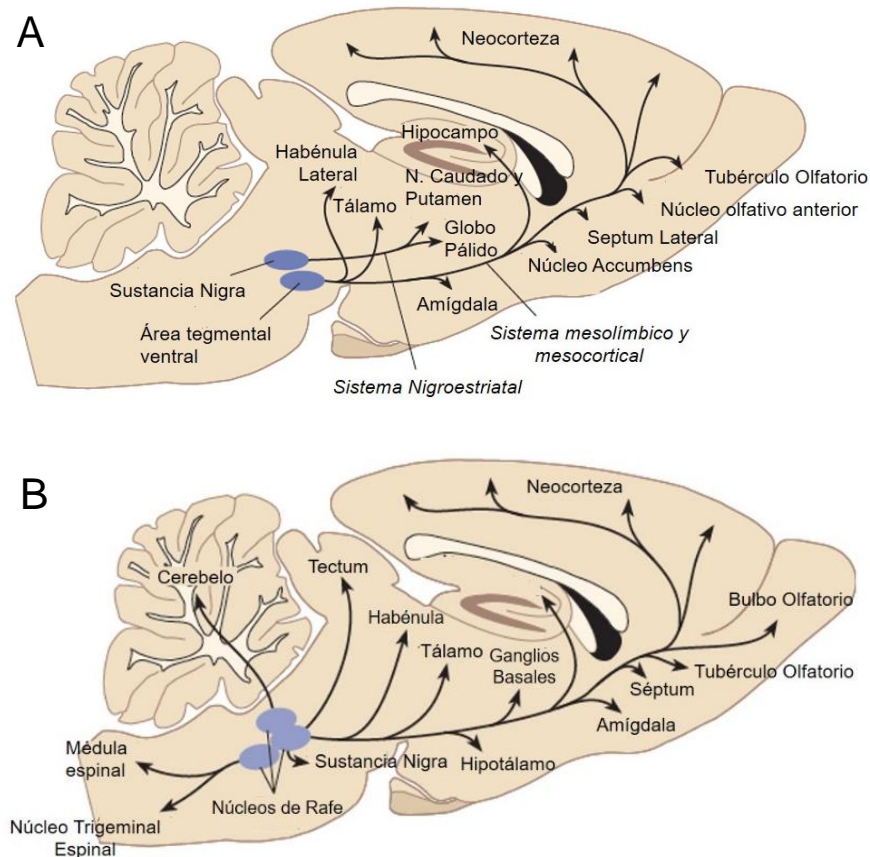


**Figura 11.** A. Citología presente a lo largo del ciclo estral: Proestro: Células nucleadas; Estro: Células cornificadas; Metaestro: Células cornificadas y nucleadas; Diestro: Leucocitos B. Representación de proporción de células presentes a lo largo del ciclo estral de la rata (Imágenes tomadas y modificadas de McLean *et al.*, 2012; Cora *et al.*, 2015).

### 1.7 Conexiones gónadas y corteza motora primaria

La interacción del sistema nervioso y endócrino se da principalmente por medio de neuromoduladores que a pesar de originarse en la formación reticular del tronco encefálico, sus proyecciones axónicas permiten una conexión hacia cortezas del encéfalo. Específicamente, se ha encontrado que el pulso hipotalámico depende de diversos factores entre los que destacan la inhibición de la liberación de la GnRH por medio de GABA, la cual a su vez es estimulada por hormonas como la noradrenalina, serotonina y dopamina que regulan la liberación de la hormona FSH y LH a lo largo del ciclo reproductivo. Cabe recalcar que específicamente las vías de serotonina y dopamina poseen proyecciones para el control motor (Silverthorn, 2008; Purves *et al.*, 2007; Gómez & Paniagua, 2002).

En el humano como en roedores las vías de neurotransmisores involucradas principalmente en el control motor son la serotonina y dopamina, estas vías son similares en ambas especies ya que; la vía dopaminérgica, inicia en la sustancia nigra proyectando hacia ganglios basales y en el área tegmental ventral hacia el resto de la corteza así como la vía serotoninérgica, cuyos núcleos son en la sustancia nigra y núcleos de rafe proyectando hacia la corteza (Figura 12; Carlson, 2013; Silverthorn, 2008)



**Figura 12.** Vía dopaminérgica (A) y vía serotoninérgica (B) de ratas implicadas en el movimiento y proyección hacia corteza en la ratona (Imágenes tomadas y modificadas de Carlson, 2013).

## 2. Antecedentes

La actividad locomotora difiere de locomoción (desplazamiento) por la forma en que esta última es influenciada por diversos factores como edad, peso, sexo e incluso estrés; involucra además la toma de decisiones de un animal respecto del lugar, tiempo y la forma en que expresará una respuesta a un estímulo, convirtiéndola de esta forma en una conducta compleja (Martin, 2003).

Específicamente en el caso de roedores hay estudios realizados en donde la ansiedad, la impulsividad e incluso la agresividad pueden estar ligadas al movimiento o a las conductas de huida, así como hay factores ambientales que influyen en la actividad locomotora como la familiaridad del ambiente o cambios en la temperatura, por lo que la deambulación por exploración es considerada como una conducta estable y consistente para un roedor (Ibáñez & Ortet, 1996). También se muestran en estudios previos en donde a los roedores se les somete a sustancias adictivas o neurotóxicas y se ha observado una reactividad locomotora incrementada, lo cual es usado como indicador de reacción a estas sustancias (Gulley *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2008).

La exploración y la actividad locomotora son claramente diferentes entre roedores, tales diferencias se atribuyen al sexo, de aquí que se sugiere que las hembras poseen una gran variabilidad en la respuesta motora ante un ambiente novedoso (Flores *et al.*, 2014; Ibáñez & Ortet, 1996).

Las hormonas que intervienen en el ciclo estral además de influir directamente en la reproducción y en los cambios emocionales pueden regular aspectos conductuales (Gutiérrez *et al.*; 2000), por lo que diferencias entre machos y hembras han sido en su mayoría atribuidas a la cantidad de hormonas liberadas por las hembras a lo largo de su ciclo estral y a las diversas fluctuaciones de las mismas (Valle, 1970; Bale & Epperson, 2017; Tapia & Anaya 2016).

En estudios con roedores se observó que hembras de 14 meses de edad con capacidad reproductiva muestran ciertas oscilaciones de anhedonia (pérdida de interés) causado por depresión lo que coincide con las fluctuaciones hormonales, lo que conlleva a la teoría de que factores hormonales afectan en mayor medida a las mujeres en sus actividades cotidianas que en hombres (Flores & Martínez; 2012). Por otra parte, el estradiol ha mostrado una relación con el incremento en la actividad locomotora en ratas, así como en la densidad neuronal hipocampal en ratas ovariectomizadas (Mayen *et al.*, 2014). Además se han observado cambios conductuales en la actividad locomotora ante la administración de cannabinoides que promueven la baja de concentración de prolactina, FSH y LH (Leza & Lorenzo, 2000; Valle *et al.*, 2003). Se ha visto en estudios previos el papel del  $17\beta$  estradiol junto con sus dos receptores principales; ER $\alpha$  y ER $\beta$

participan en el mantenimiento de la función hipocampal a lo largo del ciclo estral en individuos adultos. El mecanismo por el cual los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  promueve el establecimiento de un proceso de memoria tiene que ver con la activación de cascadas de señalización en las que participan las cinasas. Cada receptor regula de manera diferente ese proceso ya que el ER $\alpha$  mantiene la transcripción y la memoria conforme disminuye el estradiol mientras que el ER $\beta$  participa de acuerdo a los niveles de estradiol y de la actividad del propio receptor ER $\alpha$  (Bean *et al.*, 2014).

Por otro lado un estudio que muestra resultados de pruebas de nado forzado en roedores, reportó mayor inmovilidad por parte de las hembras en comparación con la de machos, principalmente en las etapas de diestro y de proestro donde se cree que tienden a rendirse fácilmente ante la posibilidad de poder salir del lugar debido probablemente a la disminución de progesterona y a la emocionalidad que esta puede provocar al considerar que no hay escapatoria (Gouveia *et al.*, 2008).

Respecto a la remodelación dendrítica, diversos estudios indican que el aprendizaje tanto motor como sensorial, tiene un impacto en la modificación de dendritas de neuronas piramidales, dichas modificaciones a su vez pudieran estar relacionadas con cambios en la concentración intracelular postsináptica de calcio, que pueden limitarse a zonas específicas de la corteza prefrontal, dorsolateral, motora primaria y suplementaria (Ma *et al.*, 2016).

Estudios previos señalan que existe una generación y remodelación dendrítica por estimulación de señales eléctricas del glutamato como neurotransmisor, la regulación del estrógeno en neuronas hipotalámicas, así como por la influencia de factores de crecimiento, condiciones fisiológicas como la hibernación, el ciclo estral y por sustancias estimulantes administradas en el embarazo provocando cambios en la densidad de espinas dendríticas a lo largo del desarrollo (Ethell & Pasquale, 2005; Frankfurt & Luine, 2015; Calizo & Flanagan, 2000).



### **3. Justificación**

El comportamiento en roedores se ha visto ampliamente relacionado con la conectividad sináptica que ejercen las neuronas piramidales, las cuales sufren remodelación dendrítica como respuesta a diferentes estímulos ambientales que son evaluados con pruebas de comportamiento (Okabe *et al.*, 1999).

Los estudios sobre remodelación dendrítica permiten entender la importancia de la corteza cerebral, tanto en la forma clínica de diversos padecimientos neuronales como en el comportamiento (Urrego *et al.*, 2011).

Un factor determinante es también la influencia del sexo en la ejecución de pruebas motoras que suele ser relacionada con el ciclo hormonal de las hembras. A nivel neuronal en la rata adulta, se ha mostrado que las variaciones en la concentración de diversas hormonas a lo largo del ciclo estral provocan cambios en la densidad de espinas dendríticas en áreas como el hipocampo (Norris & Carr, 2013; Paxinos, 1995). No obstante, estos estudios se han realizado principalmente en hipocampo, por lo que es de interés para el presente trabajo analizar si existen cambios en la morfología dendrítica en el área cortical implicada en la programación y ejecución del movimiento, la corteza motora primaria, debido al papel principal que desarrolla a nivel neuronal en el control de la locomoción (Kiehn, 2016; Rivara, *et al.*, 2003).

### **4. Hipótesis**

Las neuronas de corteza motora primaria muestran variaciones en su morfología a lo largo del ciclo estral, lo que se relaciona con fluctuaciones en la actividad locomotora dependientes del mismo ciclo.

### **5. Objetivo general**

Evaluar la actividad locomotora y la morfología dendrítica de neuronas piramidales de la corteza motora primaria (capa V) en cada etapa del ciclo estral de ratas adultas Long Evans.

#### **5.1 Objetivos específicos**

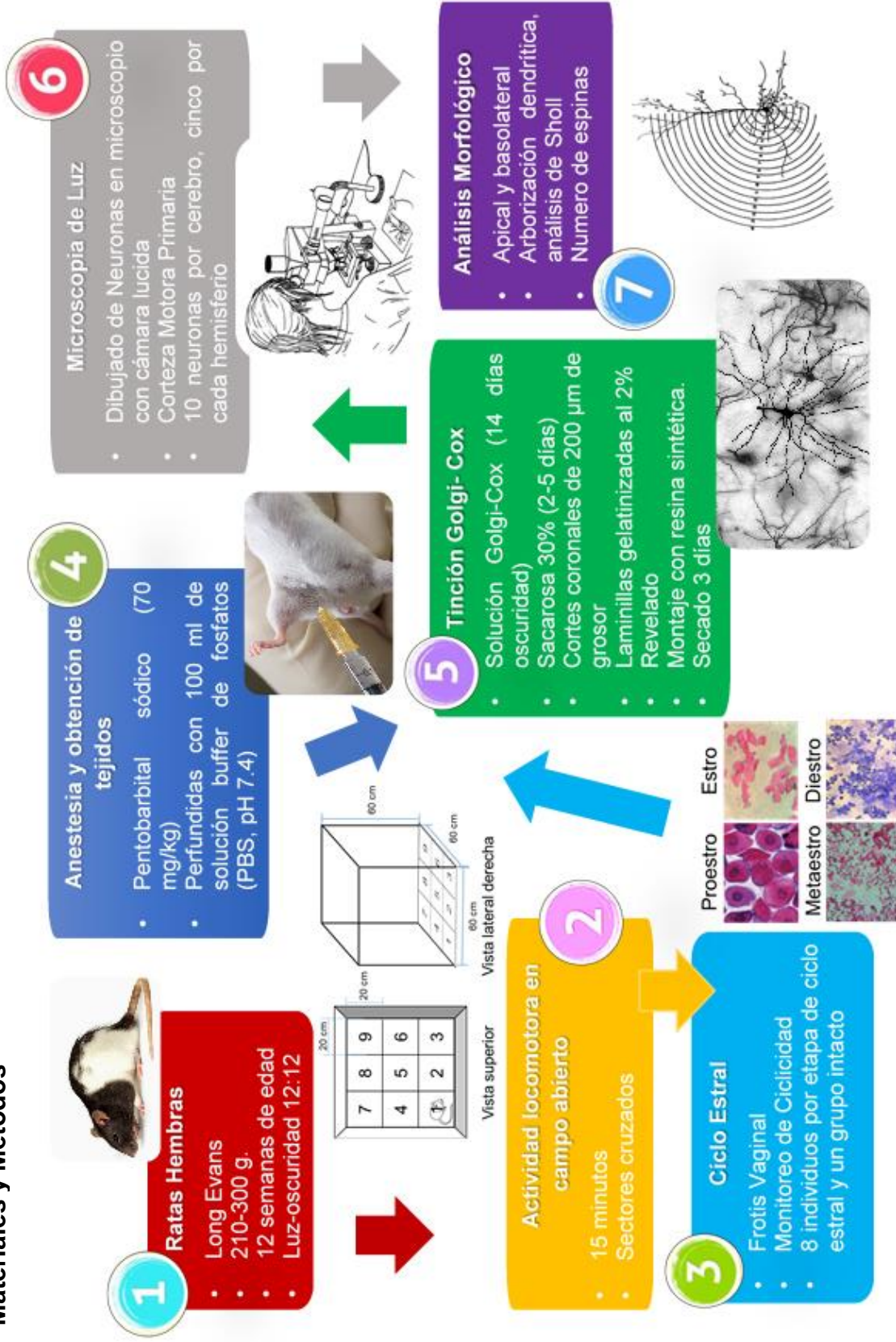
5.1.1 Evaluar la actividad locomotora en campo abierto de ratas hembras en las diferentes etapas del ciclo estral.

5.1.2 Analizar la arborización dendrítica apical y basolateral de neuronas piramidales de la corteza motora primaria (capa V) en las diferentes etapas del ciclo estral.

5.1.3 Calcular la longitud dendrítica por orden de ramificación de los arboles apical y basolateral de neuronas de corteza motora primaria (capa V) de la rata en cada etapa del ciclo estral.

5.1.4 Determinar la densidad de espinas dendríticas de árboles apicales y basolaterales de neuronas de la corteza motora primaria (capa V) en cada etapa del ciclo estral.

## 6. Materiales y Métodos



**Figura 13.** Diagrama de trabajo. Se muestra los procedimientos realizados para el desarrollo del presente estudio con base a los objetivos propuestos. Se utilizaron ratas hembra Long Evans a las cuales se les midió actividad locomotora en campo abierto y la morfología de neuronas de la corteza motora primaria en cada etapa del ciclo estral.

## 6.1 Sujetos

Se emplearon 75 ratas hembras Long Evans de 12 semanas de edad caracterizada por un alto índice de fertilidad y regularidad en el ciclo estral (Matt *et al.*, 1987; Anzalone *et al.*, 2001; Klochkov, *et al.*, 2011) y relacionada con un peso de aproximadamente 210 a 300 gramos, obtenidas del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), lugar en donde fueron mantenidas bajo condiciones controladas de luz, humedad y ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas y, con acceso libre a agua y alimento.

Se conformaron dos lotes con la intención de evitar en lo posible la influencia de la sobrestimulación de los individuos por exceso de manipulación durante el monitoreo del ciclo estral (McLean *et al.*, 2012; Matt *et al.*, 1986) en la morfología neuronal.

El primer lote se conformó de cinco grupos experimentales de 8 individuos cada uno para evaluar la actividad locomotora en campo abierto; el grupo control (“intacto”) fue conformado de ratas que pudieran encontrarse en cualquier etapa de su ciclo, la cual fue registrada una vez terminada la prueba de conducta.

El segundo lote se conformó de cinco grupos experimentales de 7 individuos cada uno para analizar la morfología dendrítica de neuronas de corteza motora primaria; el grupo control fue integrado por ratas a las cuales se les practico únicamente un frotis vaginal para saber en qué etapa se encontraban previo al sacrificio, sin monitoreo del ciclo estral.

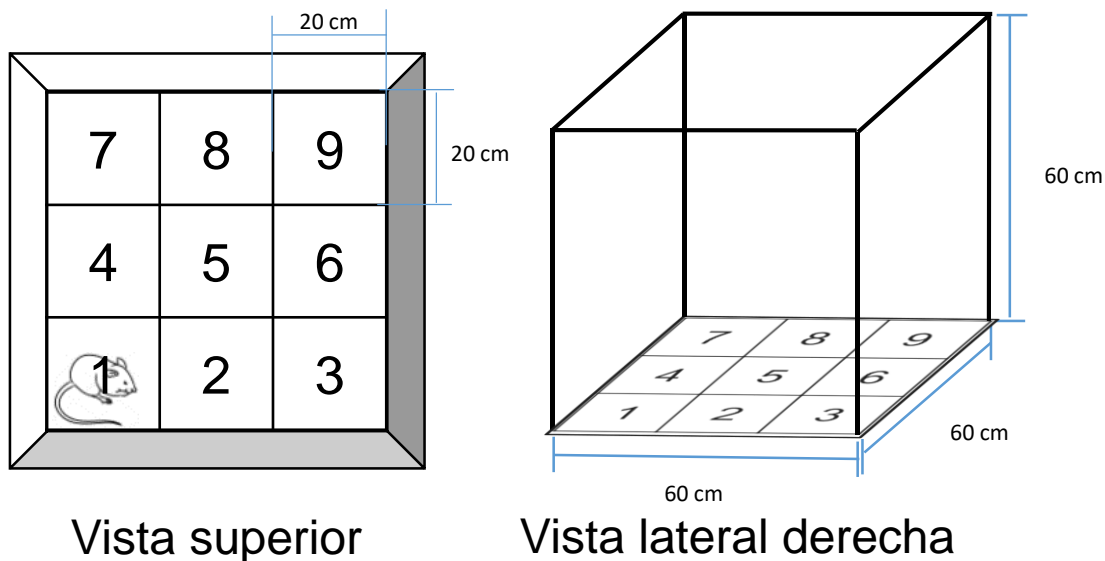
Los demás grupos de ambos lotes se integraron por individuos que se encontraban en la etapa de proestro, estro, metaestro o diestro al momento de someterlos a la prueba de campo abierto y al momento del sacrificio, evento necesario para el análisis de la morfología dendrítica respectivamente.

Los animales fueron obtenidos y utilizados de acuerdo a lo establecido en los lineamientos de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y apegándonos a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, Diario Oficial de la Federación.

## 6.2 Actividad locomotora (Lote 1)

Los individuos fueron trasladados al cuarto oscuro del laboratorio de Neurofisiología Experimental para ser sometidos a la prueba de actividad locomotora en campo abierto, donde fueron pesados y habituados por un periodo de treinta minutos previo al inicio de la prueba, para la disminución del estrés generado por el traslado del bioterio al laboratorio.

Esta prueba inició colocando al animal en el cuadro 1 de una caja de madera (60x60x60 cm) previamente aseada y dividida en nueve cuadros de 20x20 cm (Figura 14) durante 15 minutos el observador registró el número de cuadros visitados (García & Garau, 1978) 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 que precedió en la prueba, mediante una solución limpiadora que contiene agua, pinol y amoníaco en una relación de 990:5:5 ml.



**Figura 14.** Esquema de la caja usada para la prueba de actividad locomotora en campo abierto. Se muestran los 9 cuadrantes de 20x20cm en que se encuentra dividida y el cuadrante en que se introduce al animal para el inicio de la prueba.

Posteriormente el número de cuadros cruzados por las ratas se multiplicó por 20 cm para calcular la distancia recorrida en 15 minutos, así mismo se evaluó la distancia recorrida en intervalos de 5 minutos (Villanueva, 2016).

Inmediatamente después de la prueba conductual se obtuvieron las muestras vaginales para el monitoreo de la ciclicidad y la determinación de la etapa del ciclo estral en que se encontraba la rata al momento de la prueba, lo que permitió la conformación de los cuatro grupos de cada etapa del ciclo estral.

### **6.3 Obtención de la muestra vaginal**

Para la obtención de la muestra vaginal, la rata fue colocada en decúbito supino y se procedió a introducir un asa bacteriológica estéril en la vagina para obtener un frotis, la muestra se colocó en una gota de agua estéril sobre un portaobjetos dejándose secar para inmediatamente ser procesadas con la técnica de hematoxilina-eosina (Marcondes *et al.*, 2002). Se procedió con la determinación de la ciclicidad por medio del monitoreo de un ciclo completo de cinco días de duración. Se tomaron dos muestras por día, una a las 10:30 am y otra a las 3:00 pm con el objetivo de incluir en los grupos, animales regulares (Sepúlveda *et al.*, 2012).

### **6.4 Tinción Hematoxilina- Eosina**

Esta técnica consiste en colocar una gota de Hematoxilina sobre la muestra previamente colocada en el portaobjetos y dejándose por un periodo de cinco minutos (cuya solución permite la tinción de los núcleos de la muestra) para posteriormente, enjugarse con agua estéril evitando el chorro directo sobre la muestra y dejándose secar. Consecutivamente se colocó una gota de eosina por cinco minutos en las muestras para la tinción del citoplasma y el enjuague posterior, para seguidamente del secado, fijar dichas muestras con alcohol (Taradach, 1982).

Una vez concluida la tinción las muestras fueron observadas al microscopio óptico y categorizadas de acuerdo a su etapa del ciclo estral respetivamente, de acuerdo al tipo celular con mayor proporción (75%-25%) en cada etapa del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro). La identificación de cada etapa se logró por un curso de capacitación impartido por el personal técnico del bioterio y con base a lo reportado por Cora *et al.*, (2015).

## **6.5 Anestesia y obtención de tejidos (Lote 2)**

Se seleccionaron 35 ratas al azar para la conformación de cinco grupos de siete individuos, cuatro de ellos correspondientes a cada etapa del ciclo estral: Proestro, Estro, Metaestro y Diestro, y un grupo intacto. Se monitoreo la ciclicidad por un ciclo para determinar si la rata era regular o irregular. En el caso de regularidad la rata fue incluida en el grupo mientras que los animales irregulares fueron devueltos al bioterio. El quinto grupo asignado como grupo intacto es un grupo de siete individuos, al cual se tomó únicamente una muestra vaginal para saber en qué etapa se encontraban los individuos previos al sacrificio, de los cuales uno se encontraba en metaestro, dos en proestro, dos en estro y dos en diestro.

Una vez corroborada la ciclicidad de las ratas se procedió a la eutanasia por medio de anestesia con pentobarbital sódico (70 mg/kg) y perfusión por gravedad de 100 ml de solución buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4) para la limpieza del cerebro. Los desechos biológicos fueron recolectados en bolsas de material biológico y trasladados al Bioterio Claude Bernard para su incineración.

## **6.6 Tinción Golgi-Cox**

El encéfalo se procesó mediante la tinción de Golgi-Cox. Se almacenó en solución Golgi-Cox por 14 días en completa oscuridad, al término de este lapso la solución fue cambiada por sacarosa al 30%, donde los encéfalos se mantuvieron por un periodo de 2 a 5 días para posteriormente ser seccionados en cortes coronales de 200  $\mu$ m de grosor con un vibratomo (vibratomo manual NVSL, 2007) al nivel de la corteza motora primaria, de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas de Paxinos & Watson, (1998). Los cortes fueron colocados en laminillas gelatinizadas al 2% y mantenidos en una cámara húmeda por una noche.

Posteriormente los cortes fueron sometidos a la técnica de impregnación para su revelado (Gibb & Kolb, 1998). Las laminillas fueron enjuagadas por 1 minuto con agua destilada, después se colocaron en hidróxido de amonio por 30 minutos para después ser de nuevo enjuagadas por 1 minuto con agua destilada y colocadas en fijador rápido Kodak® por 30 minutos. El tejido nuevamente se enjuagó con agua destilada por 1 minuto; al término del revelado, se procedió con la deshidratación del tejido por medio de

alcoholes ascendentes y dos enjuagues con alcohol al 100% por 5 minutos y finalmente se clarificó con Xileno por 15 minutos para ser montados con resina sintética. Las laminillas se dejaron secar por un periodo de 3 días por lo menos antes de ser analizadas por microscopia de luz. Este proceso de revelado y deshidratación del tejido se llevó a cabo en una campana de extracción y con las medidas adecuadas de uso de guantes, anteojos y mascarilla que evita cualquier daño al experimentador.

## 6.7 Análisis morfológico

Una vez que las laminillas estuvieron secas, se realizó un análisis microscópico por medio de un microscopio que tiene adaptado un brazo de dibujo (cámara lúcida). Las neuronas se observaron a una amplificación de 400x mientras que las espinas dendríticas se observaron a una amplificación de 1000x (Figura 15). Se seleccionaron diez neuronas de la corteza motora primaria capa V, cinco del hemisferio izquierdo y cinco del hemisferio derecho ( $n_{\text{total}}= 350$ ). Se llevó a cabo la reconstrucción bidimensional en papel de las neuronas piramidales de la corteza motora primaria (Paxinos & Watson, 1998). Con base en los parámetros de la ubicación del soma neuronal en la capa V, de una clara morfología piramidal, y la presentación de árboles dendríticos intactos, completos y con una buena impregnación de la tinción, se eligieron las 10 neuronas para realizar el análisis morfológico.



**Figura 15.** Microscopio con cámara lúcida. Con la superposición óptica de la neurona en el microscopio, se realiza el dibujado de neuronas para una recreación exacta.



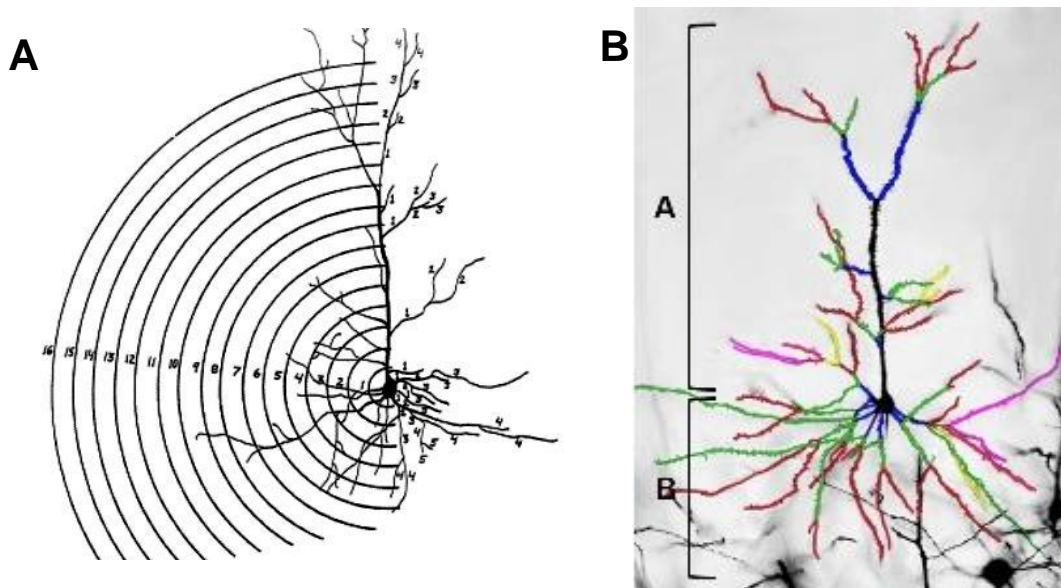
## 6.8 Análisis de Sholl

El análisis de arborización dendrítica de cada neurona piramidal se realizó por medio del método Sholl (Sholl, 1953) mediante el cálculo del número de intersecciones dendríticas.

El análisis consiste en hacer coincidir con la neurona un trazo de círculos concéntricos con una separación de 10  $\mu\text{m}$ , por medio de una lámina transparente. El primer círculo se colocó sobre el soma de la neurona y a partir de ahí se determinó el número de intersecciones dendríticas en cada círculo tomando en cuenta los órdenes de bifurcación. A partir de estos datos se calculó la longitud dendrítica total (Figura 16A) (Sholl, 1953).

Las neuronas fueron identificadas por sus grados de arborización respectivamente mediante el número de órdenes, tomando en cuenta como primer orden aquellas dendritas que emergían del soma seguidas de las de segundo orden por la bifurcación de las del primer orden, y así sucesivamente con órdenes mayores, es decir de tercer, cuarto, quinto, etc. (Coleman y Riesen 1968).

Además se dibujaron de dos segmentos de dendrita de tercer orden de ramificación de los arboles: basolateral y apical por neurona para el cálculo de la densidad de espinas dendríticas (Figura 16B).



**Figura 16.** A. Diagrama en el que se muestra la plantilla de círculos concéntricos (con una separación de 0.5 cm, equivalentes a 10  $\mu\text{m}$  en la neurona) para el análisis de Sholl que consiste en la determinación del número de intersecciones dendríticas en cada uno de los círculos. B. Segmento dendrítico de tercer orden del árbol apical señalado con la letra A y basolateral con la letra B, pueden diferenciarse los órdenes al ser iluminados con diferentes colores (Imagen tomada y modificada de Gorny, 2018).

## 6.9 Análisis estadístico

### 6.9.1 Actividad locomotora en campo abierto

Para analizar los datos relacionados con la distancia recorrida total se empleó una prueba de ANOVA para muestras independientes considerando a las etapas del ciclo estral como variable independiente y a la distancia recorrida como variable dependiente.

La distancia recorrida en intervalos de cinco minutos se evaluó con un ANOVA de 2 vías ( $p < 0.05$ ) considerando a las etapas del ciclo estral, a los intervalos de tiempo (5, 10, 15 min) y la interacción (etapa\*intervalo) como variables categóricas, además para determinar diferencias entre grupos se usó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

### 6.9.2 Morfometría neuronal

Se procedió a analizar los datos obtenidos por el método de Sholl, número de intersecciones por círculo concéntrico, longitud por orden de ramificación del árbol dendrítico apical y basolateral de la neurona (variables dependientes) mediante un análisis de varianza ANOVA de 2 vías ( $p < 0.05$ ) y posteriormente una prueba *post-hoc*

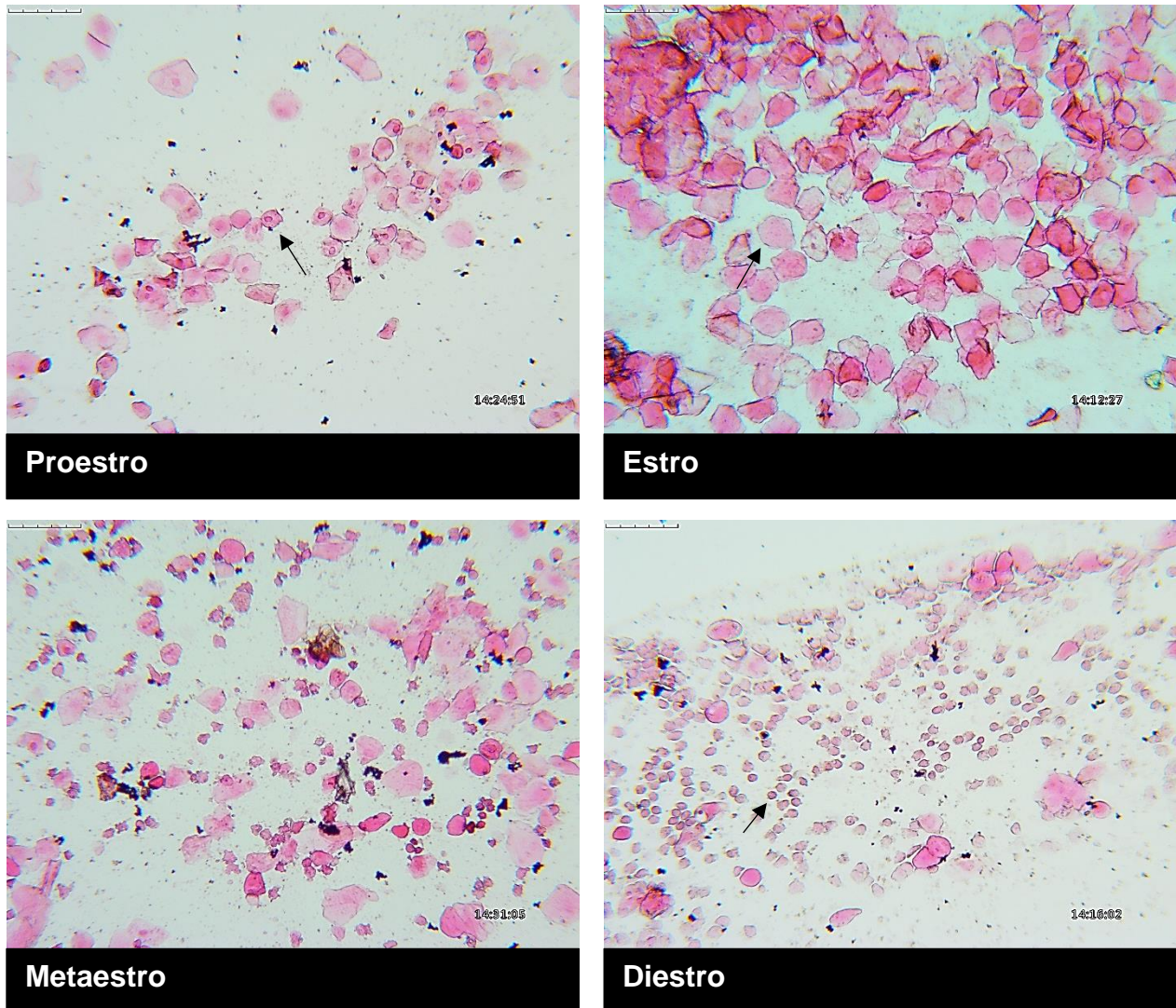
de Bonferroni, considerando el orden de ramificación y la fase del ciclo estral como variables independientes.

Para analizar los datos de la longitud dendrítica total de los árboles y la densidad de espinas dendríticas (variables dependientes) se aplicó una ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ) y una prueba *post-hoc* de Tukey, considerando como variable independiente a la fase del ciclo estral.

## 7. Resultados

### 7.1 Citología vaginal

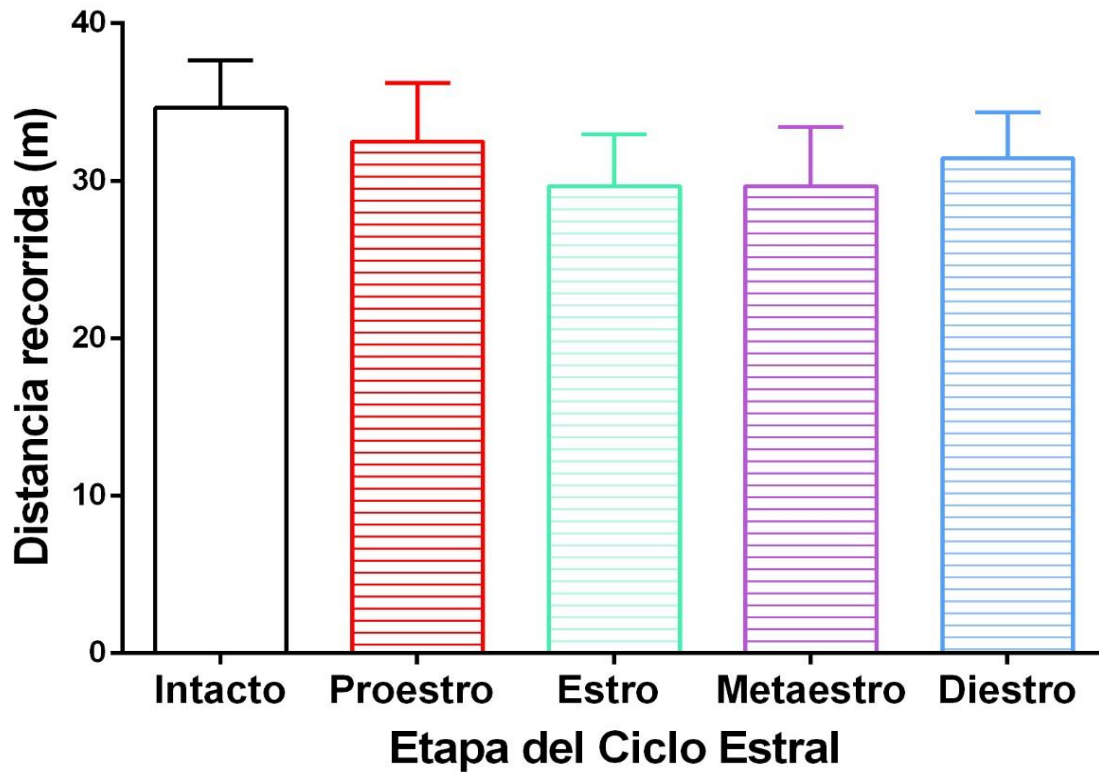
En la Figura 17 se observan muestras representativas de cada etapa del ciclo estral, obtenidas por medio del frotis vaginal de ratas hembra Long Evans con un amplificación 100x.



**Figura 17.** Células representativas de cada etapa del ciclo estral, se pueden diferenciar las células típicas: nucleadas, cornificadas y leucocitos señaladas en la imagen (100x).

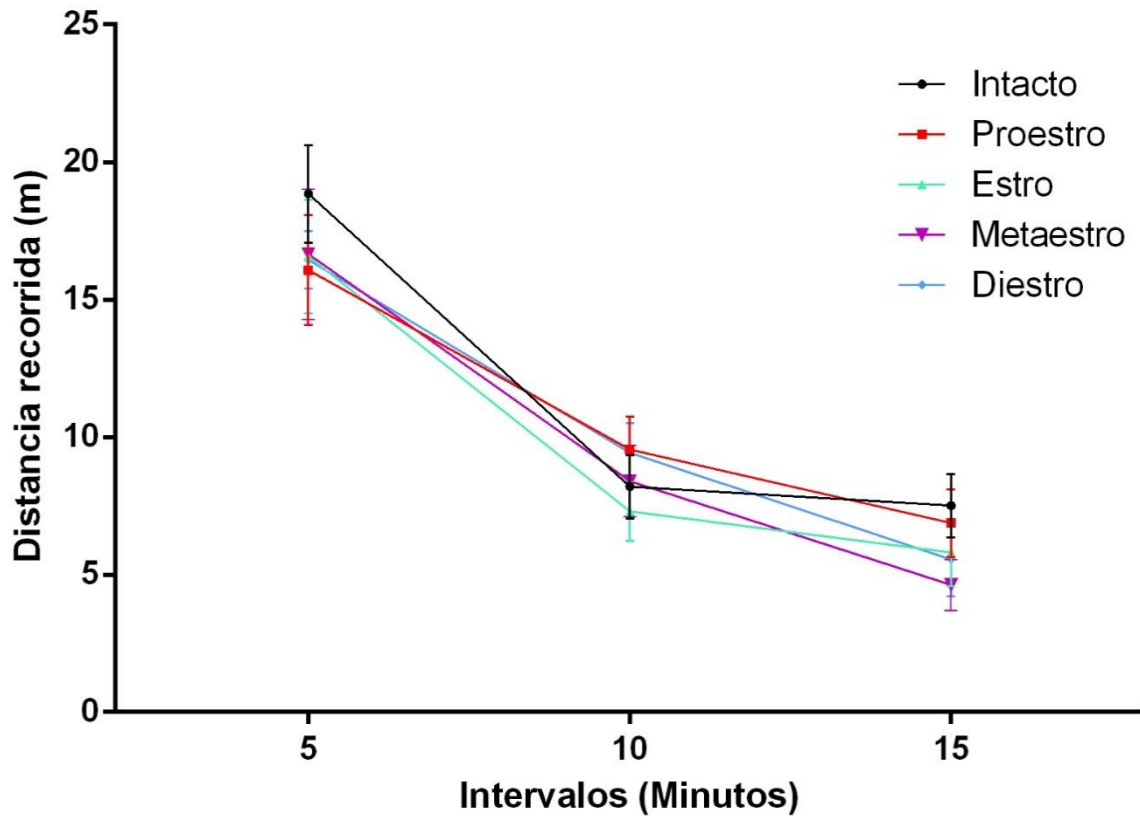
## 7.2 Actividad locomotora

La actividad locomotora de las ratas hembras Long Evans que se encontraban en cada etapa del ciclo estral al momento de la prueba, no fue diferente del grupo intacto (Figura 18) ni entre cada una de las etapas del ciclo estral ( $P=0.8299$ ;  $F=0.3677$ ).



**Figura 18.** Actividad Locomotora. Se muestra la distancia recorrida por los grupos de cada una de las etapas del ciclo estral y del grupo intacto,  $n=8$ .

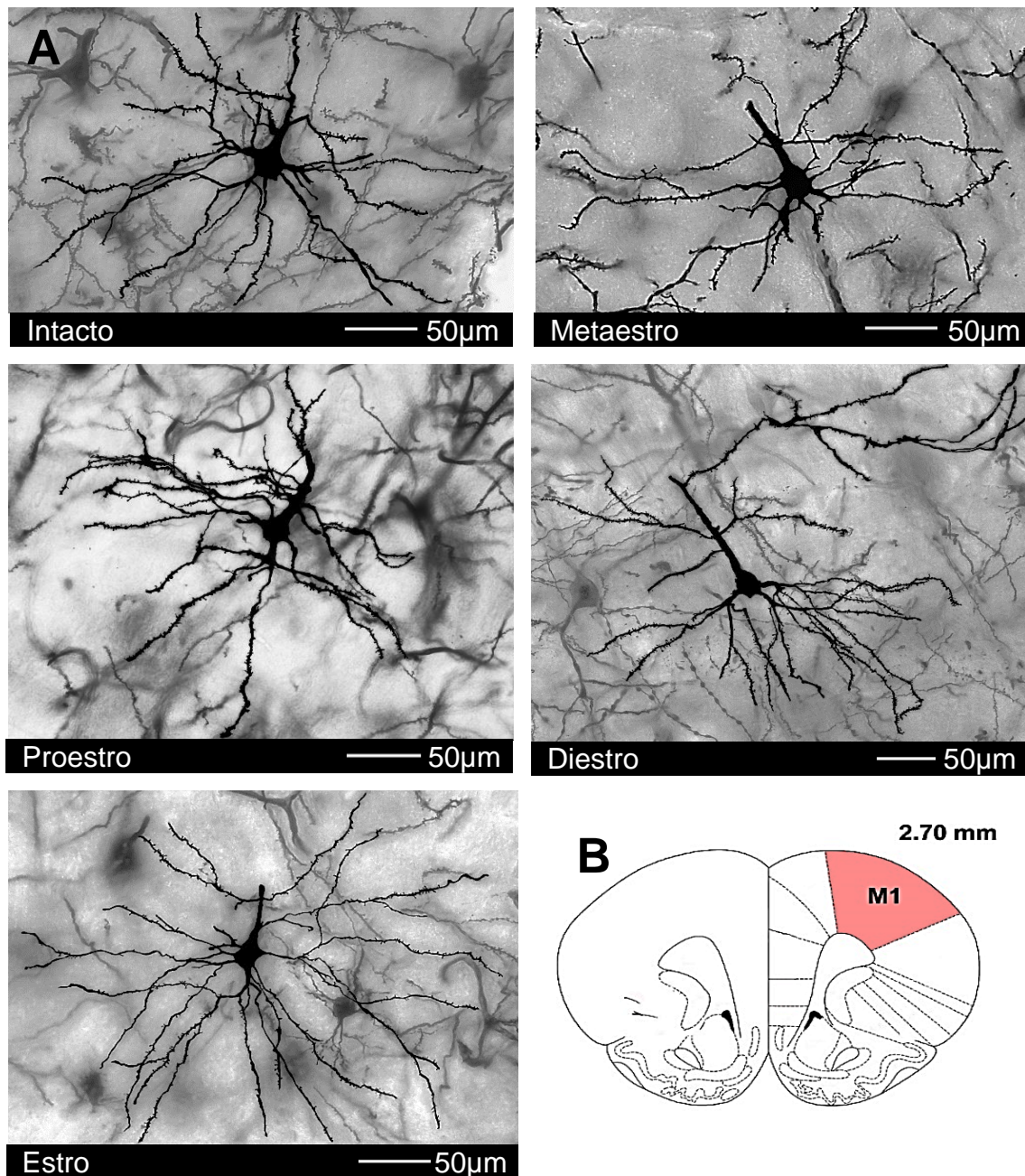
La actividad locomotora analizada por intervalos de 5 minutos tampoco mostró diferencias significativas entre las etapas del ciclo estral, ni con el grupo intacto ( $P=0.8897$ ; Figura 19).



**Figura 19.** Actividad locomotora en intervalos de 5 minutos. Se muestra la distancia recorrida por los grupos de cada una de las etapas del ciclo estral y el grupo intacto,  $n=8$ .

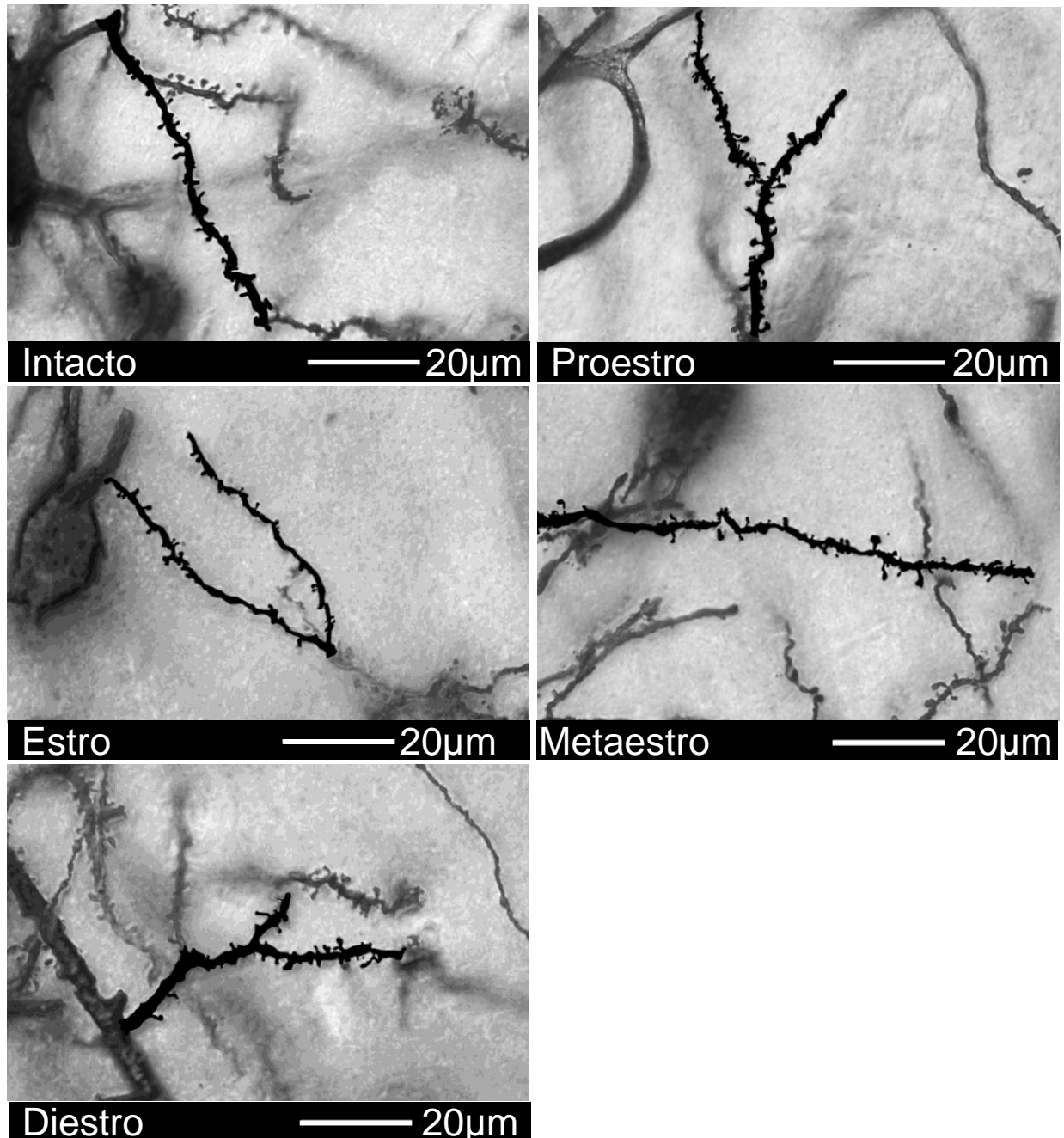
### 7.3 Morfología neuronal

En la Figura 20 se muestran neuronas representativas de la corteza motora primaria de ratas que se encontraban en las diferentes etapas del ciclo estral. Se puede observar la morfología típica correspondiente a las células de Betz.



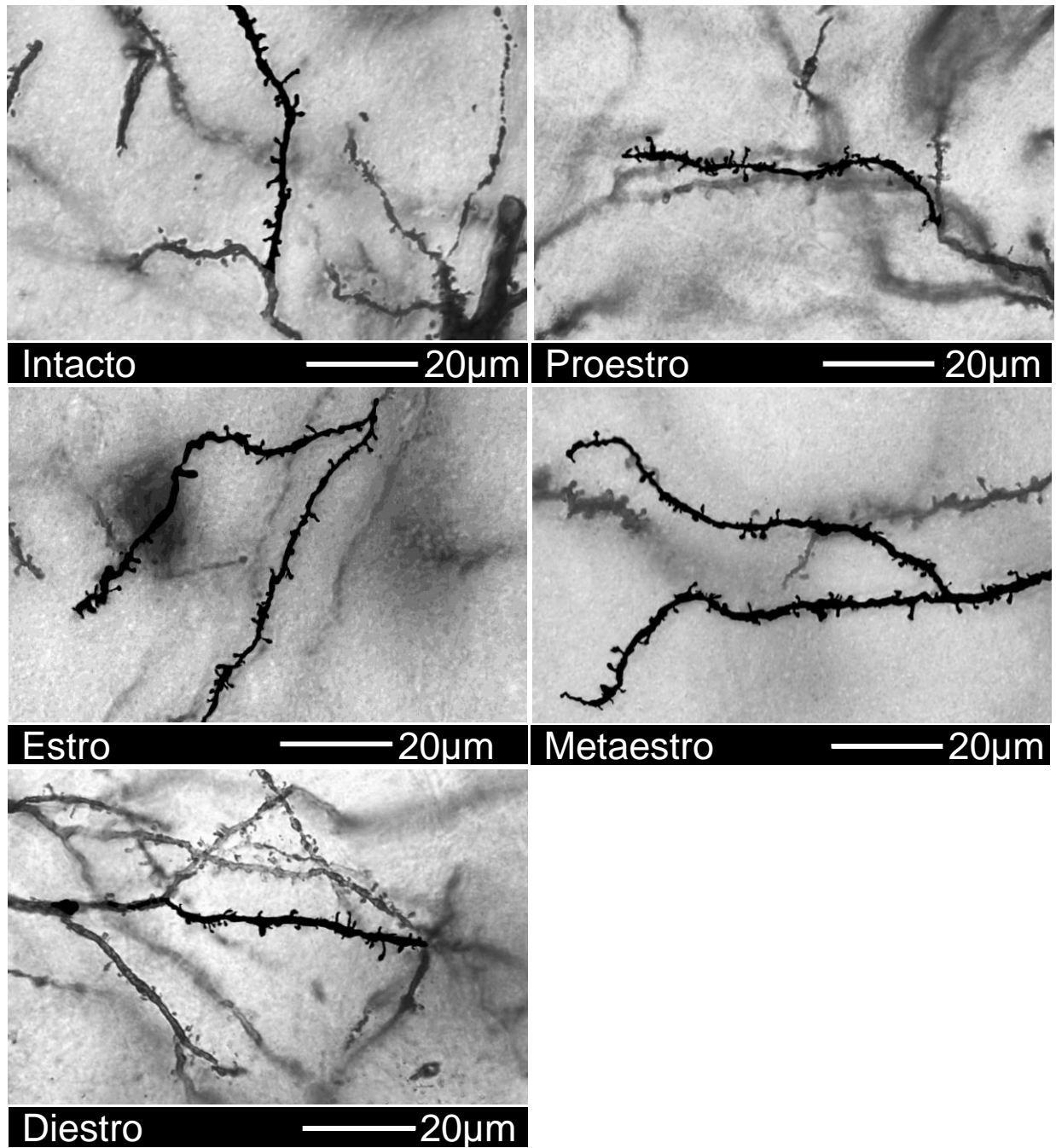
**Figura 20.** A. Micrografías de neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria a una amplificación de 400x, se observa claramente el soma de la neurona y los árboles apicales y basales B. Se observa en un corte coronal la ubicación de la corteza motora primaria tomada como referencia con base a los mapas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos & Watson, (1998); (Imagen tomada y modificada de Qian *et al.*, 2015).

En la Figura 21 y Figura 22 se muestran fotografías de segmentos dendríticos del árbol apical y basolateral respectivamente que permite visualizar las espinas dendríticas. Estas estructuras son pequeñas protusiones que se generan de la dendrita y que se expresan de manera de manera heterogénea en cuanto a tamaño y forma.



**Figura 21.** Micrografía de segmentos dendríticos apicales de neuronas piramidales de la corteza motora primaria capa V con espinas dendríticas (amplificación de 1000x).



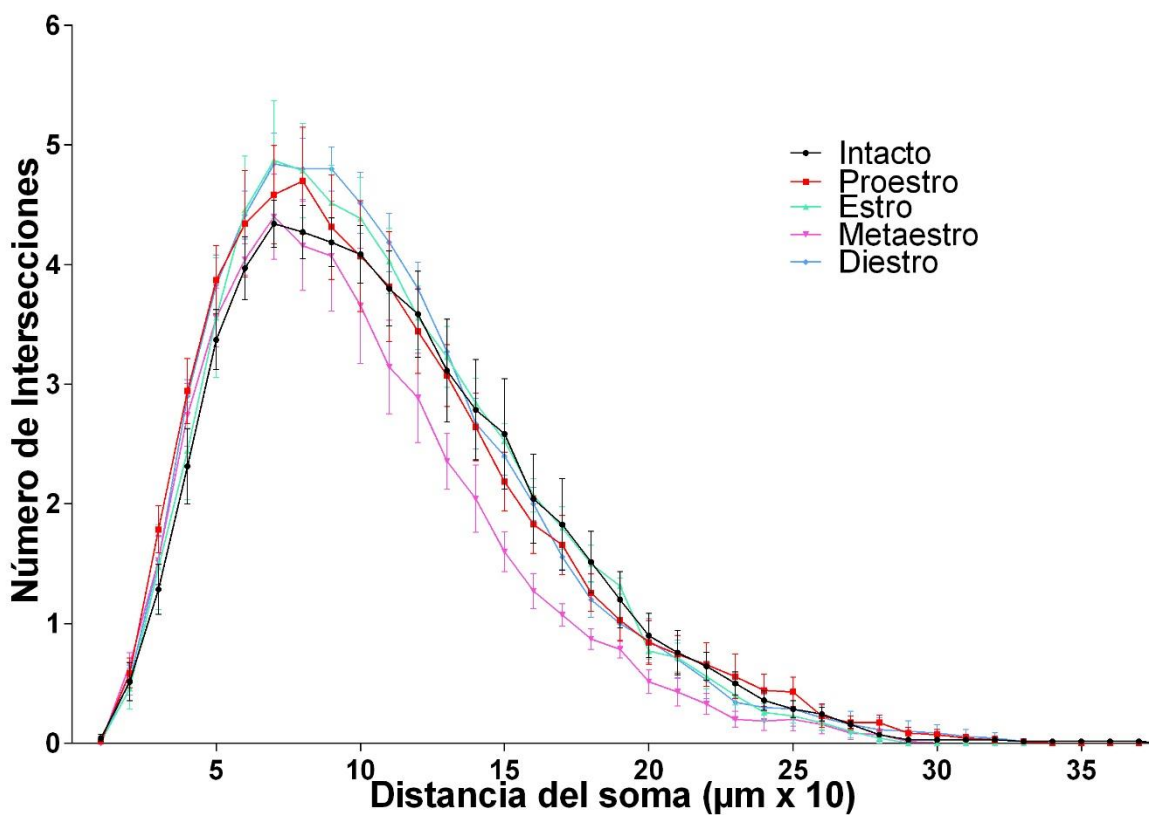


**Figura 22.** Micrografía de segmentos dendríticos basolaterales de neuronas piramidales de la corteza motora primaria capa V con espinas dendríticas (amplificación de 1000x).

#### 7.4 Arborización dendrítica total

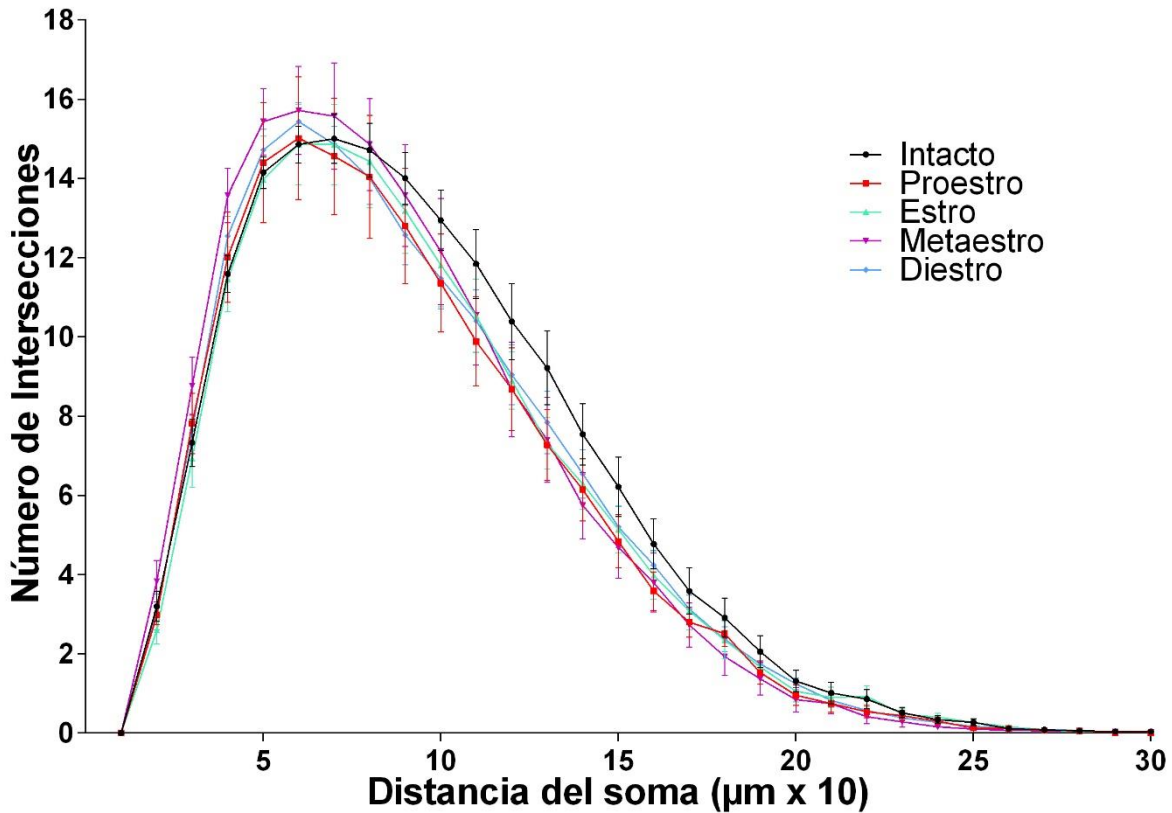
La arborización dendrítica se presenta como el número de intersecciones de dendritas que hay cada 10  $\mu\text{m}$  con respecto al soma de la neurona. La corteza motora primaria muestra que el mayor grado de arborización se presentó a la distancia de 50  $\mu\text{m}$  a 80  $\mu\text{m}$  del soma.

El número de intersecciones dendríticas en el árbol apical (Figura 23) no refleja diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratas que se encontraban en las diferentes etapas del ciclo estral ( $P=0.9892$ ;  $F=0.7559$ ).



**Figura 23.** Arborización dendrítica del árbol apical de neuronas de la corteza motora primaria (capa V) en las diferentes etapas del ciclo estral, y el grupo intacto  $n=7$ .

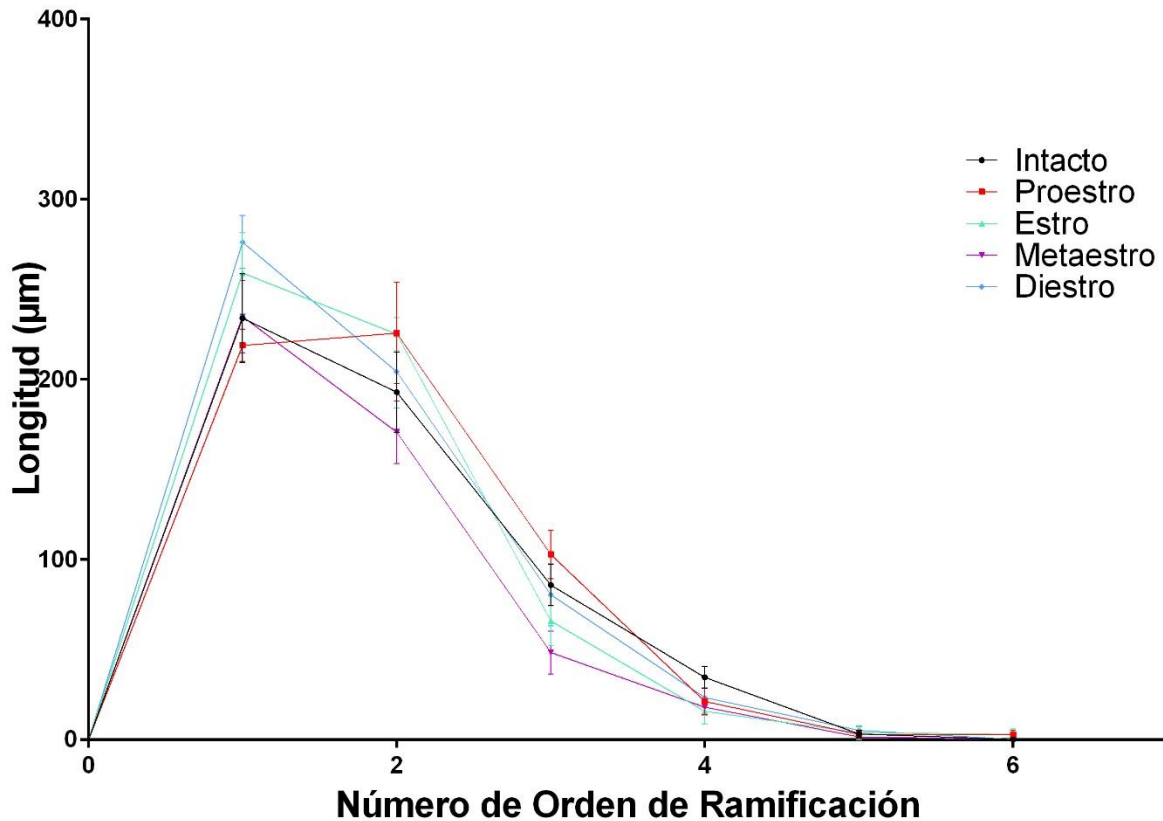
En cuanto al árbol dendrítico basolateral, el mayor grado de arborización fue a una distancia de 60  $\mu\text{m}$  a 80  $\mu\text{m}$  del soma; ninguno de los grupos de las diferentes etapas del ciclo estral presentaron diferencias significativas entre ellos o respecto del grupo intacto ( $P=0.9999$ ;  $F=0.4292$ ) (Figura 24).



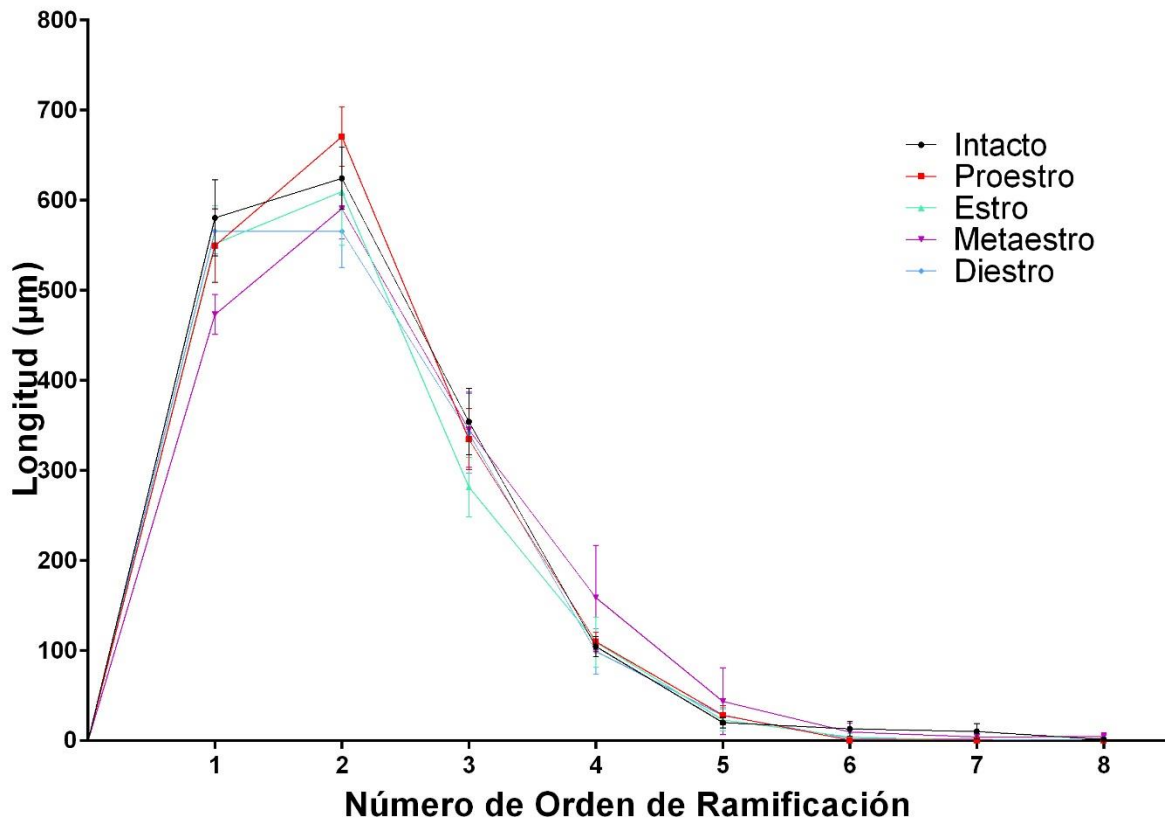
**Figura 24.** Arborización dendrítica del árbol basolateral de neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria de ratas hembra durante las diferentes etapas del ciclo estral y el grupo intacto,  $n=7$ .

### 7.5 Longitud dendrítica por orden de ramificación

La longitud dendrítica por orden de ramificación del árbol dendrítico apical ( $P=0.1230$ ;  $F=1.408$ ) (Figura 25) y basolateral ( $P=0.6624$ ;  $F=0.8672$ ) (Figura 26) no es diferente entre las etapas del ciclo estral ni respecto del grupo intacto



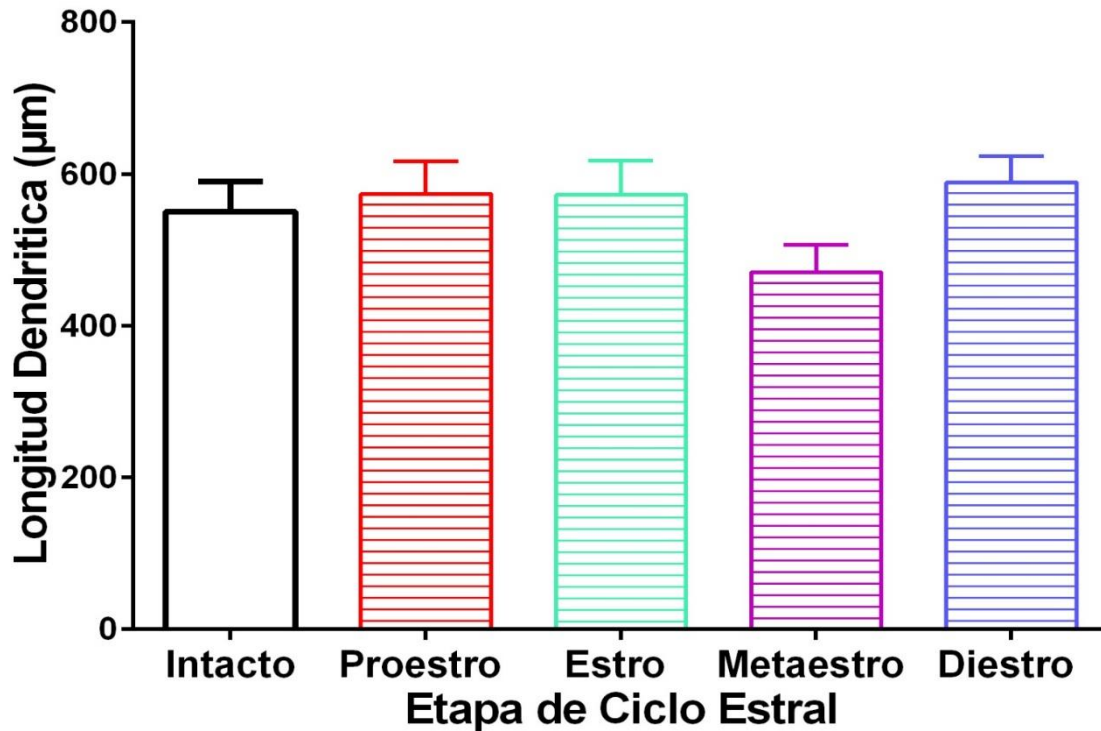
**Figura 25.** Longitud dendrítica apical por orden de ramificación de neuronas de la capa V de la corteza motora primaria de ratas durante las cuatro etapas del ciclo estral y el grupo intacto,  $n=7$ .



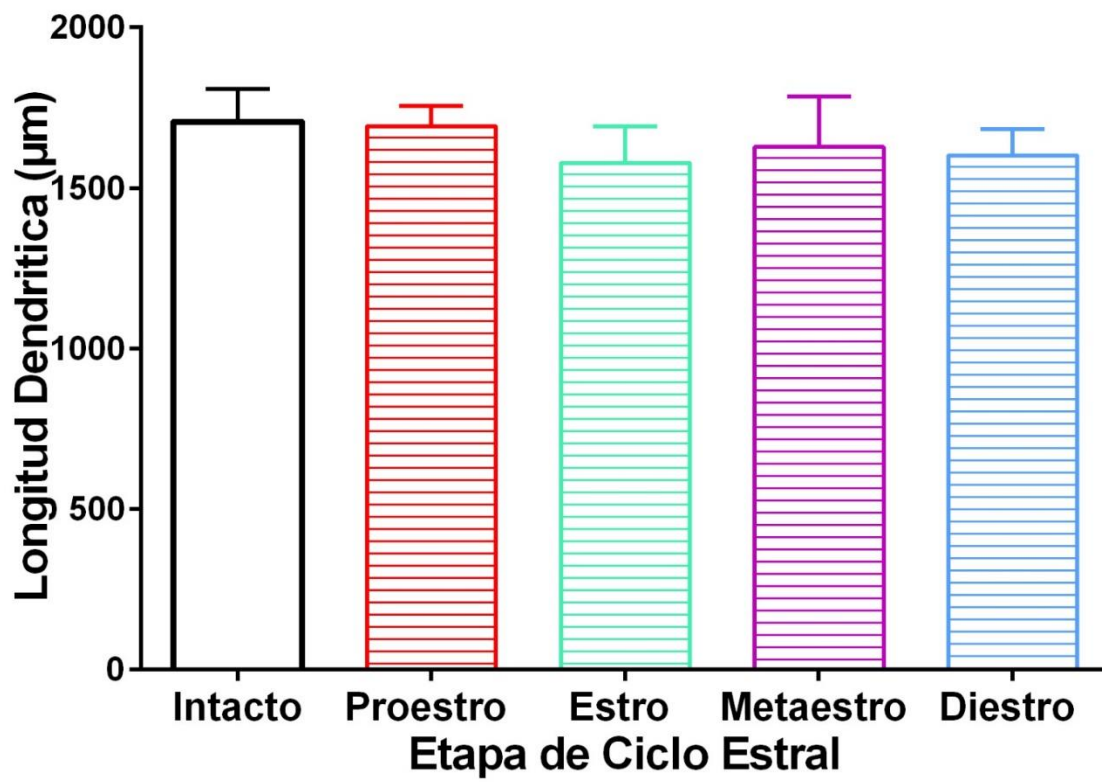
**Figura 26.** Longitud dendrítica por orden de ramificación del árbol basolateral de las neuronas de la corteza motora primaria (capa V) de ratas hembra en distintas etapas del ciclo estral y el grupo intacto, n=7.

## 7.6 Longitud dendrítica total

En cuanto a la longitud dendrítica total de los arboles apicales ( $P=0.2569$ ;  $F=1.403$ ) (Figura 27) y basales ( $P=0.8947$ ;  $F=0.2705$ ) (Figura 28) no se presentaron diferencias entre las etapas del ciclo estral ni respecto del grupo intacto.



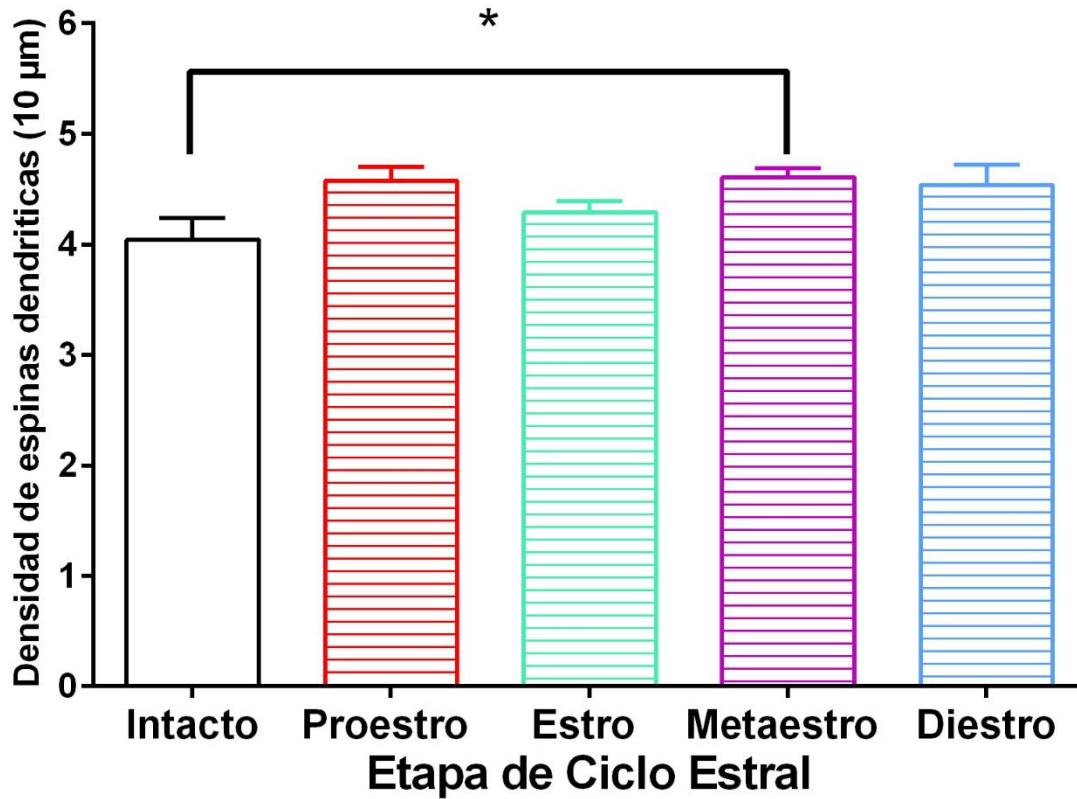
**Figura 27.** Longitud dendrítica total del árbol apical de neuronas de la capa V de corteza motora primaria en las diferentes etapas del ciclo estral y el grupo intacto,  $n=7$ .



**Figura 28.** Longitud dendrítica total del árbol basal de neuronas de corteza motora primaria de la capa V en las diferentes etapas del ciclo estral y el grupo intacto, n=7.

## 7.7 Densidad de espinas dendríticas

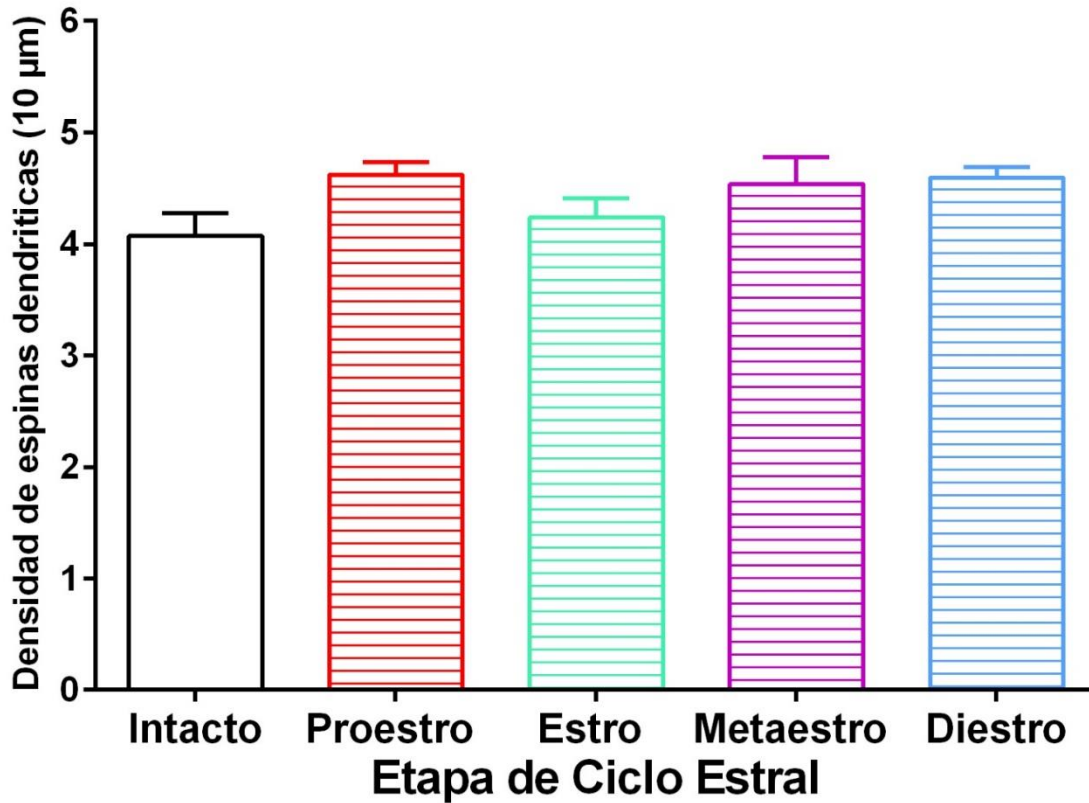
El grupo de individuos que se encontraban en la etapa de metaestro previo al sacrificio mostró un incremento significativo en la densidad de espinas en el árbol apical respecto del grupo intacto ( $P=0.0428$   $F=2.814$ ) (Figura 29).



**Figura 29.** Densidad de espinas dendríticas del árbol apical de las neuronas de la corteza motora primaria (capa V) de ratas hembra en las diferentes etapas del ciclo estral y el grupo intacto,  $n=7$ .



Mientras que el número de espinas dendríticas del árbol basolateral no varió entre las etapas del ciclo estral ni respecto del grupo intacto ( $P=0.1215$ ;  $F=1.990$ ) (Figura 30).



**Figura 30.** Densidad de espinas dendríticas del árbol basal de las neuronas de la corteza motora primaria (capa V) de ratas hembra en las diferentes etapas del ciclo estral y el grupo intacto,  $n=7$ .

## 8. Discusión

Los resultados del presente proyecto muestran que la actividad locomotora en ratas hembra no varió con respecto a las etapas del ciclo estral; así mismo se mostró un incremento de espinas dendríticas en el árbol apical en ratas que se encontraban en la etapa de metaestro sin variación en la longitud dendrítica en ninguna de las etapas del ciclo estral.

### 8.1 Actividad locomotora

La distancia recorrida por las ratas hembras corresponde con lo reportado por Tropp y Markus (2001) quienes demostraron que las ratas hembras recorren una mayor distancia en comparación con las ratas macho. Blizard *et al.* (1975) sugieren que la diferencia en la actividad locomotora en campo abierto entre ratas hembras y machos se debe a la influencia de la testosterona y de las hormonas ováricas respectivamente. Sin embargo, la actividad locomotora de la rata hembra Long Evans no varió a lo largo del ciclo estral, es decir, las ratas recorrieron la misma distancia indistintamente de la etapa del ciclo estral en la que se encontraban al momento de la prueba, por lo que nuestros resultados sugieren que las fluctuaciones hormonales durante el ciclo estral no tienen un efecto en la actividad motora de las ratas Long Evans.

Sin embargo, la actividad locomotora puede estar influenciada por otras variables como la luz, ya que Cheung & McCormack (1983) y Alstott & Timberlake (2009) demostraron variaciones en la actividad locomotora ante la exposición a ambientes luminosos y ambientes sin luz.

Por otro lado, existe neuromodulación de la corteza motora por parte de neurotransmisores como la dopamina y la serotonina que a su vez son influenciados por la presencia de la progesterona y de los esteroides (Aloisi & Bonifazi, 2006). En particular la progesterona actúa a través de receptores específicos de membrana asociados a proteínas G entre los cuales se encuentran los receptores denominados mPR $\alpha$ , mPR $\beta$  y mPR $\gamma$  (mPR= receptores de progesterona). La corteza cerebral y el hipocampo expresan específicamente el receptor mPR $\beta$  el cual ha sido implicado en el control motor, así como en el aumento de la producción de progesterona durante la etapa de proestro, sin

embargo nuestros resultados sugieren que esta hormona no participa en la regulación de la actividad locomotora (Zuloaga *et al.*, 2012).

## **8.2 Morfología dendrítica y el ciclo estral**

La manipulación de los organismos para determinar en qué etapa del ciclo estral se encuentran, puede influir en la expresión de la conducta y la fisiología del organismo, debido a que este tipo de manipulaciones pueden provocar pseudopreñación o incluso estro continuo (McLean *et al.*, 2012; Banik & Ketchel, 1965), por lo que el uso de ratas ovariectomizadas con remplazo hormonal es frecuente, no obstante esa condición no refleja una influencia hormonal natural. Por esta razón decidimos monitorear únicamente un ciclo estral para evitar una posible plasticidad neuronal por sobrestimulación vaginal.

De manera opuesta a Mendoza *et al.*, (2018) quienes encontraron cambios en la longitud dendrítica de neuronas de hipocampo de ratas que se encontraban en la etapa de metaestro, en este estudio no observamos variaciones en la longitud dendrítica de neuronas de corteza motora primaria pero sí observamos un incremento en la densidad de espinas dendríticas durante esa etapa. Al respecto existe una gran variabilidad de resultados sobre remodelación dendrítica por efecto de las hormonas sexuales.

Andrade *et al.* (2000) 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 la fase de proestro la densidad de espinas dendríticas es alta, y durante la fase de estro es baja. Estos resultados son similares a los encontrados previamente por Gould *et al.* (1990) y Woolley *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. Además, se ha sugerido que la progesterona tiene un efecto bifásico sobre la densidad de espinas dendríticas pues el tratamiento con progesterona después del tratamiento de estradiol promueve un incremento en la densidad de espinas dendríticas por un periodo de 2 a 6 horas y posteriormente un decremento (Chen *et al.*, 2009).

La progesterona presenta un segundo pico de liberación en la etapa de metaestro, por lo que es posible que el aumento en la densidad de espinas dendríticas observado

en la corteza motora se deba en parte a la actividad de esta hormona, ya que también se han encontrado receptores a estrógenos  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  en la corteza cerebral específicamente en la capa V y VI y en el núcleo ventral lateral tálamico. Este último modula el flujo de información a las áreas motoras corticales durante el desarrollo motor (Zuloaga *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2002).

Previamente se mencionó que Mendoza *et al.*, (2018) encontró un incremento en la longitud dendrítica de neuronas CA1 y CA3 de hipocampo de ratas que se encontraban específicamente en la etapa de metaestro; de acuerdo a esto y con el conocimiento que se tiene de que hipocampo proyecta información a la corteza cerebral, es posible que las neuronas de la corteza motora primaria respondan ante ese incremento en la longitud dendrítica de neuronas de hipocampo con un incremento en la expresión de espinas dendríticas.

El aumento en la densidad de espinas dendríticas específicamente en el árbol apical de las neuronas puede ser debido también a la posición de dicho árbol en comparación al resto de la neurona y al procesamiento diferenciado de la información entre el árbol apical y el basal (Moench & Wellman, 2017).

Kolb *et al.* (1998) sugieren que los cambios que ocurren en la morfología neuronal pueden ser completamente independientes, la elongación o la retracción dendrítica no se presentan necesariamente con un incremento o una disminución en la densidad de espinas dendríticas, respectivamente, y por tanto las neuronas responden a los estímulos de manera diferencial, fenómeno que observamos con nuestros resultados.

Otras estructuras como la corteza prefrontal han mostrado cambios en la densidad de espinas dendríticas por efecto de las hormonas sexuales durante la pubertad tanto en hembras como en machos (Koss *et al.*, 2014). A través de estudios con benzoato de estradiol se ha observado la maduración de espinas dendríticas, es decir, las estructuras semejantes a filopodios largos y delgados cambian su forma a estructuras con cuello y cabeza bien definidos (espinas en forma de hongo) (Li *et al.*, 2004). Estos cambios se deben a que los estrógenos tienen un gran efecto en la actividad y expresión de

espinofilinas, proteínas que contribuyen a la actividad del citoesqueleto (Mendoza *et al.*, 2018) y se presentan en periodos de minutos a horas (Sala *et al.*, 2008).

Además, la plasticidad de espinas dendríticas puede ser moldeada por diversos factores como la actina que es regulada por GTPasas de la familia Rho y de receptores AMPA que promueven la formación de espinas dendríticas mediante su activación al producir un incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  de neuronas del hipocampo. También los receptores NMDA que son regulados por estrógenos se han relacionado con el aumento en el tamaño y la densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales de hipocampo (Ethell & Pasquale, 2005).

Cabe mencionar que la corteza motora primaria es la zona con mayor injerencia en la integración de información para el movimiento voluntario en la vía corticoespinal y que nuestros resultados sugieren que esta corteza es poco influenciada por hormonas como la progesterona y el estradiol, sin embargo estudios específicos para determinar la presencia de receptores a estrógenos a estradiol y a otras hormonas son necesarios.

Nuestra perspectiva inmediata es determinar el tipo de espinas dendríticas que se expresan en la corteza motora primaria durante la etapa de metaestro y obtener información respecto de un posible cambio en la actividad de los circuitos neurales entre hipocampo y corteza motora primaria.

## **9. Conclusión**

Las ratas hembra Long Evans expresan el mismo nivel de actividad locomotora en campo abierto a lo largo del ciclo estral. Además la corteza motora primaria expresa una densidad de espinas dendríticas apicales mayor en la etapa de metaestro sin variaciones en la longitud de los arboles dendríticos.

## 10. Bibliografía

Afifi, A. K., Bergman, R. A., & Orizaga Samperio, J. (2006). Vías sensoriales y motoras mayores. En: Neuroanatomía funcional: texto y atlas. (2ed.). México: McGraw-Hill Interamericana pp. 389-397.

Aloisi, A. M., & Bonifazi, M. (2006). Sex hormones, central nervous system and pain. *Hormones and behavior*, 50(1), 1-7.

Alstott, J., & Timberlake, W. (2009). Effects of rat sex differences and lighting on locomotor exploration of a circular open field with free-standing central corners and without peripheral wall behavioural. *Brain Research*, 196(2), 214-219.

Andrade, J. P., Madeira, M. D., & Paula-Barbosa, M. M. (2000). Sexual dimorphism in the subiculum of the rat hippocampal formation. *Brain Reserch*, 875(1-2), 125-137.

Antúnez, L. L. (1979). Sistemas, estructuras y células que componen nuestro sistema nervioso. En: Anatomía funcional del sistema nervioso. (1ed.). México: Limusa SA De CV. pp. 55-81.

Anzalone, C. R., Hong, L. S., Lu, J. K., & LaPolt, P. S. (2001). Influences of age and ovarian follicular reserve on estrous cycle patterns, ovulation, and hormone secretion in the Long-Evans rat. *Biology of reproduction*, 64(4), 1056-1062.

Bale, T. L., & Epperson, C. N. (2017). Sex as a biological variable: who, what, when, why, and how. *Neuropsychopharmacology*, 42(2), 386-396.

Banik, U. K., & Ketchel, M. M. (1965). Hormonal induction of pseudopregnancy in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 10(1), 85-91.

Bean, L. A., Ianov, L., & Foster, T. C. (2014). Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *The Neuroscientist*, 20(5), 534-545.

Blizard, D. A., Lippman, H. R., & Chen, J. J. (1975). Sex differences in open-field behavior in the rat: the inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiology & Behavior*, 14(5), 601-608

Braak, H., & Braak, E. (1976). The pyramidal cells of Betz within the cingulate and precentral gigantopyramidal field in the human brain. *Cell and Tissue Research*, 172(1), 103-119.

Brusco, J., Wittmann, R., de Azevedo, M. S., Lucion, A. B., Franci, C. R., Giovenardi, M., & 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.

Calizo C. L., & Flanagan L.C. (2000). Estrogen selectively regulates spine density within the dendritic arbor of rat ventromedial hypothalamic neurons. *Journal of Neuroscience*, 20 (4) 1589-1596.

Canty, A. J., & Murphy, M. (2008). Molecular mechanisms of axon guidance in the developing corticospinal tract. *Progress in neurobiology*, 85(2), 214-235.

Carlson N.R. (2013). Neurotransmitters and Neuromodulators. En: *Physiology of Behavior*. (11 ed.) Massachusetts. Estados Unidos de America: Pearson pp. 110-130.

Chen, J. R., Yan, Y. T., Wang, T. J., Chen, L. J., Wang, Y. J., & 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.

Cheung, P. W., & McCormack, C. E. (1983). Splitting of the locomotor activity rhythm in rats by exposure to continuous light. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 244(4), R573-R576.

Coleman, P. D., & Riesen, A. H. (1968). Environmental effects on cortical dendritic fields. I. Rearing in the dark. *Journal of Anatomy*, 102(3), 363–374.

Cora, M. C., Kooistra, L., & 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.

Cuadrado, M. L., Arias, J. A., Palomar, M. A., & Linares, R. (2001). La vía piramidal: nuevas trayectorias. *Revista de Neurología*, 32(12), 1151-8.

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

Flores R. M., & Martínez M. L. (2012). Perimenopausia y trastornos afectivos: aspectos básicos y clínicos. *Salud Mental*, 35(3), 231-239.

Flores S. A. G., Zaldívar R. J., Salgado B. H., & Pineda C. J. C. (2014). La respuesta locomotora al ambiente novedoso en el corredor circular predice cambios de los índices depresivos y antidepresivos durante la prueba de nado forzado en ratas Wistar hembras. *Revista Biomédica*, 25, 3-15.

Frankfurt, M., & Luine, V. (2015). The evolving role of dendritic spines and memory: interaction (s) with estradiol. *Hormones and Behavior*, 74, 28-36.

García-Porrero, P. J. A., & Hürle, G. J. M. (2015). Sistemas de acción o motores. En: *Neuroanatomía Humana*. (1 ed.). Madrid, España: Panamericana pp. 305-342.

García S. L., & Garau, A. (1978). Extraversión y deambulación de la rata en el campo abierto. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 10(2). 211-226.

Garey, L. J. (2006). Variations in cortical architectonics. En: *Broadmann's Localisation in the Cerebral Cortex*. (1 ed.). USA: Springer Science & Business Media pp. 181-194.

Gibb R. & Kolb B. (1998) A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 97(1). 1-4.

Goldman, J. M., Murr, A. S., & 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.

Gorny, G. (2018) Robinson Lab, Behavioral Neuroscience, Lab in the Department of Psychology. Michigan, Estados Unidos de América: M LSA Collage of literature, science and the arts, University of Michigan. Recuperado de <https://sites.lsa.umich.edu/terryrobinson/research-procedures/par1-pyramidal-cell/>.



Gould, E., Woolley, C. S., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *Journal of Neuroscience*, 10(4), 1286-1291.

Gouveia Jr, A., Afonseca, T. L., Maximino, C., Dominguez, R., & Morato, S. (2008). Influence of gender and estrous cycle in the forced swim test in rats. *Psychology & Neuroscience*, 1(2). 191-197.

Gómez, B. P., & Paniagua, M. V. (2002). Fisiología de la reproducción: Hormona liberadora de gonadotropinas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 45(6), 252-257.

Guáqueta, H. (2009). Ciclo estral: Fisiología Básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56(III), 163-183.

Gulley, J. M., Hoover, B. R., Larson, G. A., & Zahniser, N. R. (2003). Individual differences in cocaine-induced locomotor activity in rats: behavioral characteristics, cocaine pharmacokinetics, and the dopamine transporter. *Neuropsychopharmacology*, 28(12). 2089-2101.

Gutiérrez G. A. G., Contreras, C. M., & Díaz M. J. L. (2000). Cómo actúa la progesterona en el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*, 23(2), 42-48.

Hall D. A., Stanis J. J., Avila H. M., & Gulley J. M. (2008). A comparison of amphetamine-and methamphetamine-induced locomotor activity in rats: evidence for qualitative differences in behavior. *Psychopharmacology*, 195(4), 469-478.

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

Heape, W. (1900). The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrus" to menstruation. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 44, 1-70.

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

Ibáñez, M. I. R. & Ortet G. F. (1996). El estudio de la personalidad en animales: la deambulación/exploración del ratón en el campo abierto poco amenazador como análogo del rasgo humano búsqueda de sensaciones. Dialnet, Journades de Foment de la Investigació, Universitat Jaume, 2, 1-9.

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

Kiehn, O. (2016). Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(4), 224.

Klochkov, D. V., Alekhina, T. A., & Prokudina, O. I. (2011). Age-specific features of estrous cycles and folliculogenesis in GC female rats selected by catatonic reactivity. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 151(2), 219

Kolb, B., Forgie, M., Gibb, R., Gorny, G. & Rowntree, S. (1998) Age, experience and the changing brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 22(2), 143-159

Koss, W. A., Belden, C. E., Hristov, A. D., & Juraska, J. M. (2014). Dendritic remodeling in the adolescent medial prefrontal cortex and the basolateral amygdala of male and female rats. *Synapse*, 68(2), 61-72.

Leza, J. C., & Lorenzo, P. (2000). Efectos farmacológicos de los Cannabinoides. *Adicciones*, 12(5), 109-116.

Li, C., Brake, W. G., Romeo, R. D., Dunlop, J. C., Gordon, M., Buzescu, R., ... & 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.

López Moratalla, N., Errasti Alcalá, T., & Santiago, E. (2011). Estrógenos y desarrollo del cerebro femenino en la adolescencia: anticoncepción de emergencia. *Cuadernos de Bioética*, 22(2).

Ma L., Qiao Q., Tsai J. W., Yang G. L., W., & Gan W. B. (2016). Experience-dependent plasticity of dendritic spines of layer 2/3 pyramidal neurons in the mouse cortex. *Developmental Neurobiology*, 76(3), 277–286.

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(4A), 609-614.

Martin, J. R. (2003). Locomotor activity: a complex behavioural trait to unravel. *Behavioural Processes*, 64(2), 145-160.

Martin-Vazquez, G., Asabuki, T., Isomura, Y., & Fukai, T. (2018). Learning task-related activities from independent local-field-potential components across motor cortex layers. *Frontiers in Neuroscience*, 429(12), 1-16.

Matt, D. W., Sarver, P. L., & Lu, J. K. (1987). Relation of parity and estrous cyclicity to the biology of pregnancy in aging female rats. *Biology of reproduction*, 37(2), 421-430.

Matt, D. W., Lee, J., Sarver, P. L., Judd, H. L., & Lu, J. K. (1986). Chronological changes in fertility, fecundity and steroid hormone secretion during consecutive pregnancies in aging rats. *Biology of reproduction*, 34(3), 478-487.

Mayen D.R., Vázquez M. D. A., Zárraga G.N., Fragoso A. E. M., Pizarro R. M., Colín W. I., Guadarrama Z. S.E. & Martínez T. R. J., Ramírez E. M. & Vergara A. P. (2014). Correlación entre la densidad neuronal, locomoción y niveles de estradiol en presencia de un producto apícola en ratas posmenopáusicas. Sitio web: [https://www.researchgate.net/publication/272941968\\_CORRELACION\\_ENTRE\\_DENSIDAD\\_NEURONAL\\_LOCOMOCION\\_Y\\_NIVELES\\_DE ESTRADIOL\\_EN\\_PRESENCIA\\_DE\\_UN\\_PRODUCTO\\_APICOLA\\_EN\\_RATAS\\_POSMENOPAUSICAS](https://www.researchgate.net/publication/272941968_CORRELACION_ENTRE_DENSIDAD_NEURONAL_LOCOMOCION_Y_NIVELES_DE ESTRADIOL_EN_PRESENCIA_DE_UN_PRODUCTO_APICOLA_EN_RATAS_POSMENOPAUSICAS).

McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 67, 1-6.

Mendoza, A. L., Durán, D. A. B., & Gómez, A. B. S. (2018). Increased dendritic length in CA1 and CA3 hippocampal neurons during the metestrus phase in Wistar rats. *Brain Research*, 1682, 78-83.

Moench, K. M., & Wellman, C. L. (2017). Differential dendritic remodeling in prelimbic cortex of male and female rats during recovery from chronic stress. *Neuroscience*, 357, 145-159.

Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*.

Norris, D. O., & Carr, J. A. (2013). The endocrinology of mammalian reproduction. En: *Vertebrate endocrinology*. (5 ed.). USA. Academic Press pp. 317-374.

Okabe, S., Kim, H.D., Miwa, A., Kuriu, T., Okado, H., (1999). Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nature Neuroscience*. 2, 804–811.

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

Paxinos, G., & Watson C. (1998). En: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (4ed.). New York, USA. Academic Press.

Paxinos G. (1995). Organization of the Hypothalamus. En: *The rat nervous system*. (2ed.). San Diego, USA: Academic press pp. 284-288.

Picard, N., & Strick, P. L. (1996). Motor areas of the medial wall: a review of their location and functional activation. *Cerebral Cortex*, 6(3), 342-353.

Puelles, L. L., Martínez T. M., & Martínez P.S. (2008). Control motor cortical. En: *Neuroanatomía*. (1ed.). Madrid, España: Médica Panamericana pp.345-349.

Purves, D., Augustine, D., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J., & Williams, M. (2007). Control del tronco del encéfalo y la médula espinal por la neurona motora superior. En: *Neurociencia*. (3 ed.). Madrid, España: Panamericana pp. 433-458.

Qian, Y., Forssberg, H., & Hejtz, R. D. (2015). Motor skill learning is associated with phase-dependent modifications in the striatal cAMP/PKA/DARPP-32 signaling pathway in rodents. *PLoS One*, 10(10), e0140974.

Ramón, R.F., Mansilla O. A. & Rivera C. A. (s.f.). Neurofisiología, Organización corteza. Agosto 06, 2018, de Facultad de Medicina. UNAM. Estado de México, México  
Sitio web: <http://www.facmed.unam.mx/Libro-NeuroFisio/08b-CerebroOrg/CortezaOrg.html>

Rivara, C. B., Sherwood, C. C., Bouras, C., & Hof, P. R. (2003). Stereologic characterization and spatial distribution patterns of Betz cells in the human primary motor cortex. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 270(2), 137-151.

Rosell, P. R. (2004). Regulación neuroendocrina del ciclo estral en los animales domésticos. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 5(7), 1-25.

Saiki, A., Kimura, R., Samura, T., Fujiwara-Tsukamoto, Y., Sakai, Y., & Isomura, Y. (2014). Different modulation of common motor information in rat primary and secondary motor cortices. *PLoS one*, 9(6), e98662.

Sala, C., Cambianica, I., & Rossi, F. (2008). Molecular mechanisms of dendritic spine development and maintenance. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 68(2), 289.

Shepherd, G. M. (2003). The Neocortex. En: *The synaptic organization of the brain*.(5 ed.). New York, Estados Unidos de America: Oxford University Press pp. 478-557.

Sholl D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of Anatomy*. 87: 387-406.

Sepúlveda, A. M., Sabanero, L. M., Durán, C. E., Flores, V. L., Ramírez, E. J., & Solís, O. M. (2012). Ciclo estral del ratón hembra intacto y ovariectomizado. *Acta Universitaria*, 22 (2), 5-8.

Serradj, N., Agger, S. F., & Hollis II, E. R. (2017). Corticospinal circuit plasticity in motor rehabilitation from spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 652, 94-104.

Silverthorn, D. U. (2008). El sistema motor controla las eferencias desde el sistema nervioso central. En: *Fisiología Humana, un enfoque integrado*. (5ed.). Madrid, España: Médica Panamericana pp.308-314.

Tapia, C. R. J., & 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* (pp. 184-186). Springer, Berlin, Heidelberg.

Trans Cranial Technologies LTD. (2012). Cortical Functions Reference. Agosto 06, 2018, de Trans Cranial Technologies LTD. Sitio web: [https://thebrainstimulator.net/docs/external/Trans\\_Cranial\\_Technologies-cortical\\_functions\\_ref\\_v1\\_0.pdf](https://thebrainstimulator.net/docs/external/Trans_Cranial_Technologies-cortical_functions_ref_v1_0.pdf).

Tropp, J., & Markus, E. J. (2001). Sex differences in the dynamics of cue utilization and exploratory behavior. *Behavioural Brain Research*, 119(2), 143-154.

Ueno, T., Nishijima, H., Ueno, S., & Tomiyama, M. (2017). Spine enlargement of pyramidal tract-type neurons in the motor cortex of a rat model of levodopa-induced dyskinesia. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 206.

Urrego, D., Múnera, A., & Troncoso, J. (2011). Retracción a largo plazo del árbol dendrítico de neuronas piramidales córtico-faciales por lesiones periféricas del nervio facial. *Biomédica*, 31(4), 560-569.

Valle, F. P. (1970). Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. *The American Journal of Psychology*, 83(1), 103-111.

Valle, S. G., Vega, F. P., Marcos, J. L., Barreiro, B. H., Quispe, E. M., & Iglesias, Á. G. (2003). Variabilidad del ciclo menstrual en mujeres consumidoras habituales de cannabis. *Revista de Toxicología en Línea*, 34(1), 1-13.

Valverde, F. (2002). Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Revista de Neurología*, 34(8), 758-780.

Villanueva, E. L. A. (2016). Diferencias morfológicas de neuronas piramidales CA1 y CA3 de hipocampo dorsal de ratas juveniles sometidas a entrenamiento cognitivo. (Tesis de licenciatura). Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Vogelaar, C. F., & Estrada, V. (2016). Experimental Spinal Cord Injury Models in Rodents: Anatomical Correlations and Assessment of Motor Recovery. In *Recovery of Motor Function Following Spinal Cord Injury*. InTech.

Welniarz, Q., Dusart, I., Gallea, C., & Roze, E. (2015). One hand clapping: lateralization of motor control. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 75.

Westwood, F. R. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375-384.

Whitlock, J. R. (2017). Posterior parietal cortex. *Current Biology*, 27(14), R691-R695.

Woolley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 10(12), 4035-4039.

Zhang, J. Q., Cai, W. Q., Zhou, D. S., & Su, B. Y. (2002). Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. *Brain research*, 935(1-2), 73-80.

Zuloaga, D. G., Yahn, S. L., Pang, Y., Quihuis, A. M., Oyola, M. G., Reyna, A., & Mani, S. K. (2012). Distribution and estrogen regulation of membrane progesterone receptor- $\beta$  in the female rat brain. *Endocrinology*, 153(9), 4432-4443.