



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DEL 17B - ESTRADIOL EN LA PLASTICIDAD DE LAS FIBRAS
MUSGOSAS DEL HIPOCAMPO DORSAL DE LA RATA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
EURÍDICE PADILLA GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS
DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR
DRA. GINA LORENA QUIRARTE
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

JURIQUILLA, QUERÉTARO. NOVIEMBRE DEL 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a las siguientes instituciones y unidades por todo el apoyo necesario para la realización de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar el Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Neurobiología.

A las Unidades de Apoyo del Instituto de Neurobiología, Campus UNAM Juriquilla, Querétaro:

- Del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, por la asesoría de Zenaida Martínez Estrella responsable de servicios escolares.
- De Microscopía y Análisis de Imágenes. Por el apoyo Técnico a la I.Q. Lourdes Palma Tirado y la Ing. Nydia E. Hernández Ríos.
- De Enseñanza, a la M. en C. Leonor Casanova Rico y a la Sra. Ma. del Carmen Vázquez Rodríguez.
- De Computo, por la asistencia técnica de los Ingenieros en Sistemas: Ramón Martínez, Alberto Lara Ruvalcaba, Sandra Hernández García y Omar González Hernández.
- De Videoconferencia, por el apoyo técnico de la Lic. Lourdes Lara Ayala.
- Bioterio, por el manejo de animales al M.V.Z. José Martín García Servín y a la Dra. Alejandra Castilla León.

A las facilidades prestadas por el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y la Lic. Soledad Medina Aragón de la Biblioteca del Campus.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca otorgada para llevar a cabo mis estudios del Doctorado. Registro No. 215710.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por las Becas a través de los proyectos IN202809 y IN201613.

También quiero expresar mi mas profundo agradecimiento a

A la Dra. Sofia Y. Díaz Miranda. Por brindarme la oportunidad y la confianza de realizar este bonito proyecto, por mostrarme que se aprenden mas de los errores que de los aciertos y gracias también por enseñarme a hacer ciencia con toda la paciencia y el cariño que la caracterizan.

A la Dra. Carolina Escobar y Dra. Gina Quirarte quienes formaron parte de mi comité tutelar y cada semestre hicieron valiosas aportaciones para enriquecer este trabajo de investigación.

A las integrantes del jurado Dra. Gabriela Morali, Dra. Tere Morales, Dra. Selva Rivas y Dra. Araceli Díaz por la revisión del trabajo y atinadas sugerencias para mejorarlo.

Al Dr. Camilo Ríos, Dra. Araceli Díaz Ruíz, Dra. Francisca Pérez, Dr. Sergio Montes del Instituto de Neurología por todo el apoyo brindado y aportaciones para la realización de este proyecto de investigación.

A la M. en C. Azucena Ruth Vázquez por todo su apoyo técnico brindado en el laboratorio. Y también gracias por ser una luz en el camino cuando todo se puso oscuro.

A la técnico Dra. Cristina Medina Fragosos y MVZ. Norma Serafín López, M. en C. Gema Martínez Cabrera gracias por el apoyo técnico para la realización del trabajo

A los laboratoristas Lic. Verónica Tonánzin Pineda Martínez, Jorge Abraham Servín León y Ángel Méndez Olalde por toda la ayuda.

A todos los que son y han sido compañeros y amig@s del laboratorio C02 con quienes he compartido conocimientos y muchos agradables momentos plagados de innumerables risas, Vicente Beltrán, Irma González, Uriel León, Susana Castro, Paty de la Rosa, Jorge Servín, Laura Pinedo, Erika Orta, Martha Degollado, Alfonso Arrazola, Israel Poblano, Jesús Mancilla y Pascal Morin.

A mis queridas amigas y compañeras HM Ara, Dany, Eva Meny y Rebe por todo su apoyo y cariño, por todos esos jueves de tertulia y buenos momentos que hemos pasado juntas, gracias por ser amigas.

A Adriana Chaparro mi otra familia, te quiero.

Gracias ...

Por último quiero dar gracias, al modelo animal murino, pues son animales extraordinarios

Quiero dedicar esta tesis a las personas que mas quiero y que me han apoyado incondicionalmente que son mi familia.

Mis hermanos Eugenio y Fernando.

Mis sobrin@s Artemio, Totú, Naty, Amy y Mia.

A mi mami que amo mucho Luzmaría Gómez Oliver, simplemente sin ti nunca hubiera hecho tan buen logro, que en gran parte es tuyo también.

A Dante, Eugenia e Iñaki con mucho amor

ÍNDICE

ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
SUMMARY	XII
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
1. Formación hipocampal	3
1.1 Hipocampo o <i>Cornu Ammonis</i> (CA)	4
1.1.2 CA1-CA3	5
1.1.3 Giro Dentado	6
1.2 Circuito hipocampal	7
1.3. Neurogénesis	10
1.3.1 <i>La célula granular</i>	12
1.3.2 <i>Las Fibras Musgosas</i>	13
1.4 La célula piramidal	15
1.5 La célula musgosa	18
1.5.1 <i>Proyecciones de las fibras musgosas</i>	18
1.6 Interneuronas del giro dentado	19
1.6.1 <i>Células piramidales en canasta</i>	19
1.6.2 <i>Otras interneuronas</i>	20
2. Plasticidad	21
2.1 Plasticidad sináptica en la conexión FM-CA3 e interneuronas	22
2.2 Función del zinc en la LTP de las fibras musgosas	24
2.3 Plasticidad estructural	25
2.3.1 <i>El 17β - estradiol y la remodelación sináptica</i>	27
3. Estrógenos	28
3.1 Biosíntesis de los Estrógenos	29
3.2 Fisiología de la Reproducción	32
3.2.1 <i>Ciclo estral de la rata</i>	32
3.3 Efecto de los estrógenos en la plasticidad de la formación hipocampal	34
3.4 Mecanismos de acción	37
3.5 Relación del Oxido Nítrico con el hipocampo	39
3.6 Formación hipocampal, estrógenos y memoria	42

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
IV. HIPÓTESIS	45
V. OBJETIVO GENERAL	46
V.I Objetivos particulares	46
VI. MÉTODOS	47
VI.1 Sujetos	47
VI.2 Cirugía	47
VI.3 Desarrollo de los objetivos particulares	
VI.3.I Dosis	48
VI.3.2 Análisis de la actividad de la cNOSs	48
VI 3.3 Derterminación del zinc	48
VI.3.4 Área de las FM	48
VI.3.5 Análisis de la ultraestructura sináptica	48
VI.3.6 Suplementación de estrógenos	48
VI.4 Análisis estadístico	54
VII. RESULTADOS	52
VII.1 Análisis histológico en grupos con dosis diferentes de suplementación	54
VII.2. Efecto del 17β - estradiol en la actividad de la NOS constitutiva	55
VII.3 Análisis de la cantidad total de zinc en el hipocampo	56
VII.4 Análisis histológico	56
VII.5 Ultraestructura densidad sináptica	57
VII.6 Prueba de comportamiento en Ovx y OvxE (aprendizaje y memoria)	60
VIII. DISCUSIÓN	63
IX. CONCLUSIONES	70
X. BIBLIOGRAFIA	71
XI. ANEXO 1	94
XII. ANEXO 2	104
XIII. ANEXO 3	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la formación hipocampal	4
Figura 2. Esquemas de hipocampo	7
Figura 3. Circuito neural en el hipocampo del roedor	9
Figura 4. Corte coronal del hipocampo y giro dentado	10
Figura 5. Neurogénesis en el giro dentado adulto y sinaptogénesis	11
Figura 6. Esquema de giro dentado	12
Figura 7. Fotografías de células granulares en las tres capas de giro dentado	14
Figura 8. Dibujo de dos especializaciones sinápticas de las fibras musgosas FM	15
Figura 9. Dibujo en cámara lúcida de una neurona piramidal de CA3	16
Figura 10. Fotomicrografías electrónicas y reconstrucción tridimensional del complejo sináptico	17
Figura 11. Fotomicrografía de una célula musgosa (A) y su dibujo en cámara lúcida (B)	18
Figura 12. Localización de la célula piramidal en cesta (pbc) dentro del giro dentado	20
Figura 13. Dibujo de la región hilar mostrando los tipos de interneuronas del <i>hilus</i> en el giro dentado	21
Figura 14. Plasticidad estructural del hipocampo	28
Figura 15. Hormonas estrogénicas	29
Figura 16. Biosíntesis del estradiol desde el colesterol	31
Figura 17. Concentración en plasma de las hormonas de la reproducción	33
Figura 18. Electromicrografía del <i>stratum radiatum</i> de la región hipocámpal	35
Figura 19. Fluctuaciones cíclicas en la densidad y morfología de las espinas dendríticas a lo largo del ciclo estral en el CA1 del hipocampo	36
Figura 20. Mecanismos de acción entre la interacción de los estrógenos y el BDNF	39
Figura 21. Inmunohistoquímica de la nNOS en el Hipocampo	41
Figura 22. Corte coronal de hipocampo dorsal	50
Figura 23. Corte coronal representativo del HD	52

Figura 24. Esquema del laberinto acuático de Morris (LAM)	54
Figura 25. Área (Dosis)	55
Figura 26. Actividad de NOS dependiente de Ca^{2+}	56
Figura 27. Contenido total de zinc.	57
Figura 28. Área	58
Figura 29. Imágenes representativas del <i>Stratum lucidum (Sl)</i> de los diferentes grupos	59
Figura 30. Densidad sináptica	60
Figura 31. Fotomicrografías de imágenes representativas tomadas con el microscopio electrónico de transmisión	61
Figura 32. Aprendizaje	62
Figura 33. Memoria	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-ácido propionico
BDNF	Brain derived neurotrophic factor o factor neurotrófico derivado del cerebro
BFM	Botones gigantes de las fibras musgosas
CA1	Cornu Ammonis 1 ó campo CA1
CA2	Cornu Ammonis 2 ó campo CA2
CA3	Cornu Ammonis 3 ó campo CA3
CEL	Corteza entorrinal lateral
CEM	Corteza entorrinal medial
CP	Célula piramidal
CG	Célula granular
D	Diestro
E	Estrógenos
E ₂	17 β - estradiol
EA	Enfermedad de Alzheimer
ER	Receptores a estrógenos (α , β)
ERK	Extracellular signal-Regulated kinases
Es	Estro
FM	Fibras Musgosas
FH	Formación Hipocampal
FSH	Hormona Folículo Estimulante
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a la insulina
GABA	Ácido gamma amino butírico
CE	Corteza entorrinal
GD	Giro dentado
HD	Hipocampo Dorsal
LAM	Laberinto acuático de Morris
LH	Hormona luteinizante
LTP	Potenciación a largo plazo
MT	Metalotioneínas
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células.
NMDA	N-metil-D-aspartate
NO	Óxido nítrico (por sus siglas en inglés)
NT	Factor neurotrófico
Ovx	Ovariectomizado
OvxE	Ovariectomizado suplementado con 17 β - estradiol
P	Proestro
P ₄	Progesterona
PG	Ovariectomizado suplementado con progesterona y benzoato de estradiol
PRL	Prolactina
SL	<i>Stratum lucidum</i>
SNC	Sistema nervioso central
SLM	<i>Stratum lacunosum moleculare</i>
SO	<i>Stratum oriens</i>
SR	<i>Stratum radiatum</i>
SP	<i>Stratum pyramidale</i>
SUB	<i>Subiculum</i>

RESUMEN

El 17β - estradiol (E_2), es una hormona sexual con capacidad neuroprotectora, es capaz de modular la neurogénesis del giro dentado y la plasticidad de las espinas del área CA1 del hipocampo durante el ciclo estral de la hembra. El sistema de fibras musgosas (FM) es plástico en el cerebro del adulto y responde al aprendizaje, la memoria y estrés, pero no se conoce si el E_2 es capaz de modular la plasticidad anatómica y sináptica de las FM a través del ciclo estral. En 5 grupos de hembras entre 70 - 90 días de edad de la cepa Sprague-Dawley se estudió el efecto del E_2 en tres etapas del ciclo estral: diestro (D), proestro (P) y estro (Es) comparadas con grupos de ratas Ovariectomizadas (Ovx) y suplementadas con una dosis de 10 $\mu\text{g/K}$ de Benzoato de estradiol (OvxE). Se midió en el hipocampo: 1) la actividad de la NOS constitutiva dependiente de Ca^{2+} por conversión de la L-arginina en NO y L-citrulina, 2) la cantidad de zinc por espectrofotometría de absorción atómica, 3) el área de las FM en el *stratum lucidum* (SL) del CA3 (con la técnica del Timm) y 4) el número total de sinapsis en el SL en las etapas de P y Es comparados con los grupos Ovx y OxvE. Por otra parte, se midió el aprendizaje y la memoria espacial en dos grupos (Ovx y OxvE) con la prueba del laberinto acuático de Morris (LAM). Las comparaciones entre los grupos indican que en el hipocampo, tanto la actividad de la NOS, la cantidad en el contenido total de zinc ($\mu\text{g/g}$ de tejido) el área de las FM y el número de sinapsis se redujeron por falta de el E_2 en los grupos D, Es y Ovx y que la suplementación del E_2 en el grupo OxvE restituye los niveles semejantes al del grupo P. Por otro lado el grupo Ovx fue deficiente en la prueba del aprendizaje y memoria y el grupo OxvE tuvo un mejor desempeño. Estos resultados sugieren que el E_2 juega un rol importante en la neuroprotección y en el mantenimiento de la morfología, el contenido de zinc y en la conectividad sináptica del área de las FM del CA3 del hipocampo dorsal de la rata y está asociado con un mejor rendimiento en el aprendizaje y la memoria.

SUMMARY

17 β - estradiol (E₂) is a sex hormone with neuroprotective capacity, able to modulate dentate gyrus neurogenesis and spine plasticity on hippocampal CA1 area during the female estrous cycle. The mossy fiber system (MF) in the adult brain is plastic and responds to learning, memory and stress, but it is not known whether E₂ is able to modulate the anatomical and synaptic plasticity of MF through the estrous cycle. The effect of E₂ was studied in 5 groups of females 70-90 days old of the Sprague-Dawley strain at three stages of the estrous cycle: diestrus (D), proestrus (P) and estrus (Es), compared with ovariectomized rats (Ovx) and supplemented with 10 μ g / K estradiol Benzoate (OvxE). The following measurements were performed in the hippocampus: 1) NOS activity was assayed by measuring the conversion of L-arginine to NO and L-citrulline, 2) Zinc determination was assayed in an atomic absorption spectrophotometer, 3) the MF area of CA3 stratum lucidum (SL) was measured with the Timm's technique and 4) the total number of synapses in the SL in D, P, and Es stages compared with Ovx and OvxE groups. In addition, learning and memory were evaluated in a spatial task in the Morris water maze. Comparisons between groups indicate that hippocampal NOS activity, zinc determination (mg / g tissue) in the MF area and the number of synapses were reduced by the absence of E₂ in D, Es and Ovx groups, and was restored by supplementation in the OvxE group reaching the P group levels. Moreover the Ovx group performed deficiently in the learning and memory test and the OvxE group performed better. These results suggest that E₂ plays an important role in the neuroprotection and maintenance of morphology, the amount of zinc and synaptic connectivity, the MF to CA3 area of the dorsal hippocampus of the rat and is associated with better performance in learning and memory.

I. INTRODUCCIÓN

Se han demostrado los efectos no reproductivos del 17β - estradiol (E_2) en el sistema nervioso central (SNC) por su control en la actividad neuronal relacionada a procesos de cognición, la modulación del estado de ánimo, así como el mejoramiento del aprendizaje y la memoria. Se sabe que durante las fluctuaciones hormonales del ciclo menstrual de la mujer se presentan deficiencias cognitivas leves, como la dificultad para concentrarse y la disminución de la memoria verbal y conforme se van perdiendo los niveles de E_2 durante la premenopausia, estos síntomas se acentúan (Foy, 2001; Sherwin, 2009). Por lo que es relevante la terapia de reemplazo (neuroprotección) que se administra a mujeres mayores después de la menopausia. Además, esta terapia, puede retrasar o prevenir la aparición de las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y Alzheimer (Pike, et al., 2009). El E_2 tiene efectos directos en el sistema límbico, hipotálamo, hipófisis y la formación hipocampal (FH), que controla el estado de ánimo y la cognición y en donde se localizan receptores a estrógenos (ER por sus siglas en inglés). Parte de la FH es el hipocampo, una de las estructuras más estudiadas en el SNC por su organización celular (clara estratificación), además de ser el sitio anatómico en donde se consolida la memoria de corto a largo plazo y de tener una función importante en la memoria de tipo espacial (Moser & Moser, 1998). Se ha demostrado que el H conserva su plasticidad en el cerebro adulto por que responde de manera directa, a cambios en el medio ambiente, la edad, el aprendizaje, la memoria y las hormonas; entre éstas las sexuales como el E_2 . Este mecanismo plástico del hipocampo puede ser regulado a través de factores tróficos como es el BDNF (Brain derived neurotrophic factor) o por el óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés) el cual además de su papel como neurotransmisor y su relación con los estrógenos y las neurotrofinas en el hipocampo de los murinos, permite modular procesos de aprendizaje y memoria (Hu & Zhu, 2014; Maur et al., 2015). Los estrógenos también pueden producir cambios plásticos que se traducen en modificaciones en la estructura, distribución y número de sinapsis, lo que sugiere una relación entre los cambios bioquímicos, morfológicos y la formación de la memoria (Foy, 2001; Brinton, 2009). En la rata adulta, se han reportado cambios plásticos por la influencia de los estrógenos durante el ciclo estral y en ratas ovariectomizadas (Ovx) y suplementados con E_2 (Ovx E) en el campo CA1 y en el giro dentado (GD) del hipocampo dorsal (HD), pero hasta el momento hay poca información

sobre cambios plásticos morfológicos en el sistema de fibras musgosas (FM) del HD. La finalidad de este trabajo es determinar la influencia que tiene el E₂ en la organización anatómica y la conectividad sináptica de las FM durante las diferentes etapas del ciclo estral.

II. ANTECEDENTES

1. Formación hipocampal (FH) de la rata

La FH es parte del sistema límbico y de la arquicorteza, junto con el subículo y el giro dentado (GD), es una estructura pareada con dos mitades que son imágenes especulares en ambos hemisferios cerebrales. La invaginación del giro parahipocampal en el cuerno inferior del ventrículo lateral forma 3 regiones: el hipocampo propio, el giro dentado o área dentada y el subículo. La FH tiene una importancia primordial, pues es un centro de memoria y aprendizaje, siendo el hipocampo el sitio de regulación de la memoria de corto plazo y cuya alteración da inicio a la enfermedad de Alzheimer.

Anatómicamente la FH está constituida por una serie de estructuras conectadas entre sí a través de un patrón intrínseco, cada una tiene una organización citoarquitectónica especial que le atribuye diferentes funciones cognitivas. Entre las funciones complejas que le confieren son la navegación espacial (Gothard et al., 1996), el aprendizaje (Moser et al., 1993; Bunsey & Eichenbaum, 1996; Duva et al., 1997); la memoria episódica de corto plazo o memoria declarativa (Squire et al., 1993; Eichenbaum, 2001) y la elaboración de un mapa cognitivo de la experiencia del animal en un ambiente determinado (O'Keefe, 1990; Nadel, 1992). La FH, tanto en humanos como en primates, se localiza en la parte medial o interna del lóbulo temporal, bajo la superficie cortical, la forma de caballito de mar es típica de primates, pero en otros mamíferos tiene formas variadas. En otro contexto histórico se le comparó con un cuerno de carnero por los cuernos de la antigua deidad egipcia Ammón. En los roedores es una estructura en forma de "C" que se ubica en el diencéfalo mide aproximadamente 1.2 cm³ en la rata adulta y tiene una posición rostro caudal desde la altura de los polos septales siguiendo un eje caudo ventral hacia el lóbulo temporal, el polo septal esta localizado en la parte dorsal del encéfalo y es más anterior al resto del hipocampo y el polo temporal se localiza en la parte ventral y caudal del encéfalo (Scharfman & Myers, 2012) (Figura 1). La FH, se encuentra formada por las cortezas entorrinal (medial y lateral), perirrinal y parahipocampal, el complejo subicular (*subiculum, pre y parasubiculum*), y el propio hipocampo o Cornu Ammonis (CA) con sus cuatro campos en el humano y tres en la rata (CA 1-3) y el GD ver Figura 2 (Amaral et al., 2007).

1.1 Hipocampo o *Cornu Ammonis* (CA) de la rata

Desde hace más de 50 años que el hipocampo es motivo de estudio y el caso H.M. (Henry Molaison) dio gran información sobre su función, cuando fue sometido a la extracción del lóbulo temporal medial como tratamiento de una epilepsia intratable, H.M. perdió gran cantidad de memorias y fue incapaz de consolidar nuevas experiencias. Desde entonces y hasta ahora, la cantidad de información sobre el funcionamiento del hipocampo que tiene en los procesos cognitivos en humanos, primates y roedores como la rata ha sido enriquecedora (Scoville & Milner, 1957; Squire, 1992).

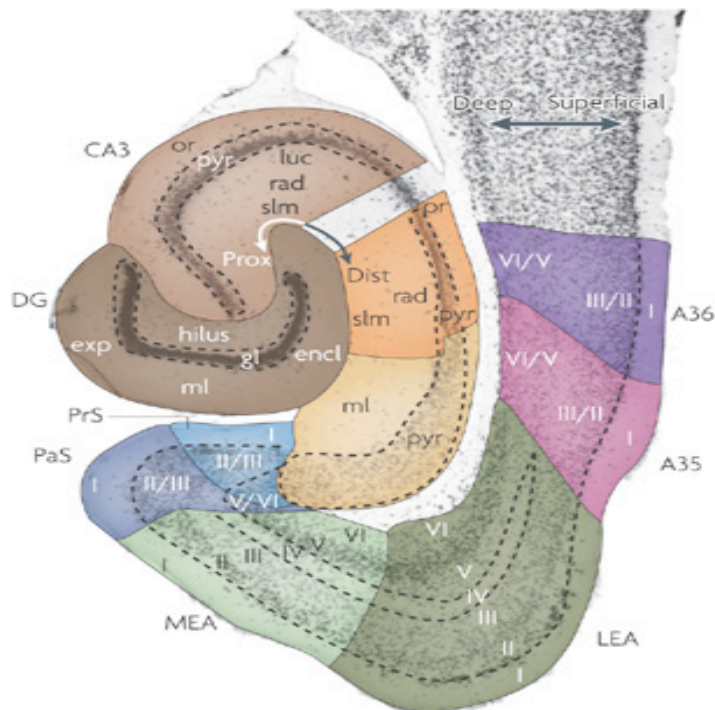


Figura 1. Esquema de la formación hipocampal. Los colores muestran las diferentes estructuras, giro dentado (DG; café oscuro), CA3 (café claro), CA1 (naranja). El complejo subicular se divide en subiculum (Sub; amarillo), presubiculum (PrS; azul claro) parasubiculum (PaS; azul oscuro). También se observa la corteza entorrinal lateral (LEA; verde oscuro) y la medial (MEA; verde claro), la corteza perrinal se observa en morado y rosa. Los números romanos (I-VI) corresponden a las capas de la corteza entorrinal (Esquema modificado de van Strien et al., 2009).

En la rata por ejemplo, se ha demostrado que el daño permanente, produce deficiencias cognitivas en memorias dependientes del hipocampo. Según Squire (1992) el hipocampo está implicado en la memoria declarativa y juega una función crucial en la

codificación y formación de memorias de tipo espacial, según el procesamiento mnemónico en la formación hipocampal solo es temporal y necesario para que las memorias sensoriales multimodales se almacenen en estructuras no hipocampales como la corteza prefrontal a través de la consolidación. Funcionalmente se le divide en tres compartimentos: ventral, intermedio y dorsal, el hipocampo ventral se relaciona con las emociones el estrés y el afecto, el hipocampo intermedio es una zona de transición donde se sobrelapan las regiones dorsal y ventral. El hipocampo dorsal desempeña funciones cognitivas que se relacionan con el procesamiento de información (Fanselow & Dong 2009).

La disposición en la citoarquitectura del hipocampo hace que su estudio sea específico, en la rata los estratos principales y las regiones anatómicas neuronales se definen por sus conexiones específicas, las que se distribuyen en tres grandes regiones o áreas; el regio superior que corresponde al campo CA1; el regio inferior (campos CA2 y CA3) y el giro dentado (GD) con el *hilus*. En el humano, el mayor tamaño corresponde al área CA1, que está entre el subículo y el hipocampo propiamente tal. Tiene relevancia por se sensible a la hipoxia (producida por aterosclerosis), siendo ésta una causa de la demencia senil, por la disminución de la irrigación de las neuronas que están comprometidas en el control de la memoria a corto plazo.

1.1.2 CA1-CA3

En los dos regios (superior CA1 e inferior CA3) se localiza la capa celular principal, el *stratum pyramidale (SP)*, conformada por los somas de las células piramidales (CP), las células en el CA3 se encuentran poco más separadas que en el CA1, que está constituido por CP grandes y pequeñas y de acuerdo a su tamaño, se organizan en tres capas; la más superior es densa, otra de menor tamaño y una capa de mayor tamaño aunque menos densa ubicada en el nivel más abajo, solamente las neuronas de este estrato envían sus prolongaciones fuera del hipocampo y son las únicas que responden a los estímulos que llegan al hipocampo; además, sus axones van a constituir el *alveus* y la fimbria, por lo tanto la CP es una neurona principal, extrínseca o de proyección, Golgi tipo II. El CA2 es menos marcado y presenta dos capas de células piramidales. Las CP del CA3, presentan un claro árbol dendrítico, dirigido hacia el GD, sus dendritas presentan numerosas espinas y las

cercanas al soma se modifican como excrescencias espinosas, de mayor tamaño e inervadas por las FM, sus axones forman las colaterales de Shaffer que inervan a las CP del CA1.

En la organización laminar del campo CA3, además del estrato piramidal (somas), se localiza el molecular (dendritas apicales y las excrescencias espinosas) y el polimorfo o *stratum oriens (SO)* que contiene varias clases de interneuronas y las dendritas basales de las CP, así como las conexiones de asociación y las conexiones del CA3 al CA1 (colaterales de Schaffer), es la zona más superficial y está constituida por neuronas de diferentes formas y tamaños, tiene neuronas intrínsecas o Golgi tipo I porque sus axones no salen del hipocampo, se arborizan alrededor de las CP del segundo estrato, formándoles una especie de canasta alrededor, cuya función es liberar al neurotransmisor inhibitorio el ácido gamma amino butírico (GABA), son controladoras de las CP inhibiéndolas, cada célula GABA se relaciona con 200 a 500 CP. Solo en el campo CA3 hay una zona acelular, el *stratum lucidum (SL)*, localizado justo por arriba de la capa de CP y a está llegan las FM. En el CA1, el estrato molecular se distingue como *stratum radiatum (SR)* corresponde a la región suprapiramidal en donde se encuentran localizadas las conexiones entre los dos hipocampos de asociación y las conexiones a los campos CA3 y CA1 que son las colaterales de Schaffer y la capa más superficial, el *stratum lacunosum-moleculare (SLM)* es en donde las fibras de la corteza entorrinal terminan (patrón perforante), además de las conexiones aferentes de otras regiones como el núcleo *reuniens* de la línea media del tálamo que hace sinapsis tanto con el *SR* como en el *SLM* y ambos *strata*, contienen una amplia variedad de neuronas (Amaral et al., 2007)

1.1.3 Giro Dentado

El área dentada o GD en el humano, corresponde a la sustancia gris de la arquicorteza que se extiende hacia atrás, formando la *fasciola cinerea* (giro fasciolar) y luego el inducio gris sobre el cuerpo calloso. Es una estructura común a todos los mamíferos, como parte de la FH recibe información de la corteza entorrinal la cual procesa y detecta la información de las experiencias nuevas de las ya almacenadas para transmitir las al campo CA3 del hipocampo (Bischofberger et al., 2006; Treves et al., 2008). El GD, tiene una organización laminar de tres capas: molecular, granular y polimórfica (Figura 4), la más externa es la

molecular y en la rata mide aproximadamente 250 μm de ancho y está formada por dendritas terminales de las células granulares (DG), fibras del patrón perforante que se originan en la corteza entorrinal, interneuronas y terminaciones de conexiones extrínsecas. La capa principal intermedia esta compuesta por 4-8 capas de CG. En la capa granular también se localizan interneuronas del tipo de CP en canasta cerca del borde del *hilus*. La última capa es la polimórfica en ésta se encuentran varios tipos celulares, la más predominante es la célula musgosa (Amaral et al., 2007). El GD es una estructura capaz de formar neuronas nuevas en el adulto, proceso llamado “neurogénesis”.

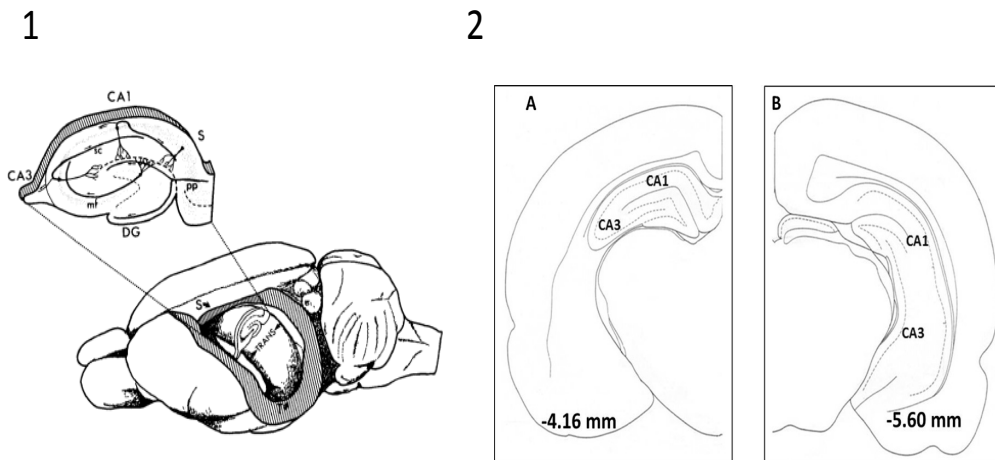


Figura 2. Esquemas del hipocampo. Se muestra en 1, la posición y forma del hipocampo en el cerebro de la rata, con los elementos neuronales principales y sus conexiones intrínsecas en la formación hipocampal. Abreviaciones. Campos hipocampales principales (CA1, CA3), giro dentado (DG), subículo (S), fibras musgosa (mf), colaterales de Schaffer (sc), patrón perforante (pp). (Andersen et al, 2004). En 2 se muestran de secciones coronales de hipocampo dorsal (A) y ventral (B) indicando las áreas CA1 y CA3 y su correspondiente límite en Bregma (Esquema modificado de Paxinos & Watson, 1982).

1.2 Circuito hipocampal

Los mecanismos por los cuales el sistema hipocampal media las diferentes funciones en la memoria depende de la información guardada y el flujo de información fuera y a través del sistema. La representación clásica de la organización en el sistema de memoria hipocampal es referido como el “circuito trisináptico” el primer punto empieza en la corteza entorrinal

(CE) y termina en el giro dentado (GD). El segundo se origina en las células granulares del GD y termina en las CP del CA3, el tercero ocurre entre las CP del CA3 y las CP del CA1 (Figura 3). Esto es un esquema simplificado de lo que realmente está ocurriendo (Naber et al., 2000) ya que solo se toman en cuenta las sinapsis glutamatérgicas excitatorias principales. Así a esta vía trisináptica clásica se le deben adicionar otras conexiones como las de las células musgosas a las células granulares y por otra parte las de las interneuronas o de las mismas conexiones excitatorias recurrentes de las CP del CA3. También las dos proyecciones de la corteza entorrinal, ambas referidas como vías del patrón perforante el cual proyecta a todos los campos del hipocampo y el subículo (SUB). Las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal proyectan al GD y al CA3 en contraste con las células de la capa III que proyectan directamente al área CA1 y al SUB. Estos dos componentes de la vía perforante se originan de la corteza entorrinal lateral (CEL) o de la corteza entorrinal medial (CEM), respectivamente. Se ha sugerido que las dos vías transmiten diferentes tipos de información (Menaughton, 1980; Colino & Malenka, 1993) La CEL procesa información no espacial como objetos y olores y la CEM información espacial (Witter et al., 1989; Hargreaves et al., 2013). La diferencia entre las dos vías DG/CA3 y CA1/SUB es más funcional. Hay una vía larga polisináptica que atraviesa todo el hipocampo (EC/DG/CA3/CA1/SUB) la otra ruta representa una vía corta monosináptica que empieza en la CE y termina directamente en el CA1/SUB (CE \Rightarrow SUB). Las dos vías funcionan independientes una de la otra sin embargo; una puede modular la otra. El SUB es el último relevo en el hipocampo y da lugar a las conexiones de salida hacia el área septal, núcleo accumbens e hipotálamo entre otras áreas (Naber et al., 2000).

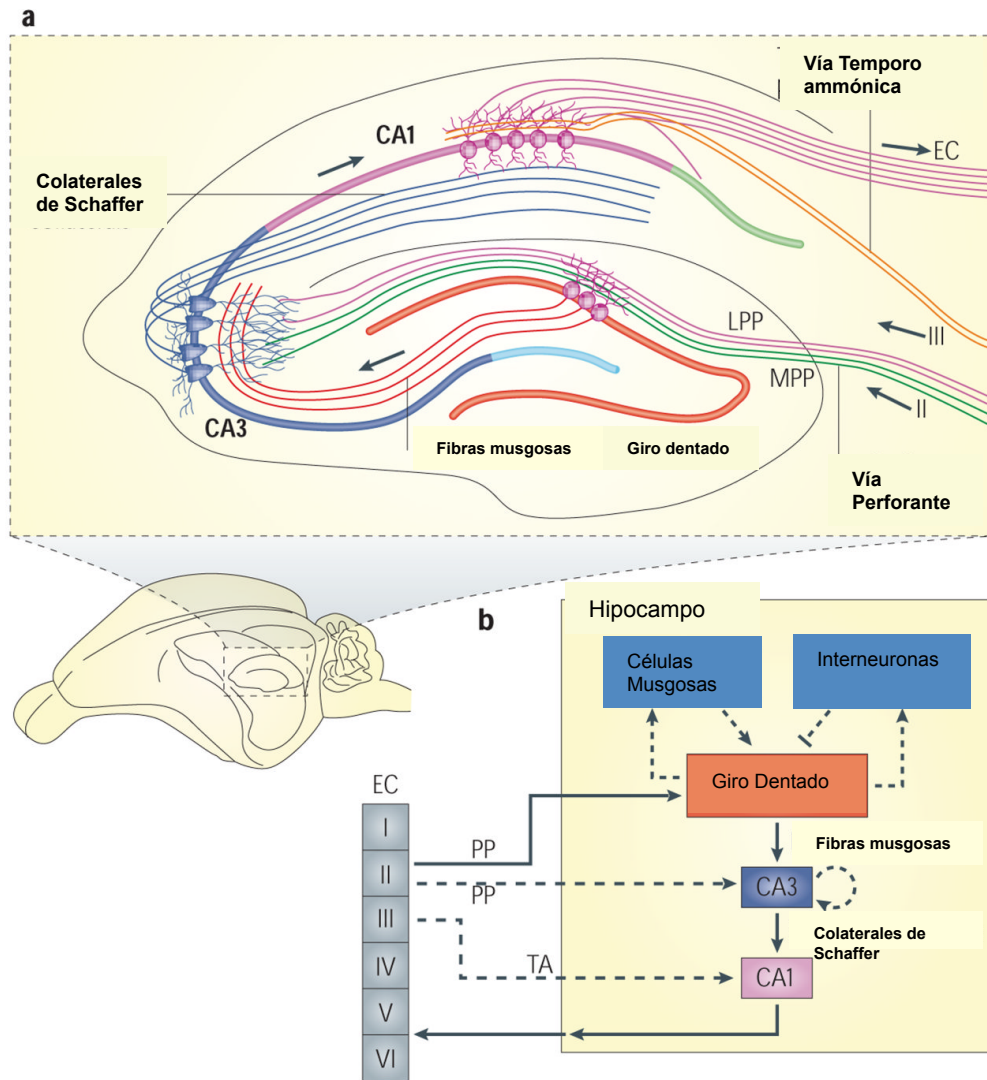


Figura 3. Circuito neural en el hipocampo del roedor. En la ilustración del circuito hipocampal. **b** Diagrama de la red neural hipocampal. La vía tradicional excitatoria trisináptica (Corteza entorrinal (EC)-DG-CA3-CA1-EC) es representada con flechas sólidas. Los axones de las neuronas de la capa II en la EC proyectan al GD a través de la vía del patrón perforante (PP), incluyendo la vía lateral perforante (LPP) y la vía medial perforante (MPP). El GD manda proyecciones a las células piramidales en CA3 a través de las fibras musgosas. Las neuronas piramidales de CA3 relevan la información a las neuronas piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Las neuronas piramidales envían de regreso proyecciones en la capa profunda de las neuronas de la CE. CA3 también recibe proyecciones directas de capa CE de las neuronas de la capa II a través del patrón perforante. CA1 recibe entradas de la capa III de las neuronas a través de la vía temporo amónica. Las células granulares del GD también proyectan a las células musgosas en el *hilus* e interneuronas hiliares las cuales envían proyecciones excitatorias e inhibitorias respectivamente de regreso a las células granulares (Esquema modificado de Deng et al., 2010).

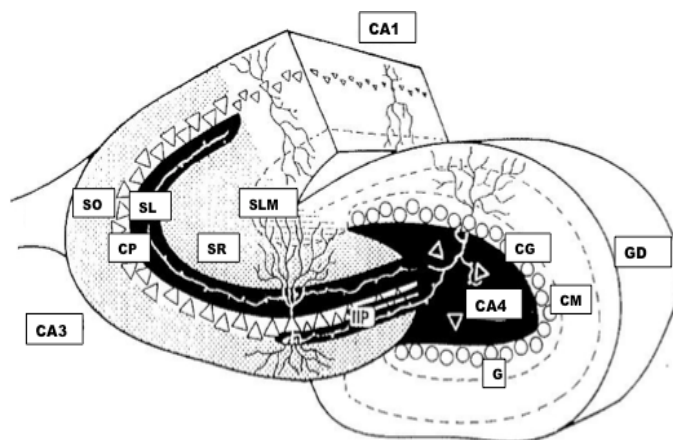


Figura 4. Corte coronal del hipocampo y giro dentado. Donde se observan los diferentes estratos. El *stratum pyramidale* (CP), *stratum lucidum* (SL), *stratum radiatum* (SR) y *stratum oriens* (SO). Se observan los campos CA1, CA3 y CA4 del hipocampo y del giro dentado (GD) se observan los estratos: granular (G) con las células granulares (CG) y estrato molecular (SLM). (Esquema modificado de Berberich, 2007).

1.3 Neurogénesis del GD

Una característica del GD es que persiste la neurogénesis incluso en el adulto (Rapp & Gallagher, 1996). Se estima que cada día se generan nuevas neuronas en el GD, un proceso complejo que se inicia con la proliferación de precursores neurales en la capa subgranular aunque el 50% de células nuevas mueren durante los primeros días (Dayer et al., 2003). Las células que sobreviven, se diferencian en neuronas granulares y viven durante meses, integrándose en los circuitos hipocámpicos mostrando propiedades fisiológicas similares a las neuronas granulares maduras (Ramirez-Amaya et al., 2006; Laplagne et al., 2006), se ha postulado que las neuronas nacidas en el hipocampo adulto pueden participar en los procesos de memoria y aprendizaje y también que la tasa de neurogénesis se correlaciona de forma positiva con el aprendizaje de tareas mediadas por el hipocampo; también el aprendizaje especial, incrementa tanto la proliferación como la supervivencia de las nuevas neuronas (Gould et al., 1999; Dalla et al., 2007) (Figura 5).

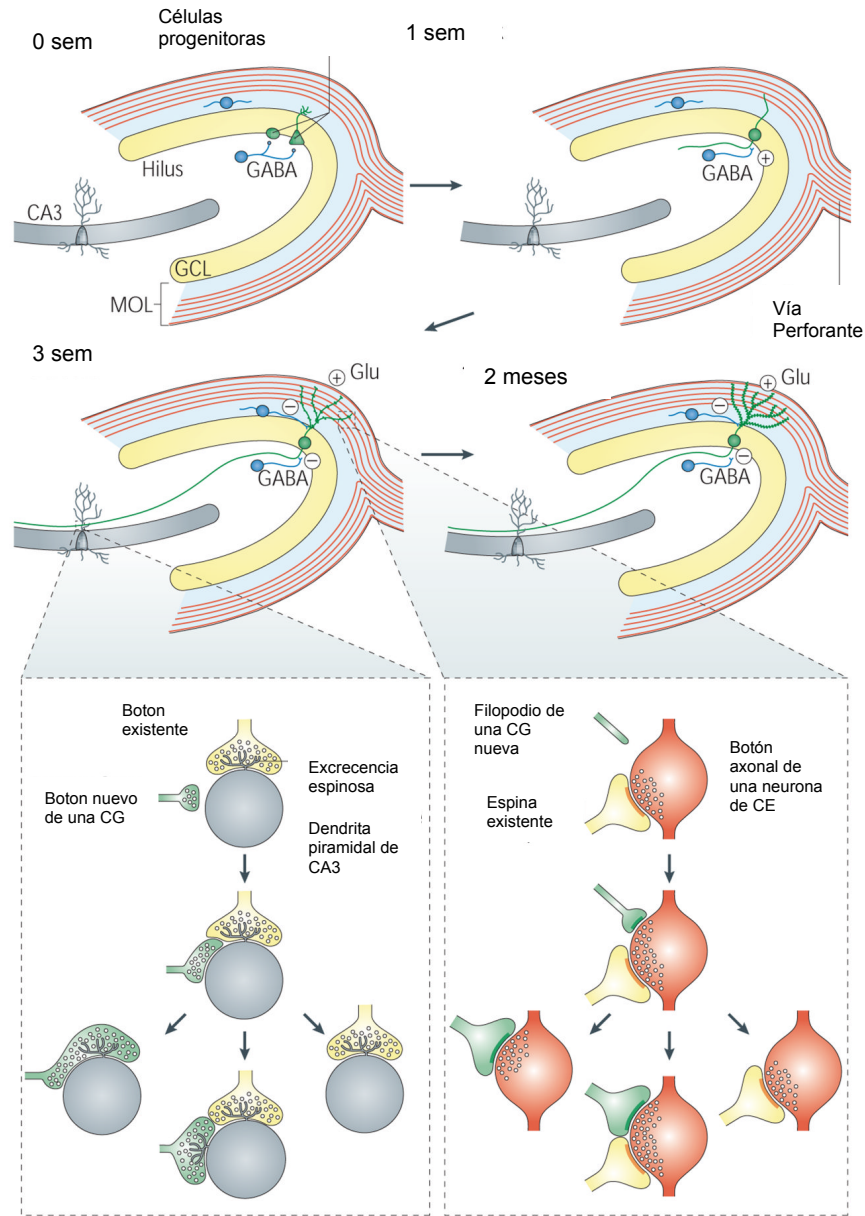


Figura 5. Neurogénesis en el giro dentado adulto y sinaptogénesis. Semana 0 Las células progenitoras neurales generan a las células granulares del GD (en verde), se producen cambios graduales morfológicos y fisiológicos. Semana 1. Las células del GD extienden sus dendritas dentro de la capa granular (GCL) y molecular (MOL) proyecta su axón hacia el *hilus* y el área CA3. Las células del DGC reciben proyecciones inhibitorias GABAérgicas de interneuronas locales (en azul). Durante la tercera semana las DGC reciben entradas glutamatérgicas (Glu) de la vía del patrón perforante en este momento las entradas GABA dejan de ser excitatorias para ser inhibitorias. Las sinapsis eferentes y aferentes se forman a partir de los días 24-26. Alrededor de los 2 meses de edad las propiedades fisiológicas son iguales a una CG madura. Abajo se ilustra la formación de nuevas sinapsis en P24 a P25. Izquierda se muestra un botón pequeño (en verde) del axón de una CG nueva que contacta con una excrecencia espinosa de una neurona piramidal del CA3 (en gris) se observa un botón axonal existente de la CE (en rojo). Derecha, se observan filopodios (en verde), que se extienden a un botón axonal en rojo que se asocia con otra espina existente (en amarillo) (Esquema modificado de Deng et al., 2010).

1.3.1 La célula granular

El tipo celular principal del GD es la célula granular (CG) que presenta un soma elíptico de 10 μm de ancho por 18 μm de largo, por su conexión directa con el campo CA3, existe una relación entre el número de células granulares y las CP además su distribución es diferente, así cerca del área septal la relación de CP y CG es de 12:1 y en la zona del área temporal es de 2:3, el número de capas de CG es de 6 a 8 colocadas de manera muy cercana una célula de la otra, el árbol dendrítico apical tiene forma cónica y sus ramas se extienden a lo largo de la capa molecular (Gonzales et al., 2001; Amaral et al., 2007). El axón de la CG se origina en el GD y hace sinapsis tanto con las células musgosas del *hilus*, como con las CP del *SL* del CA3 del hipocampo (Figura 6).

Las entradas a las CP del CA3 es diverso y si bien el que recibe del GD por medio de la vía de las fibras musgosas es escaso (Kee et al., 2007), éste es determinante para la función del CA3 (Clelland et al., 2009). Solamente entre 10 a 18 sinapsis musgosas hacen contacto con cada CP, mientras que el número de sinapsis que llegan a las CP de vías más débiles como las colaterales del CA3 o las vías provenientes del CA1, está en el orden de los miles (Tashiro et al., 2007).

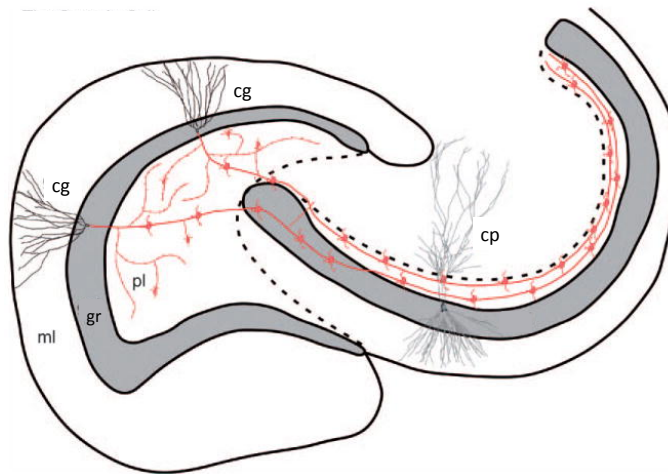


Figura 6. Esquema de giro dentado. Células granulares (cg) y las diferentes capas; molecular; ml, granular; gr y polimórfica, pl. En rojo se observan las fibras musgosas hacia el estrato *lucidum* (gris) de las células piramidales (cp) del CA3. Un plexo colateral hace más de 200 sinapsis con la capa polimórfica o *hilus* (Esquema modificado de Amaral et al., 2007).

1.3.2 Las fibras musgosas (FM)

La función principal de la formación hipocampal es el aprendizaje y el paso de memoria de corto a largo plazo, esta función se inicia por la entrada de la información multimodal de la corteza entorrinal hacia la capa molecular del GD y de ésta al área del CA3 en donde se filtra la información relevante, por lo tanto esta sinapsis entre las FM y el CA3 (FM-CA3) tiene un papel importante para el almacén y recuerdos de la información de tipo espacial en las redes del hipocampo, como una función crítica en la que se identifica como el patrón de completación y de separación así como el almacenamiento de secuencias de eventos (Lisman, 1999; Nicoll & Schmitz, 2005; Bischofberger et al., 2006; Si & Treves, 2009). Los modelos programados por computación han formulado las hipótesis de que las FM ayudan a implementar e integrar un nuevo patrón de separación en las CP del CA3 que representan una nueva memoria, la cual prevalece a pesar de la interferencia que producen las memorias almacenadas a través de las conexiones colaterales recurrentes del CA3 (Treves et al., 2008). El sistema de FM es una estructura altamente compleja que conecta la corteza entorrinal con las CP glutamatérgicas e interneuronas GABAérgicas en la región hilar o *hilus* y del *SL* de la subregión del CA3. Se supone, que una CG inerva aproximadamente de 12 a 15 CP del CA3 y cada CP puede recibir cerca de 50 llegadas de las FM (Claiborne et al., 1990; Ishizuka et al., 1990); También existen pequeñas terminales que asemejan botones de otras neuronas hipocampales y éstas, hacen contacto con las interneuronas del CA3 (Figura 7), (Henze et al., 2000).

Los axones que forman las FM fueron descritos primeramente por Golgi y Salas y después fueron nombradas por Santiago Ramón y Cajal por su parecido anatómico de las fibras encontradas en el cerebelo. Cada CG, da origen a un solo axón desmielinizado de aproximadamente de 0.2 μm de diámetro que origina una serie extensa de colaterales finas, las cuales inervan diferentes tipos de células en la región hilar y continúan formando contactos en el *SL* para hacer sinapsis dentro de las primeras 100 μm de la dendrita apical de la CP del CA3 y en algunas zonas también en las dendritas basales. Otro aspecto anatómico importante de la vía de las FM es que éstas generalmente están restringidas a una banda estrecha que corre en el *SL*. Cabe destacar que el desempeño de las pruebas

espaciales en los roedores, sugieren una correlación con la magnitud de llegadas de las FM en el *SL* y en el *SO* (Nerad et al., 1996; Henze et al., 2000).

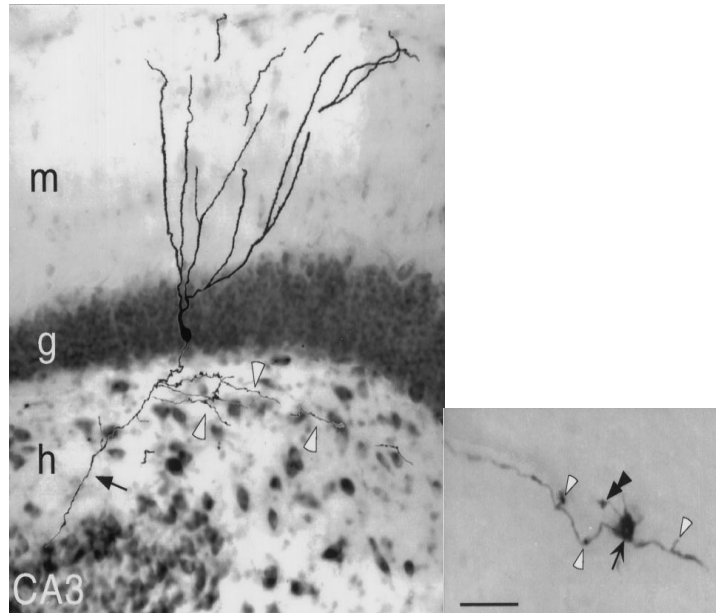


Figura 7. Fotografías de células granulares en las tres capas de giro dentado. Capas: molecular (m); granular (g) y polimórfica o *hilus* (h). La flecha indica las fibras musgosas; las cabezas de flecha blancas indican colaterales en la región del *hilus* y la región CA3 del hipocampo dorsal. En el recuadro de la derecha se observa una ampliación de una terminal musgosa (flecha) en la región hilar, la doble cabeza de flecha indica una extensión filopodial y las cabezas de flechas blancas indican pequeños botones en *passant*. Escala de la barra 10 µm (Esquema modificado de Acsády et al., 1998).

Las FM presentan tres especializaciones presinápticas a todo lo largo de su axón principal; la primera, son botones gigantes de las FM (BFM), que inervan tanto a las células musgosas como a las CP del CA3, en la región hilar los BFM miden entre 4 a 10 µm, el número total a lo largo de un simple axón es de 10 (7 -12) y su contacto principal es la célula musgosa, en la subregión del CA3 en el *SL* el principal sitio de sinapsis es con la CP y el número de BFM es de 14 (11-18). La segunda son pequeños botones en *passant* y la tercera son extensiones de filopodios que se proyectan desde los BFM de los cuales salen de 2 a 3 extensiones de filopodios, que son móviles, ambas miden de 0.5 µm – 2.0 µm de largo (Figura 8). Las extensiones filopodiales y los botones en *passant* inervan selectivamente a interneuronas inhibitorias en el *hilus* y en el *SL* (Amaral, 1979; Claiborne et al., 1990; Frotscher, 1991; Acsády et al., 1998;). Estas terminales forman casi siempre

sinapsis asimétricas y perforadas en los cuerpos celulares de las dendritas y espinas de interneuronas GABAérgicas. Las FM son glutamatérgicas pero también contienen GABA (Sandler & Smith, 1991; Frotscher et al., 2006; Jaffe & Gutierrez, 2007) y el péptido opiáceo dinorfina (McGinty et al., 1983; Drake et al., 2007). Como resultado, el número mayor de contactos de las FM en el CA3 es con interneuronas inhibitorias más que con CP (Henze et al., 2000).

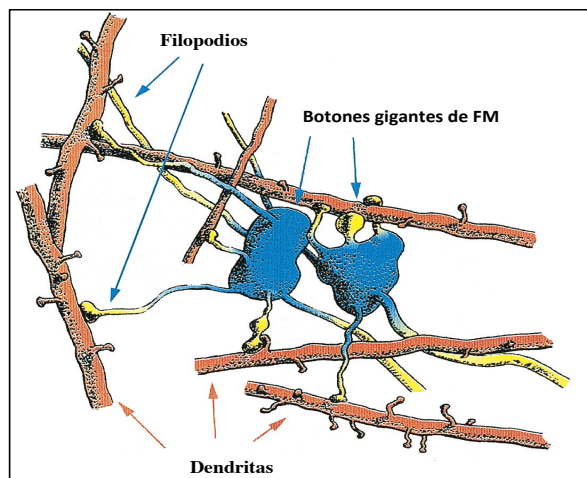


Figura 8. Dibujo de dos especializaciones sinápticas de las fibras musgosas (FM). Extensiones filopodiales en color amarillo; de los botones gigantes de las FM en azul; espinas y dendritas de neuronas GABAérgicas en naranja (Esquema modificado de Mcbain et al., 1999).

1.4 La célula piramidal del CA3

El tipo principal de neurona en el hipocampo es la célula piramidal (CP) cuyo tamaño y organización es variable, tiene dendritas basales que se extienden dentro del *SO* y un árbol dendrítico apical que se abre formando el *SLM*. Las CP del CA3 localizadas cerca del giro dentado son de menor tamaño y con árboles dendríticos que miden entre 8-10 mm, pueden recibir información proveniente de la corteza entorrinal a través del patrón perforante (Figura 9). Hay células pequeñas que se encuentran cerca de los borde del giro dentado, el soma mide $300 \mu\text{m}^2$ o $20 \mu\text{m}$ de diámetro; las células más grandes se encuentran distales en el campo y el tamaño del soma puede ser de hasta $700 \mu\text{m}^2$ o $30 \mu\text{m}$ de diámetro. Las CP reciben una gran cantidad de terminales de las fibras musgosas (FM) en su árbol dendrítico

apical y basal y las que se encuentran más distales reciben información de las FM solo en la dendrita apical (Ishizuka et al., 1990; Henze et al., 2000).

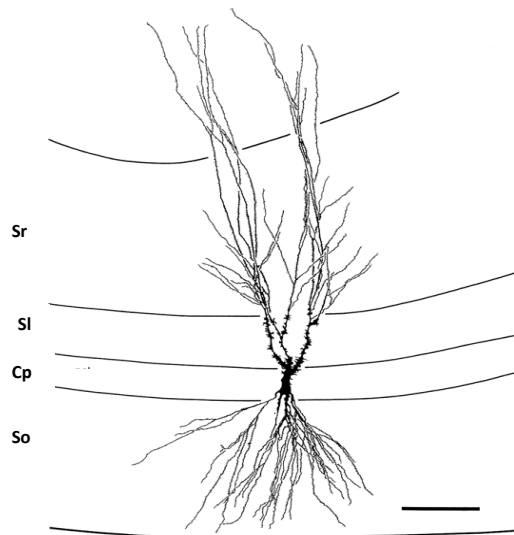


Figura 9. Dibujo en cámara lúcida de una neurona piramidal de CA3. La localización en los diferentes estratos: *radiatum* (Sr); *lucidum* (Sl); *oriens* (So) y de células piramidales (Cp). Se observan las excrecencias espinosas en su mayoría localizadas en la dendrita apical en su porción proximal. La barra = 100µm (modificado de Ishizuka, 1990).

Los botones de las FM son estructuras únicas en una variedad de formas, además de los contactos sinápticos como los filopodios contienen una gran densidad de vesículas electrodensas y redondas que expresan más de una zona activa y envuelven una compleja espina de las ramas dendríticas que surge de las CP del CA3 (Amaral, 1979; Amaral & Dent, 1981). Los estudios a nivel de microscopía electrónica muestran que los BFM contienen retículo endoplásmico liso y un gran número de mitocondrias (Chicurel & Harris, 1992). En esta sinapsis, el elemento posináptico es una estructura altamente ramificada llamada excrecencia espinosa parecido a un gran complejo espinoso que se encuentra en la parte proximal de la dendrita apical de la CP de CA3 (Figura 10) estas estructuras también se encuentran en un número menor en las dendritas proximales basales. La excrecencia invagina en las terminaciones presinápticas y presentan dos tipos de especialización en membranas llamadas zonas activas, estos son sitios de liberación del transmisor y *puncta adherentia* que son complejos de adhesión (Urban & Henze, 2001; Mcbain, 2009; Lawrence et al., 2003; McBain, 2008).

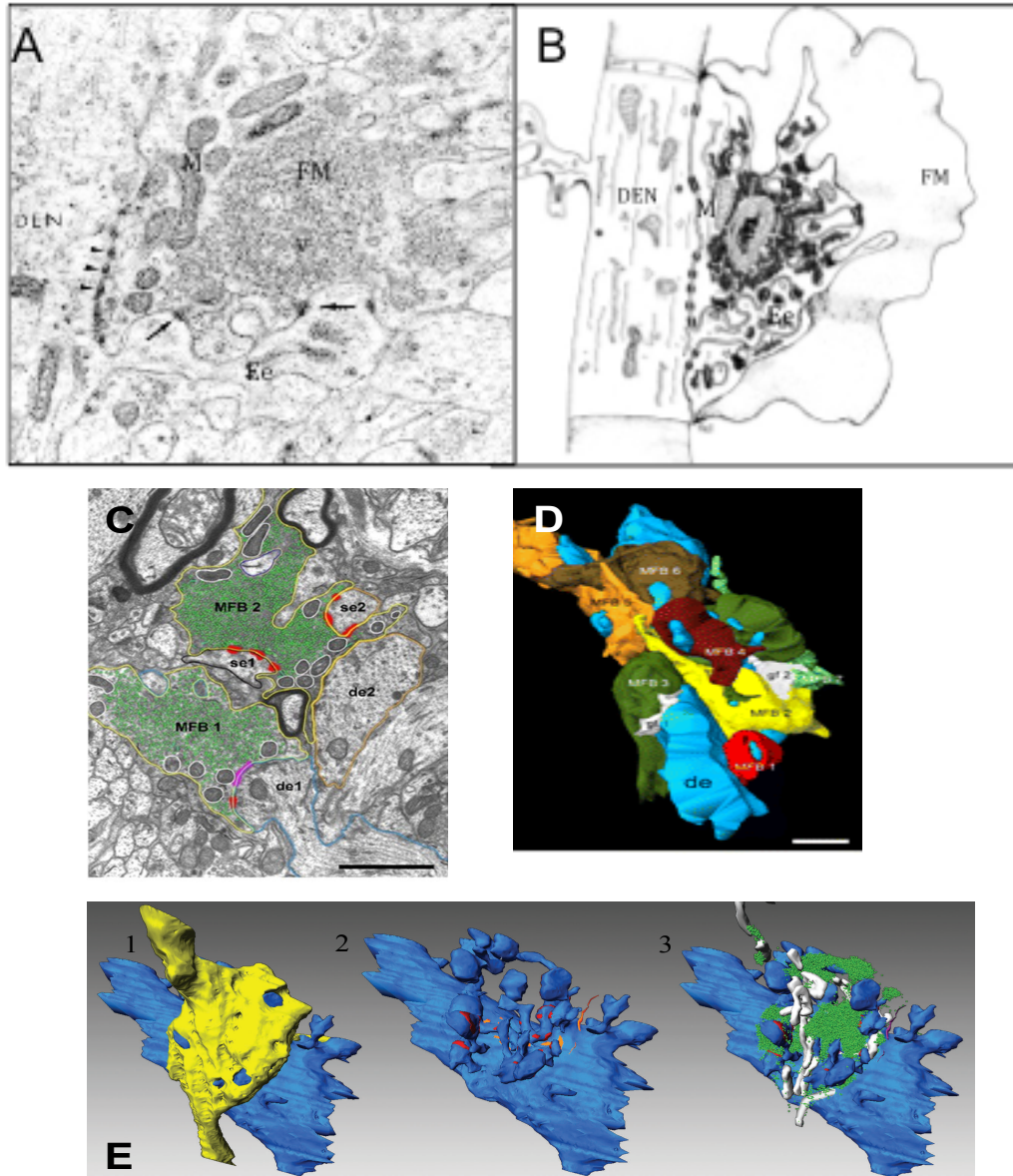


Figura 10. Fotomicrografías electrónicas y reconstrucción tridimensional del complejo sináptico. Entre la presinapsis de la fibra musgosa (FM) y la posinapsis de la excrecencia espinosa (Ee), en la dendrita (DEN) de la célula piramidal del CA3. **A**, La presinapsis se identifica por la terminal de la FM, con numerosas y pequeñas vesículas (v), y por las mitocondrias (M). Con la Ee, se observan algunas uniones simétricas entre la DEN y los botones de las FM representativos de *puncta adherentia* (cabezas de flecha) nótese que no hay vesículas a su alrededor, en contraste con las uniones asimétricas (flechas) que si las tienen. **B**, representación esquemática del complejo pre y posináptico. (modificado de Henze et al., 2000). **C**, Microscopía electrónica de dos botones de FM adyacentes (MFB1,2) ambos botones en amarillo terminan en diferentes segmentos dendríticos (azul y naranja), las onas activas sinápticas se marcan en rojo. Escala 1 μm (modificado de Rollenhagen y Lübke (2007). En **D** Inervación densa y múltiples botones de las FM (MFBs) de diferente forma y tamaño (en varios colores) que hacen sinapsis con la dendrita (azul) Escala 1 μm **E**, 1.Reconstrucciones tridimensionales de un botón de la FM (amarillo), sobre la dendrita (azul) 2. La distribución de las dos membranas (zonas activas en rojo) y *puntia adherentia* (en naranja). En 3, organización de las vesículas sinápticas (puntos verdes) y de las mitocondrias (en blanco) de cada botón sináptico de la FM y en la rata adulta (modificado de Rollenhagen et al., 2010).

1.5 La célula musgosa

En la capa polimórfica también se encuentra una gran variedad de tipos neuronales la más común es la célula musgosa, la cual es tal vez la que Santiago Ramón y Cajal describió como célula estelada o triangular cuyo soma es grande (25 a 35 μm) y su forma es triangular o multipolar. Su árbol dendrítico se extiende a todo lo largo de la capa polimórfica y ocasionalmente hasta la capa molecular y nunca entran al campo CA3 adyacente. Una característica muy distintiva de las células musgosas son las enormes espinas llamadas excrescencias espinosas de las dendritas proximales que son grandes y complejas, este tipo de espinas también se observa en las CP del CA3 pero no tan densas y tan complejas (Figura 11).

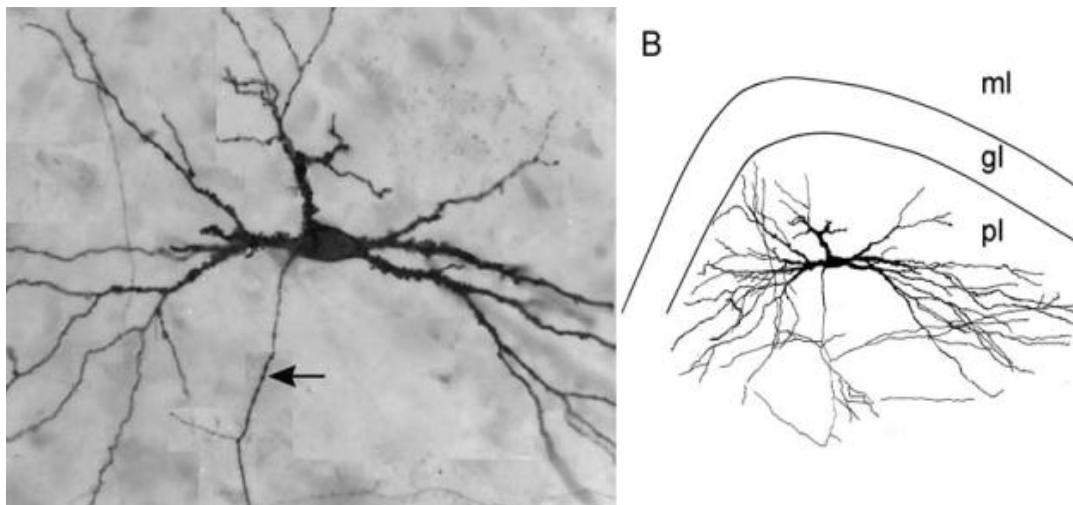


Figura 11. Fotomicrografía de una célula musgosa (A) y su dibujo en cámara lúcida (B). Se aprecian las excrescencias espinosas en las porciones proximales de las dendritas. Las dendritas se extienden en la capa polimórfica (pl) del *hilus* en el giro dentado y otras hasta las capas granular (gl) y molecular (ml). Barra = 25 μm (A) y 50 μm (B). (Esquema modificado de Amaral et al., 2007).

1.5.1 Proyecciones de las células musgosas

En el interior de la capa molecular recibe proyecciones que se originan exclusivamente de neuronas en la capa polimórfica (Frotscher, 1991; Buckmaster et al., 1992; Buckmaster et al., 1996). En la rata las proyecciones se originan tanto del lado ipsilateral como del lado contralateral del GD a esto se le llama proyección de asociación/comisural hay evidencia de

que las proyecciones emergen de la capa polimórfica y casi exclusivamente de las células musgosas (Amaral et al., 2007). Las células musgosas son excitatorias e inmunoreactivas a glutamato (Frotscher et al., 1994). Se ha demostrado su naturaleza excitatoria al inervar a las CG (Scharfman, 1994), también pueden inervar a otras células glutamatérgicas y a células GABAérgicas (Buckmaster et al., 1996). Las células musgosas reciben una innervación masiva de las CG en el mismo nivel a través de las FM colaterales en la capa polimórfica. No hay un consenso acerca de cuál es la función exacta de las células musgosas; lo que se sabe es que inhiben localmente y estimulan distalmente a las CG, por lo que podrían participar en una modulación efectiva de la red del GD que promueve el patrón de separación por las CG (Scharfman & Myers, 2012).

1.6 Interneuronas del giro dentado

1.6.1 Células piramidales en canasta

La interneurona más estudiada es la célula piramidal en canasta, se encuentra a lo largo de la capa granular (Figura 12). Estas células tienen un soma de forma piramidal que mide entre 25 y 35 μm de diámetro y el axón de estas células rodea las sinapsis con los somas de las CG; Santiago Ramón y Cajal fue el primero en describirlas, sus dendritas no presentan espinas y algunas de las dendritas basales se ramifican y extienden hacia la capa polimórfica, la mayoría de estas células contienen GABA como neurotransmisor inhibitorio en sus terminales. Estas sinapsis forman contactos simétricos con las CG localizados principalmente en los somas celulares y en las dendritas proximales de la dendrita apical (Seress & Ribak, 1983).

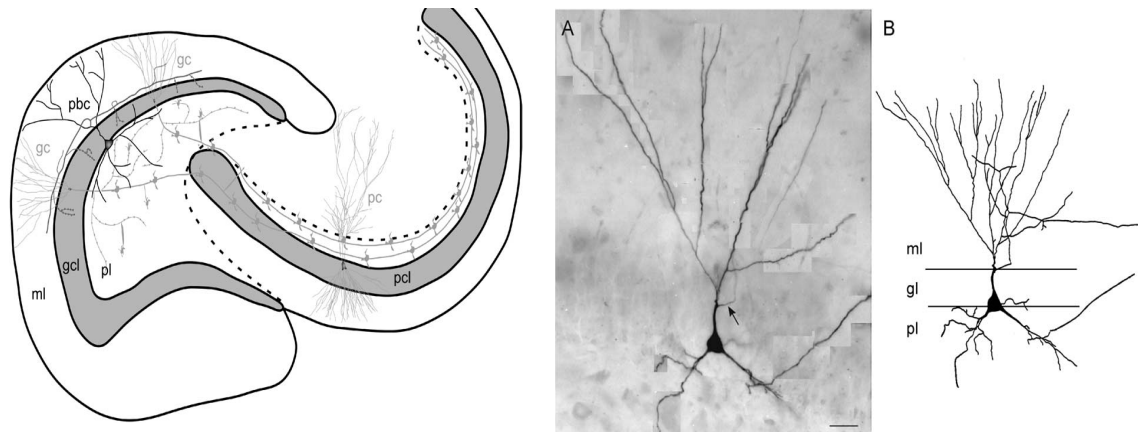


Figura 12. Localización de la célula piramidal en cesta (pbc) dentro del giro dentado. En A, impregnación argéntica de Golgi y ensamble de una pbc después de una inyección de neurobiotina y su dibujo en B con cámara lúcida mostrando sus características anatómicas y su posición en los diferentes estratos del giro dentado: molecular (ml), granular (gl) y polimórfico (pl). La flecha indica el origen del axón. La barra de calibración = 25 μ m. (Esquema modificado de Amaral et al., 2007).

1.6.2 Otras Interneuronas

Anatómicamente se describen 21 tipos diferentes de interneuronas en la formación hipocampal de la rata (Amaral, 1978; Freund & Buzsáki, 1996). Las interneuronas hipocampales forman una población heterogénea que lleva a cabo diferentes funciones; las interneuronas se diferencian entre sí por sus terminaciones nerviosas, por las bases de sus impulsos o por sus características electrofisiológicas, muchas tienen altas frecuencias y disparan en relación con el ritmo theta, razón por la cual son llamadas células theta (Sik et al., 1997), que liberan GABA. En el giro dentado, se han descrito 21 diferentes tipos de interneuronas, de acuerdo a su localización, a la forma del soma, a su estructura dendrítica y la presencia o no de espinas (Amaral, 1978; Houser, 2007) (Figura 13).

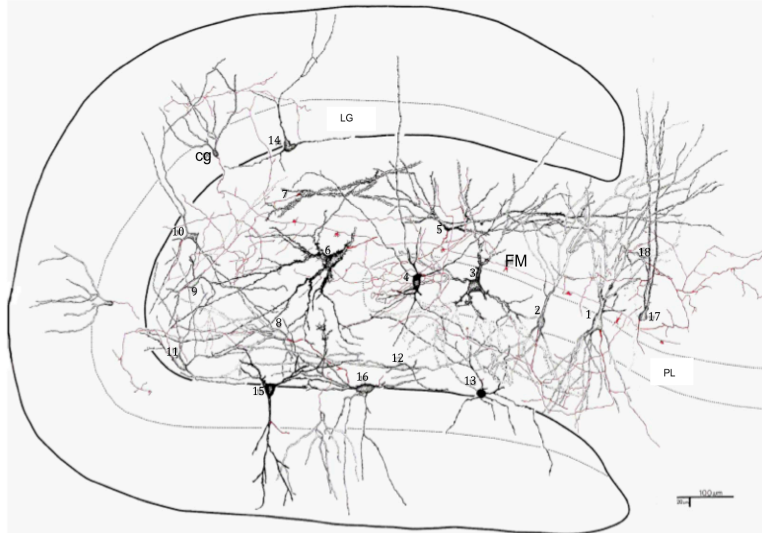


Figura 13. Dibujo de la región hilar mostrando los tipos de interneuronas del *hilus* en el giro dentado. Células piramidales (1-3), gigante estrellada sin espinas (4), piramidal no alineada (5), musgosa (6), multipolar espinosa (7), ovoide (8), pequeñas células estrelladas sin espinas con un plexo axonal (9), suprapiramidal sin espinas (10), estrellada del ápex con axón descendente (11), fusiforme (12), esferoide (13), 2 tipos de piramidales en cesta (14, 15), y horizontal en cesta (16), interneuronas limitantes (17,18). Célula Granular (cg) del giro dentado y capa granular (LG), axones de las cg, las fibras musgosas (FM), y capa polimorfa (PL). (Esquema modificado de Amaral, 1978).

2. PLASTICIDAD

La plasticidad del Sistema Nervioso Central (SNC) es la capacidad de las células nerviosas para cambiar sus propiedades, desarrollando nuevas sinapsis, modificando la forma o la función de las existentes o desarrollando nuevos procesos, como resultado de la experiencia (aprendizaje), las lesiones, o procesos degenerativos. En el cerebro del adulto, la plasticidad es el resultado de cambios en la fisiología y / o en la bioquímica de los circuitos neuronales así como cambios en la estructura física establecida durante el desarrollo (Arnold & Breedlove, 1985; McEwen et al., 1991). Estos cambios en las propiedades neuronales, hacen posible la organización de las funciones cognitivas (sistemas funcionales complejos) el cual puede ser visto desde distintos niveles de análisis, desde el nivel molecular, con la liberación de factores tróficos (promotores del crecimiento) como respuesta al daño cerebral; el nivel bioquímico, en donde se producen cambios en el flujo de iones; los niveles de neurotransmisores y la estructura pre y posináptica, como respuesta al daño cerebral o el nivel anatómico en donde se establecen nuevas conexiones o vías en forma

espontánea en respuesta a cambios medio ambientales, hasta el nivel psicológico en donde se producen cambios en los aspectos perceptivos, cognitivos y emocionales de la conducta tras una experiencia. Esta propiedad del SNC de modificarse como consecuencia de su propia actividad, ha permitido entender los mecanismos que subyacen en áreas específicas como el hipocampo, una de las áreas principales de plasticidad en el cerebro y cuya estructura es fundamental para el almacenamiento de la memoria explícita. La neuroplasticidad del hipocampo se ha probado en diversos acercamientos experimentales desde estudios conductuales hasta los análisis de actividad y expresión de proteínas, acompañada de modificaciones en las conexiones de los circuitos neurales implicados, en donde las sinapsis posibilitan la interacción funcional para estos procesos de aprendizaje y memoria. Durante procesamiento de memoria, las neuronas hipocampales del CA1 desempeñan un papel crucial en la integración sináptica excitatoria de entrada proveniente del CA3 y la corteza entorrinal. Estas neuronas reciben entrada excitadora casi exclusivamente en las espinas dendríticas, cuya formación y eliminación (plasticidad estructural) son el reflejo de los cambios de la red del hipocampo (Gu et al., 2014).

2.1 Plasticidad sináptica en la conexión FM-CA3 e interneuronas

La mayoría de los modelos computacionales sugieren que la subregión CA3 puede ser representada como una red atractora auto asociativa en el sistema de memoria, se asume que el CA3 opera de esta forma por las conexiones excitatorias recurrentes entre las células piramidales del CA3 la presencia de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés), las modificaciones sinápticas y asociaciones tipo Hebbian las cuales están formadas entre las células pre y posinápticas en conjunción con un set de procesos inhibitorios (Rolls & Kesner, 2006; Hunsaker et al., 2007) a todo esto en su conjunto se le llama plasticidad sináptica. La neurotransmisión excitatoria de las FM, depende de la liberación de glutamato y de la activación de receptores posinápticos a glutamato. El principal transmisor excitatorio en el hipocampo de los mamíferos es el glutamato, este despolariza las neuronas hipocampales, más aún, la estimulación eléctrica provoca su liberación. El glutamato activa tres tipos diferentes de receptores que median la transmisión excitatoria ionotrópica:

Kainato, α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-ácido propionico (AMPA), y N-metil-D-aspartato (NMDA), además múltiples mecanismos del receptor pueden existir en la misma sinapsis. El blanco celular dicta no solo el tipo de receptor presináptico sino también el tipo de plasticidad que esta expresada en una sinapsis particular de la FM, es importante mencionar que también hay varias formas de plasticidad sináptica a largo plazo (Henze et al., 2000)

La LTP es la forma duradera de la plasticidad sináptica que sirve como modelo de memoria (Warren, 1995; Bliss & Collingridge, 1993; Nicoll & Malenka, 1995;), si se activan mecanismos pre y posinápticos es llamado LTP tipo Hebbian y si solo se activan procesos presinápticos o posinápticos se le llama tipo no Hebbian, de cualquier forma la LTP está presente en la mayoría de las sinapsis excitatorias del SNC y puede encontrarse de manera prominente en estructuras que involucran aprendizaje y memoria como la amígdala y el hipocampo, varios estudios han dejado la idea de que la LTP puede subyacer ciertas funciones mnemónicas. La LTP ha sido estudiada en dos tipos de sinapsis excitatorias dependientes de receptores a NMDA en CP del CA3 en roedores; una, son sinapsis formadas por los axones de fibras comisurales/asociación y requiere de la activación del receptor NMDA y la otra, son las sinapsis formadas entre las colaterales de Schaffer y neuronas piramidales de CA1. Por otra parte se ha demostrado que en la sinapsis de las FM y las neuronas piramidales de CA3 la LTP es independiente de la activación de receptores a NMDA (Zalutsky & Nicoll, 1990; Nicoll & Roche, 2013) y dependiente de receptores a opioides por lo tanto los receptores opioides Mu, Delta y péptidos opioides como las encefalinas y dinorfina juegan un rol muy importante en la inducción de la LTP en terminales de las FM (Derrick, 1992; Derrick & Martinez, 1994) La plasticidad sináptica se ha visto modulada por múltiples factores extrínsecos e intrínsecos como factores tróficos y hormonales y entre ellas hormonas sexuales como los estrógenos, en el siguiente capítulo veremos la fisiología de los estrógenos y cómo afecta a distintas áreas del hipocampo y la plasticidad estructural y sináptica.

2.2 Función del zinc en la LTP de las fibras musgosas

Otro de los elementos que se encuentra modulando la plasticidad sináptica de la vía excitatoria glutamatérgica en las terminaciones axónicas de las FM es el zinc un catión divalente que se encuentra dentro de las vesículas de los BFM. El zinc es un oligoelemento esencial, cuya importancia para el funcionamiento SNC es cada vez más apreciada. Hay múltiples mecanismos del zinc extracelular que puede estar modulando receptores a glutamato ionotrópicos y transportadores a glutamato, el zinc varía dependiendo de su concentración. Los blancos mejor caracterizados son los receptores a NMDA (NMDAR), se ha descubierto que a concentraciones micromolares selectivamente inhiben NMDAR, un análisis posterior que revela que a diferencia del Mg^{2+} que actúa como un bloqueador del canal, el mayor efecto del zinc en la actividad de los NMDAR es producir una inhibición voltaje independiente no competitiva, que se traduce como una menor probabilidad para abrir el canal (Legendre & Westbrook, 1990). Altas concentraciones también producen una inhibición voltaje dependiente de la corriente del NMDAR (Paoletti et al., 1997). Poco se sabe de los efectos del zinc en los receptores a AMPA (AMPA) que co-localizan con los NMDAR en la membrana posináptica de las sinapsis glutamatérgicas, algunos estudios han encontrado al menos dos diferencias en el modo de acción entre ambos receptores, primero, los efectos son opuestos, ya que el zinc actúa como un potenciador de los AMPAR, la inhibición también se ha visto, pero solo a concentraciones muy altas algunos estudios han encontrado que tiene efectos complejos sobre receptores NMDA y puede ser una modulación endógena de plasticidad sináptica. En cortes del CA1, se observó que las bajas concentraciones de zinc micromolar disminuye las respuestas sinápticas en 40-50% de los receptores NMDA y se impide la depresión a largo plazo (LTD) pero no la LTP (Izumi et al., 2006).

Hay evidencia de que el zinc puede ser liberado de las FM durante la estimulación sináptica y además es co-liberado con L-Glutamato (Assaf & Chung, 1984; Howell, Welch, & Frederickson, 1994; Quinta-Ferreira et al., 2004). También puede modular la función de varios ligandos y canales de iones dependientes de voltaje (Harrison & Gibbons, 1994; Xie & Smart, 1994; Ueno et al., 2002). Por el contrario, se ha observado que varios quelantes de zinc inhiben la inducción de la LTP de las FM (Budde et al., 1997; Lu et al., 2000; Li et al., 2001). Además la administración de zinc puede inducir la LTP de la transmisión de las

FM (Li et al., 2001). La LTP requiere de la entrada de zinc del espacio extracelular en la neurona posináptica usando vías permeables de Ca^{2+} como receptores AMPA o Kainato o a través de canales de iones dependientes de voltaje (Jia et al., 2002; Li et al., 2001).

Existen tres fuentes principales de zinc en el cerebro, la primera se localiza en vesículas sinápticas de los nervios terminales, o bien se encuentra unido a la membrana en forma de metaloproteínas o en complejos proteína-metal; ambas pueden formar parte de reacciones metabólicas y no metabólicas, por último como iones libres en el citoplasma (Cuajungco & Lees, 1997). En condiciones normales, el zinc se modula en las vesículas sinápticas a través de receptores posinápticos ionotrópicos y metabotrópicos y se establecen controles para evitar la acumulación excesiva de zinc o su deficiencia. Esta homeostasis celular es el resultado de una regulación coordinada por diferentes proteínas que intervienen en la absorción, excreción y almacenamiento intracelular y del tráfico de zinc. Estas proteínas, en la membrana transportan al zinc, son las Zip y las intracelulares, son las metalotioneínas (MT) que controlan los niveles de zinc. Curiosamente, las alteraciones en las MT recientemente se han descrito tanto en el envejecimiento como para la EA. Cuando las concentraciones de zinc se ven disminuidas se observan cambios en la homeostasis por lo tanto se propone como un factor de riesgo para la depresión, la enfermedad de Alzheimer (EA), el envejecimiento y otras enfermedades neurodegenerativas lo que sugiere que el zinc es un factor clave en el desarrollo de varios trastornos neuropsiquiátricos y cambios en la neurogénesis, de hecho, la carencia de zinc se ha demostrado que afecta la neurogénesis y su aumento provoca apoptosis neuronal, lo cual puede llevar a un proceso de aprendizaje y déficit de memoria respectivamente. Por otro lado cuando se observa traumatismo craneoencefálico, accidente cerebrovascular o epilepsia, el exceso de afluencia del zinc en las neuronas provoca neurotoxicidad y muerte neuronal. (Cuajungco & Lees, 1997).

2.3 Plasticidad Estructural

Además de la plasticidad sináptica hay varios estudios que han demostrado que la formación hipocampal presenta gran capacidad de plasticidad estructural esto quiere decir que es capaz no solo de reorganización cuando se daña el tejido si no que también suceden cambios estructurales que pueden llegar a ser dramáticos en un tejido intacto y sano a lo largo de la vida y que se ve influenciado por numerosos estímulos extrínsecos e intrínsecos,

como el medio ambiente, el aprendizaje, memoria, factores tróficos como el neuronal (NT), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y los hormonales como los glucocorticoides, y esteroides sexuales como los estrógenos.

Las modificaciones en las neuronas (morfogénesis) suceden de manera dinámica y continua en la estructura del árbol dendrítico (dendrogénesis) así como en sus espinas (espinogénesis), también se observa en la formación de sinapsis (sinaptogénesis), en su reorganización o en su eliminación (Figura 13) y en crecimiento de los axones (axogénesis). Además en el giro dentado se siguen produciendo cambios en el número de nuevas neuronas un proceso llamado neurogénesis (Cameron & McKay, 2001) de igual forma varios estudios han identificado que la neurogénesis es modulada por múltiples condiciones (Stahnisch & Nitsch, 2002). Aunque muchos estudios han identificado moléculas y las condiciones que regulan la neurogénesis, el control transcripcional de la neurogénesis hipocámpica durante la edad adulta es menos clara (Suh et al., 2009). Se ha propuesto que el NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células) un complejo proteico que controla la transcripción del ADN y también está implicado en procesos de plasticidad sináptica y de memoria. Específicamente en el giro dentado (sitio de neurogénesis) el NF- κ B regula las proyecciones de las FM del CA3 y la reconstitución del giro dentado (Suh et al., 2009).

Durante el envejecimiento hay pérdida cognitiva que se relaciona con una pérdida continua de las células dentro del cerebro y, en particular en el hipocampo, que se podrían regenerar a través de la neurogénesis en el adulto. Sin embargo, lo que ocurre es que se altera la proliferación de células madre, la axogénesis, la sinaptogénesis y los mecanismos neuroprotectivos, lo que da lugar a la alteración de la vía y la fibra musgosa del giro dentado durante el envejecimiento (Imielski et al., 2012).

Por otra parte, a finales de la década de 1980, la conclusión de que el giro dentado del hipocampo, contiene más células granulares en los machos que en las hembras de ciertas cepas de ratón estableció los efectos de los esteroides sexuales durante el desarrollo. Las hormonas gonadales también juegan un papel crucial en la conformación de la función y morfología del cerebro adulto. Además de los procesos relacionados con la reproducción,

los esteroides sexuales tienen una mayor participación en las operaciones cerebrales como la cognición y el estado de ánimo, en las que el hipocampo es un mediador.

Por ser parte de la formación hipocampal, el GD, está involucrado en dichos mecanismos y como tal, responde a los efectos de los esteroides sexuales. La primera indicación de que los esteroides sexuales pueden influir la neurogénesis en el GD adulto, fue lo demostrado por Tanapat y sus colegas (1999), las ratas hembras producen más neurogénesis que los machos. Lo importante es que también presentan una fluctuación en la proliferación celular durante el ciclo estral: las hembras producen más neuronas nuevas en proestro (cuando los niveles de estrógeno son más altas) en comparación con el diestro y estro. Además la ovariectomía disminuye la neurogénesis, mientras que la suplementación con E₂ la aumenta, un efecto que se puede invertir mediante la administración de progesterona (P₄) (Tanapat et al., 1999; Falconer & Galea, 2003; Tanapat et al., 2005).

2.3.1. El 17 β - estradiol y la remodelación sináptica

En 1990, el descubrimiento de que las fluctuaciones del E₂ durante el ciclo estral de la rata, producían una mayor o menor densidad de los sitios posinápticos (espinas) de la dendrita apical de las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo, marcó el comienzo de una nueva era en la investigación de los esteroides sexuales (Woolley & McEwen, 1992), ver figura 14. Una extensa labor ha demostrado que los esteroides sexuales tienen efecto sobre la sinaptogénesis en el hipocampo adulto. Por ejemplo, el reemplazo de la hormona induce cambios entre 50-100% en el número de espinas del CA1 (MacLusky et al., 2005; Parducz et al., 2006). De hecho, hay evidencia acumulada que sugiere una rápida remodelación y estabilización de las pequeñas espinas que pueden representar un mecanismo de formación y el almacenamiento de la memoria (Kasai et al., 2003; Sorra & Harris, 2000). Al medir un marcador de las espinas dendríticas (espinofilina) en el CA3 y en el *hilus* se observó una disminución en la inmunoreactividad para espinofilina en ratas Ovx, después de suplementar un grupo Ovx con estrógenos durante dos días, se observó una recuperación en la cantidad de espinofilina inmunoreactiva (Brake et al., 2001).

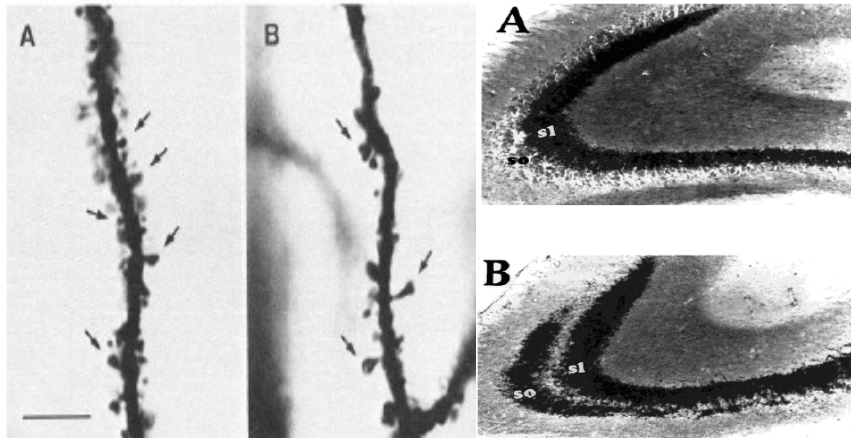


Figura 14. Plasticidad estructural del hipocampo. Izquierda, imágenes de la poda de espinas en un segmento dendrítico de las células piramidales del CA1, de una rata con hipoestrogenismo, las flechas indican las espinas de tipo hongo, A, rata suplementada con E₂ y B, rata Ovx (Esquema modificado de Woolley & McEwen, 1990b). Derecha se muestra una tinción con Timm del *stratum lucidum* (sl) y del *stratum oriens* (so) en el CA3 del hipocampo de una rata sometida a sobreentrenamiento para mostrar la plasticidad de las FM (Esquema modificado de Ramírez- Amaya et al., 1999).

3. ESTRÓGENOS

Los estrógenos son hormonas sexuales endógenas que tienen varios efectos fisiológicos vinculados con la reproducción como en el control de la ovulación, fecundación e implantación. También son importantes durante el desarrollo, tiene efectos sobre el metabolismo de minerales, carbohidratos, proteínas y lípidos.

En los últimos años se ha visto que los estrógenos tienen una participación importante en diversas funciones del SNC como el desarrollo, induce dimorfismo sexual en el área preóptica y ventromedial del núcleo de el hipotálamo (Gorski et al., 1978; Davis et al., 1996), en los comportamientos afectivos, la epilepsia y procesos cognitivos del SNC, en especial en la memoria regulada por el hipocampo (Huang & Woolley, 2012).

Existen tres tipos de estrógenos biológicamente relevantes el más activo es el 17β - estradiol (C₁₈H₂₄O₂, E₂) seguido por la estrona (C₁₈H₂₂O₁, E₁) y el estriol (C₁₈H₂₄O₃, E₃), cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 átomos de carbono, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo b-

hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos. (Figura 15).

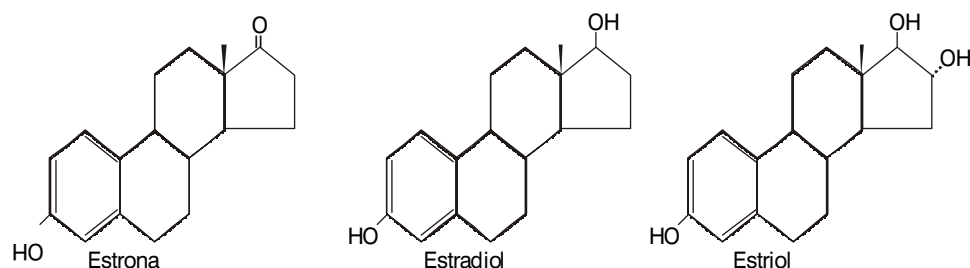


Figura 15. Hormonas estrógenas. Estrona, estradiol y estriol, moléculas de 18 átomos de carbonos en cuatro anillos, con su anillo fenólico A y grupos hidroxilo, el estradiol presenta dos moléculas hidroxilo la estrona tiene un grupo hidroxilo y el estriol presenta tres (Esquema modificado de Aguila, et. al, 1999).

En el hígado, el estrógeno secretado se oxida de manera reversible hasta generar estrona mediante la 17 - hidroxisteroide deshidrogenasa y esos dos estrógenos pueden convertirse en estriol. Los tres estrógenos se excretan en la orina junto con glucurónidos y conjugados fosfato. En varones y mujeres posmenopáusicas la principal fuente de estrógenos es el estroma del tejido adiposo a partir de la deshidroepiandrosterona secretada por la corteza suprarrenal. De este modo la concentración de estrógenos está regulada en parte por la disponibilidad de precursores androgénicos.

3.1 Biosíntesis de los Estrógenos

Los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes antes de la menopausia el principal producto secretor es el E₂, sintetizado por células de la granulosa a partir de precursores androgénicos proporcionados por células de la teca, la actividad de la aromatasa es inducida por las gonadotropinas, que actúan por medio de receptores de membrana plasmática para incrementar las concentraciones intracelulares de adenosina 3'5'- monofosfato. Las gonadotropinas y el AMP cíclico también incrementan la actividad de la enzima de desintegración de la cadena lateral del colesterol y facilitan su transporte.

Los estrógenos se forman a partir de androstenediona o testosterona como precursores inmediatos y la reacción comprende la aromatización del anillo A que es catalizada en tres pasos por un complejo de enzimas monooxigenasa (aromatasa) utilizando la forma reducida de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y oxígeno molecular como sustratos. El paso inicial en la biosíntesis de los estrógenos es la conversión de colesterol a pregnenolona, la cual es catalizada por la enzima citocromo P450 cortadora de la cadena lateral (P450_{scc}). En 1987 Hu et al., demostraron que en las mitocondrias aisladas de oligodendrocitos (células gliales) de la rata eran capaces de convertir colesterol en pregnenolona. También se ha observado la presencia de la enzima aromatasa en los astrocitos capaces de sintetizar estrógenos (García-Segura et al., 2008). La actividad de la aromatasa reside dentro de una glucoproteína transmembranal (familia P450 de monooxigenasas) también es esencial una flavoproteína omnipresente, la NADPH-citocromo P450 reductasa. Ambas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico de células de la granulosa ovárica, células del estroma de tejido adiposo, sinciotrofoblastos placentarios, blastocisto previo a la implantación y diversas regiones del cerebro incluido el hipocampo en donde se ha visto la síntesis de estrógenos (hembras y machos) por la enzima final; la aromatasa (Figura 16). Por lo tanto un nuevo paradigma surge cuando se muestra que el E₂ es sintetizado *de novo* en esta parte del cerebro. Además, estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el E₂ originado en el hipocampo contribuye a la función hipocampal en particular la plasticidad sináptica, estructural y en la neuroprotección (Fester et al., 2011)

El cerebro, las adrenales, las gonadas y la placenta son órganos esteroideogénicos (productores de hormonas esteroideas). Baulieu & Robel en 1990 mostraron que los esteroides como la pregnenolona y dehidroepiandrosterona tienen mayores concentraciones en el cerebro que en el plasma (Do Rego et al., 2009; Pelletier, 2010; Reddy, 2011; Kato et al., 2013). Además está demostrado que los esteroides persisten en el SNC después de la gonadectomía o adrenalectomía. Los neuroesteroides son definidos como esteroides que se acumulan en el cerebro aun en ausencia de glándulas esteroideogénicas y los cuales son sintetizados en el cerebro de precursores endógenos por enzimas presentes *in situ* (Baulieu & Robel, 1990).

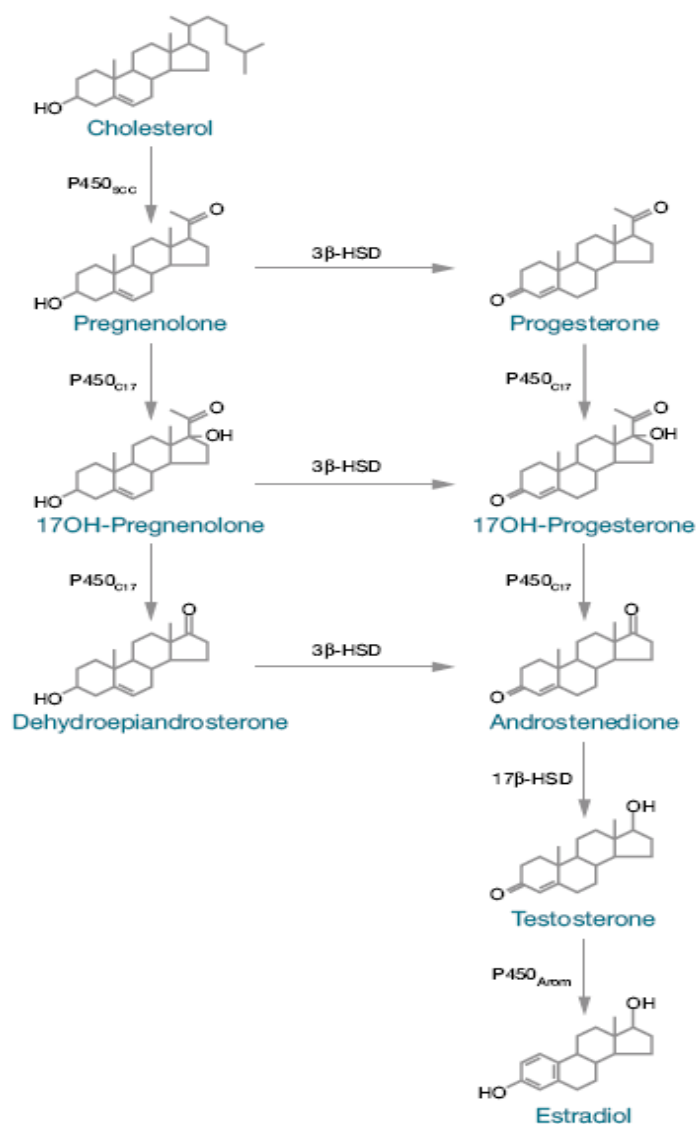


Figura 16. Biosíntesis del estradiol desde el colesterol. Citocromo P450 enzima cortadora de la cadena lateral del colesterol (P450_{sc}), 3β- hidroxisteroide deshidrogenasa (3β-HSD), 17β - hidroxisteroide deshidrogenasa (17β - HSD). (Esquema modificado de Woolley, 2007).

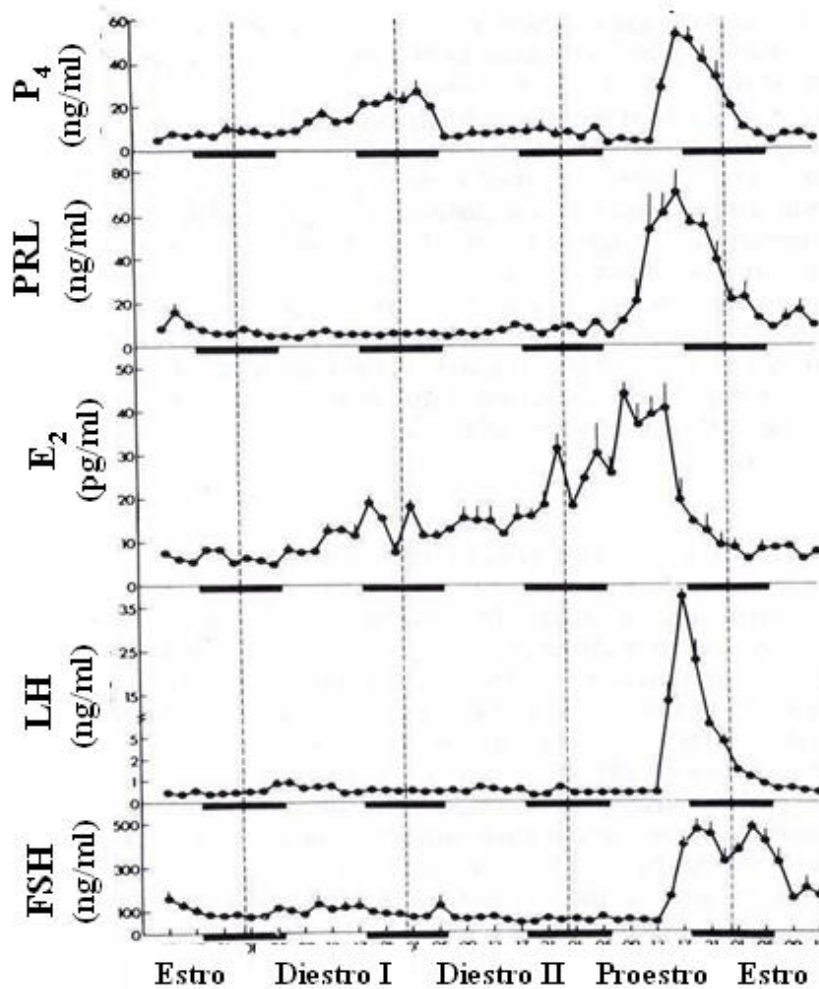
Tanto los esteroides como los neuroesteroides son sintetizados a partir del colesterol por una serie de reacciones enzimáticas mediadas por el citocromo P450 y otras enzimas. De hecho la presencia de estas enzimas en el sistema nervioso han sido documentadas en varias especies, y el cerebro está equipado con toda la batería enzimática necesaria como para sintetizarlas a partir del colesterol (Do Rego et al., 2009; Pelletier, 2010). Como las gonadas son las principales fuentes de esteroides, los efectos producidos por los estrógenos en el hipocampo son atribuidos a la regulación endócrina por lo cual el E₂ alcanza su blanco

a través del plasma. Las concentraciones de E₂ en el suero son más bajas que las concentraciones en el tejido hipocampal (Hojo et al., 2008; Kato et al., 2013). Sin embargo suceden toda una serie de eventos plásticos a través del ciclo estral de la rata. Las diferencias enzimáticas y de expresión de aromatasa en las diferentes secciones del tejido hipocampal sugieren que los niveles de E₂ difieren en varias regiones y pueden ser más altos en a región CA3 (Prange-Kiel & Rune, 2006).

3.2 Fisiología de la reproducción

3.2.1 Ciclo estral de la rata

Las ratas presentan un ciclo reproductivo llamado ciclo estral que consiste en la ovulación de manera cíclica (con una duración de 4 a 5 días) pasando por cuatro estados básicos que son: diestro I o metaestro, diestro II, proestro y estro. Tienen como consecuencia un comportamiento sexual femenino determinado y estos mecanismos están mediados por las concentraciones hormonales. El ciclo ovárico comienza con la liberación pulsátil de la GnRH, factor que estimula la liberación de dos hormonas gonadotrópicas primarias de la glándula pituitaria anterior: la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en ingles) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en ingles). La FSH a su vez, estimula el crecimiento de los folículos del ovario (células epiteliales que se encuentran rodeando cada óvulo); conforme los ovarios maduran secretan estradiol que genera un crecimiento epitelial de las paredes del útero (preparación para la implantación del óvulo). El incremento de estradiol genera una activación en la hipófisis y se libera LH, la cual genera la ovulación (rompimiento de los folículos maduros).



CITOLOGIA VAGINAL



Figura 17. Concentración en plasma de las hormonas de la reproducción. Folículo Estimulante (FSH), Luteinizante (LH), Estradiol (E₂), Prolactina (PRL) y Progesterona (P₄) en el transcurso del ciclo expresado en ng/ml ó pg/ml. En la gráfica se indica el período en el cual ocurre la ovulación y el período de receptividad sexual que es a finales del Proestro e inicio del Estro. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en un ciclo 12-12. (Esquema modificado de Smith, et al.,1975).

La influencia continua de LH genera que la ruptura del folículo se vuelva cuerpo lúteo que produce estradiol y progesterona. Por lo tanto la FSH y la LH son las encargadas de estimular el crecimiento de los folículos y la síntesis de esteroides en el ovario. En la rata, este periodo dura dos días, siendo el primero la fase de proestro, cuando la hembra se encuentra receptiva sexualmente, y el segundo fase de estro, cuando ocurre la ruptura de los

folículos generando la ovulación (Jenkins & Becker 2005). La concentración de E₂ fluctúa entre 100 y 150 pg/ml en el proestro, aproximadamente 6 a 12 horas antes de la ovulación. La P₄ se incrementa unas horas (4 a 6 horas) antes de la ovulación después de la liberación del E₂ durante el proestro. En estas etapas se presentan cambios en el tipo de células que están presentes en el útero de la hembra, estos cambios en la concentración de hormonas y la citología vaginal durante el ciclo estral de la rata se ejemplifican en la figura 17 (Marcondes et al., 2002; Goldman et al., 2007; Hawkins et al., 1975).

3.3 Efecto de los estrógenos en la plasticidad de la formación hipocampal

Hace más de 20 años que se sabe de la participación de los estrógenos en la, el mantenimiento de la estructura neuronal, en la plasticidad sináptica y en la neuroprotección del hipocampo, se han demostrado cambios dramáticos en la fisiología y morfología celular del hipocampo dorsal en ratas ovariectomizadas (Ovx) y suplementadas con 17β - estradiol (OvxE) tanto *in vitro* como *in vivo* y también en las diferentes fases del ciclo estral, en donde se observa una pico alto en la concentración de los estrógenos en etapa de proestro y una concentración más baja en etapa de estro (Figura 17). Woolley et al., (1990) fueron los primeros en mostrar las consecuencias plásticas con la ovariectomía en la estructura de las neuronas piramidales del área CA1 de las ratas hembras, resultando en un decremento de la densidad espinosa de las dendritas y después del tratamiento sistémico con E₂ la recuperación en el número de espinas dendríticas en esta región, estos mismos efectos se observaron a través del ciclo estral, en particular, la densidad de las espinas y de las sinapsis que varía en respuesta a las diferentes concentraciones de E₂ a través de las diferentes etapas del ciclo estral. Otros cambios reportados incluyen, la facilitación de la memoria y aumento en el número de sinapsis espinosas, en roedores y primates (Smith & McMahon, 2005; Mukai et al., 2010;), incremento en la transmisión sináptica mediada por receptores NMDA (Foy, 2001; Smith & McMahon, 2005; Jelks et al., 2007) y en la magnitud de la LTP (Mukai et al. 2010; Smith & McMahon 2006), la expresión de receptores a estrógenos (ERs α y β por sus siglas en ingles) se modula también por el E₂ (Adams

et al., 2004; Jelks et al., 2007). Se muestra una clara influencia en el metabolismo del neurotransmisor GABA, la falta de estrógenos ováricos reduce la síntesis de la subunidad

GABA_A (Morrell, 2002) y el mRNA que regula la enzima GAD para la síntesis de GABA (Ikeda et al., 2006; Zhou et al., 2007), hay estudios que demuestran que el E₂ estimula la formación de sinapsis glutamatérgicas a través de mecanismos dependientes de ER α , (Jelks et al., 2007); la activación de ER β induce cambios morfológicos en neuronas hipocampales que incluyen el incremento de ramas y densidad de espinas (tipo hongo) dendríticas (estudios *in vivo*) mejorando procesos cognitivos como la memoria (Liu et al., 2001), también se propone que los estrógenos producidos de *novo* en el hipocampo tienen un efecto en la espinogénesis mediada por mecanismos indirectos que son regulados endógenamente y paracrinamente (Prange-Kiel & Rune, 2006).

Un reporte de (Smejkalova & Woolley, 2010) demuestra que el E₂ puede potenciar la transmisión excitatoria a través de mecanismos presinápticos por promover la liberación multivesicular del glutamato; un decremento en la densidad de espinas y de las sinapsis fue observada en menos de 24 horas entre el proestro y el estró tardío, al igual que los niveles de E₂ (Woolley & McEwen, 1990, 1992 ; Bi et al., 2001; Marhaham et al., 2005) (Figura 18).

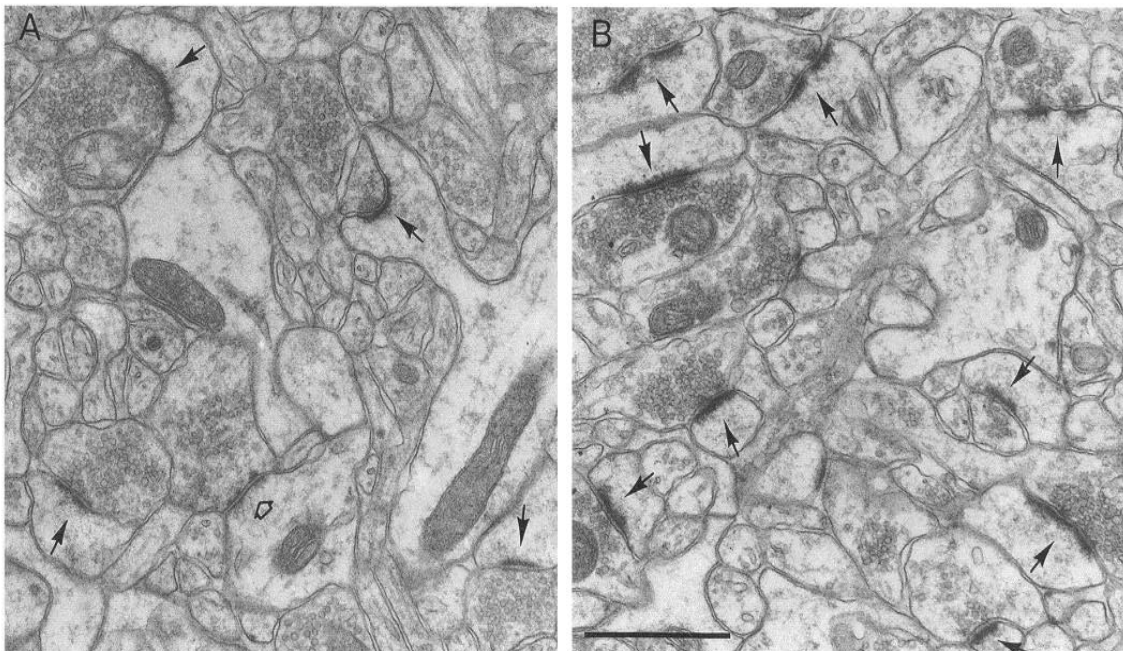


Figura 18. Electromicrografía del *stratum radiatum* de la región hipocámpal. En ratas adultas Ovx (A) que recibieron vehículo y ratas Ovx suplementadas con E₂ (B). Sinapsis con espinas dendríticas (flechas negras) y sinapsis con ramas dendríticas (flecha blanca). Barra= 1 μ m. (Esquema modificado de Woolley & McEwen, 1992).

También se ha reportado una mayor neurogénesis y menor apoptosis en GD en etapa de proestro y en ratas Ovx y OvxE (Tanapat et al., 1999; Patima Tanapat et al., 2005); Así como una variedad de marcadores sinápticos, PSD95, espinofilina y sinaptofisina entre otros que también son regulados por la aplicación de estrógenos sistémicos (McEwen, 1992), confirmando el rol de los estrógenos en la formación y consolidación de las sinapsis.

Kato en el 2013, mostró una fluctuación en las concentraciones de las hormonas esteroideas de E_2 y P_4 a través del ciclo estral siendo mayor en el hipocampo que en plasma, también observó fluctuación de las espinas dendríticas observándose una mayor densidad en Proestro y Diestro 2 (Figura 19), pero la expresión de las enzimas estereoidogénicas ($P450$ y 17β - HSD) así como los receptores esteroideos no cambió significativamente durante el ciclo estral, .

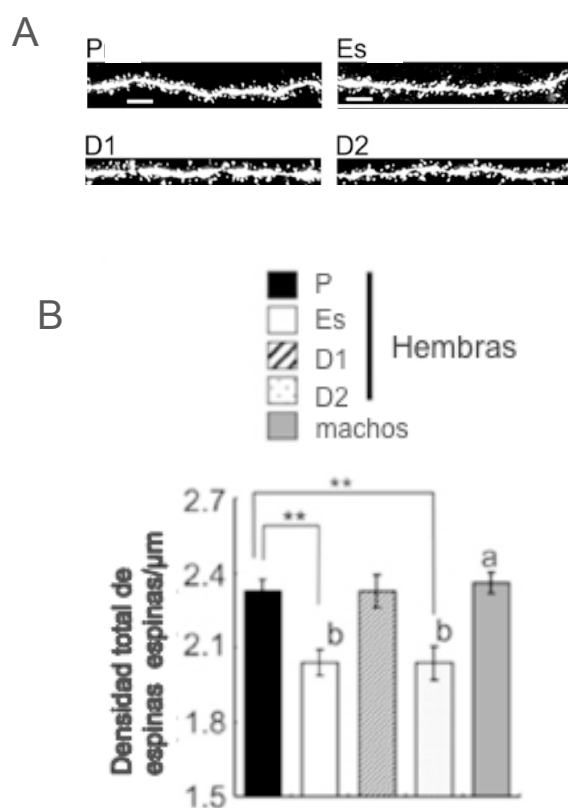


Figura 19. Fluctuaciones cíclicas en la densidad y morfología de las espinas dendríticas a lo largo del ciclo estral en el CA1 del hipocampo. En A, las imágenes de la dendrita en el estrato radial en ratas hembras durante el Proestro (P), Estro (Es), Diestro 1 (D1) y Diestro 2 (D2). En B, el numero total de espinas en los cuatro estados del ciclo estral, comparados con el macho, en donde hubo diferencias significativas entre Est y D2 en relación al Pro, el cual fue similar al total de espinas en el macho. (Esquema modificado de Kato et al., 2013).

Por otra parte se ha visto que el E₂ pueden tener efecto en la plasticidad mediante la estimulación de factores tróficos y/o en la neuroprotección del hipocampo, basada en evidencia experimental sobre modelos *in situ* de animales y celulares *in vitro*; sugiriendo que los estrógenos suprimen el proceso inflamatorio por diversos mecanismos en el SNC (revisión de Woolley, 2007). Este efecto perdura durante la vida adulta y se mantiene constante por ser indispensable para la plasticidad de nuevas conexiones sinápticas. Al mismo tiempo, existe la posibilidad de que el E₂ regule la síntesis de proteínas protectoras contra agentes apoptóticos e influya en el control de respuestas inflamatorias de la microglía reactiva y la función vascular aumentando la perfusión; Se ha visto que la NOS juega un rol en estos mecanismos, la nNOS en la inducción de la LTP, la iNOS modulando la inflamación y la eNOS mejorando la perfusión (Maggi et. al., 2004). Diversos estudios tanto de inmunocitoquímica como de hibridación *in situ* han demostrado la presencia de ER α y β en diversas áreas extra hipotalámicas e inclusive fuera de la localización clásica nuclear. Se ha demostrado la presencia de receptores sobre la región CA1 del hipocampo, asociadas a las mitocondrias, árboles dendríticos y sus espinas sinápticas (McEwen et al., 2001; Milner et al., 2005; Spencer et al., 2008). Se ha demostrado por numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* en donde la aplicación de agonistas y antagonistas del E₂, así como la aplicación de E₂ por vía sistémica o en cultivos celulares por lo tanto se proponen como moduladores de la plasticidad sináptica estructural de manera endócrina y parácrina (Rune & Frotscher, 2005; Zhou et al., 2007),

3.4 Mecanismos de acción

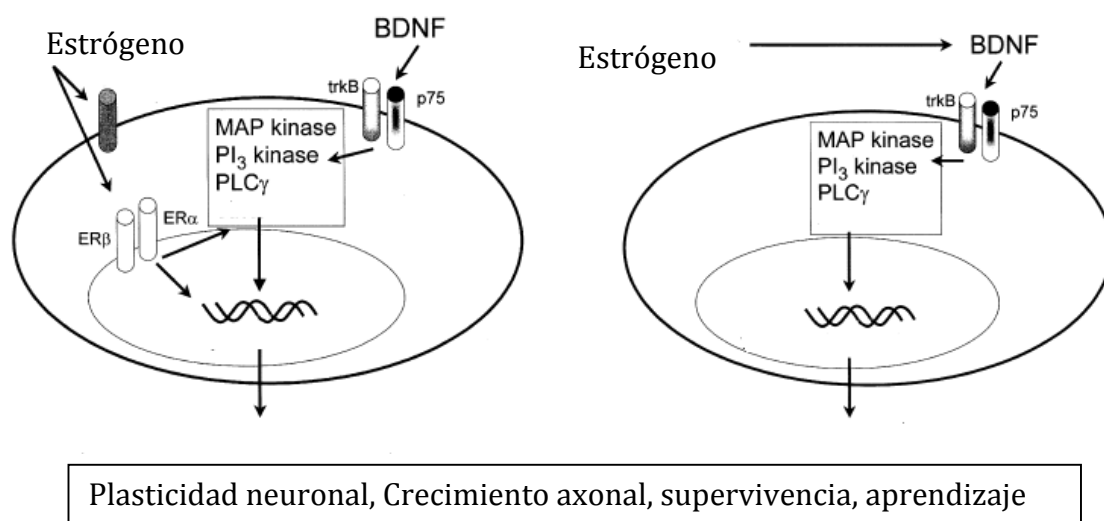
Los estrógenos actúan a través de receptores (ER), los receptores nucleares a estrógenos se dividen en ER α y ER β y se han identificado dos isoformas del ER β (β 1, β 2), se han reportado también receptores de membrana como ER α y ER β además de el receptor GPR30 (7TMR) este es un receptor intracelular transmembranal que actúa de manera independiente e influye en la activación del factor de crecimiento epidermal (EGF). Técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra los receptores revelan la presencia de estas proteínas en el núcleo y citoplasma de neuronas hipocámpales, además se pueden observar tinciones en las dendritas apicales de células piramidales (Prange-Kiel & Rune,

2006). Uniéndose a su ligando deja una cascada de activación que finalmente resulta en la traslocación del receptor al núcleo, induce cascadas de señalización las cuales pueden tener efectos genómicos clásicos asociados a ER; efectos no genómicos, que involucran sistemas de segundos mensajeros y vías de proteínas cinasas; y efectos antioxidantes independientes de receptor (Klinge, 2001).

Las acciones de los estrógenos incluyen diferentes mecanismos tales como la vía genómica que es aquella en la que los estrógenos se unen a las isoformas de los ER, resultando en la regulación de la transcripción de genes. En ausencia de estrógenos los ER son asociados a proteínas de choque térmico en un estado transcripcional inactivo. La unión de 17β - estradiol con su ER produce un cambio conformacional y esto promueve la homodimerización de los ER y en ciertos tejidos la subsecuente traslocación nuclear. En el núcleo el ER actúa como un factor de transcripción uniéndose a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en los promotores de los genes blancos, esto da como resultado el reclutamiento de correguladores específicos y un posterior decremento o incremento de la transcripción de los genes blanco.

En el SNC las acciones no genómicas de los estrógenos han sido estudiados en tres escenarios, en los cuales los estrógenos también tienen efectos genómicos. Estos son: reproducción, neurotrofismo y neuroprotección. Todos los estudios también dejan la especulación de como la naturaleza del receptor media los efectos no genómicos. Existen efectos extremadamente rápidos de los estrógenos sobre la excitabilidad de la membrana, donde los estrógenos son capaces de unirse a receptores específicos en la membrana plasmática, aunque la naturaleza de éstos es aún controvertida. La unión a estos receptores, puede estimular diferentes mecanismos de señalización intracelular, como la apertura de canales iónicos y señalización de neurotransmisores con receptores acoplados a proteínas G, que afecta corrientes de calcio, la activación de cAMP y a la vía de las proteínas cinasas (MAP-kinasas), que actúan sobre sus blancos como el kainato y neurotrofinas o factores de crecimiento como el factor de crecimiento parecido a la Insulina -1 (IGF-1) o el BDNF, (Prange-Kiel & Rune, 2006). Las neurotrofinas son factores de crecimiento críticos para el desarrollo, mantenimiento y restauración de la función del cerebro, se ha propuesto que los estrógenos ejercen efectos sobre el SNC a través de la activación de neurotrofinas. Los estrógenos potencian la expresión de mRNAs de agentes neurotróficos, como el BDNF y el

factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el IGF-1. La habilidad de los estrógenos para activar estas neurotrofinas y sus efectos sobre el mantenimiento y restauración del SNC han sido descritos en varias regiones incluidas el hipocampo (Figura 20). Algunas líneas de investigación sugieren que el E₂ regula la expresión BDNF (Sohrabji et al., 1995). Consistentemente con esta hipótesis las ratas Ovx disminuyen la expresión de RNAm de BDNF en el hipocampo, esto se revierte con la suplementación de E₂ (Singh et al., 2014), esto puede ser debido a que las FM contienen concentraciones altas de BDNF (Scharfman et al., 2008). Un reporte de Smejkalova y Woolley (2010) demuestra que el E₂ es capaz de potenciar la transmisión excitatoria a través de mecanismos presinápticos por promover la liberación multivesicular del glutamato.



Plasticidad neuronal, Crecimiento axonal, supervivencia, aprendizaje

Figura 20. Mecanismos de acción entre la interacción de los estrógenos y el BDNF. Dibujo que muestra los dos mecanismos de acción, izquierda es la convergencia y derecha es Inducción. (Esquema modificado de Scharfman & MacLusky, 2006).

3.5 Relación del óxido nítrico con el hipocampo

El sistema nervioso es especialmente vulnerable al envejecimiento, algunas regiones del cerebro vinculadas a la memoria como el hipocampo, son afectadas por el estrés oxidativo. Estudios en animales sugieren, que tanto las enfermedades neurodegenerativas como las alteraciones cognitivas asociadas a la edad, son reflejo de la vulnerabilidad de ciertas poblaciones neuronales al estrés oxidativo.

Una de las posibles formas de como el SNC obtiene neuroprotección a través de la síntesis de óxido nítrico (NO), es por ser una molécula que tiene participación en la señalización intra e intercelular, además de que presenta un rol en diversos mecanismos fisiológicos y patofisiológicos en varios sistemas (cardiovascular, inmunológico y nervioso); regula el tono de los vasos sanguíneos mejorando la perfusión cerebral, media respuestas inmunes de células inflamatorias, actúa como mediador biológico, similar a los neurotransmisores en las neuronas (Aktan, 2004) de hecho funciona como un neurotransmisor retrógrado en el sistema nervioso periférico y central, además de producir plasticidad sináptica (Brenman & Brecht, 1997; Hardingham et al., 2013; Shepherd & Harris, 1998). Por el otro lado es un radical libre de oxígeno que actúa como un agente citotóxico en procesos patológicos particularmente en desordenes inflamatorios (Alderton et al., 2001; Bogdan, 2001). La sobreproducción de NO independientemente de las concentraciones de calcio intracelulares es debido a iNOS y da como resultado efectos celulares de protección y dañinos (Aktan, 2004).

A partir del descubrimiento de que las neuronas son capaces de sintetizar NO en el SNC, su estudio como mensajero neuronal ha despertado gran interés dependiente de la función de las áreas donde se sintetiza. El NO se forma de la arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la cual oxida al nitrógeno de la arginina liberando NO y citrulina. La NOS es una familia de enzimas (E.C.1.14.13.39) representada por las isoformas, inducible independiente de Ca^{2+} (iNOS) y la constitutiva o dependiente de Ca^{2+} que a su vez, se divide en endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) (Alderton et al., 2001). La iNOS (también conocida como NOS-II, NOS-2 o tipo II) se encuentra principalmente en la glía y no en las neuronas (Saha & Pahan, 2006; Jaffrey & Snyder, 1995), no se expresa bajo condiciones fisiológicas. En condiciones normales eNOS y nNOS se sintetizan en pequeñas cantidades, y juegan un rol en el SN y en la circulación sanguínea (Jesko et al., 2003). La eNOS (NOS-III, NOS-3 o tipo III) se puede encontrar en células endoteliales de vasos sanguíneos y en astrocitos más que en neuronas (Iwase et al., 2000), regula la reactividad vascular en la periferia; nNOS (NOS-I, NOS-1 o tipo I) fue purificada en cerebros de roedores y cerdos, son las isoformas más abundantes en el cerebro (Fagan et al., 1999). Se ha demostrado que tanto la eNOs como la nNOS se expresan en neuronas hipocampales, pero los mecanismos exactos no están bien definidos (Dinerman et al., 1994). Los ER regulan la transcripción de

genes blanco como es el eNOS en una manera específica de la célula por unión del complejo en los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en la región promotora respectiva. Dentro de los efectos no genómicos (rápidos) esta la activación de la MAP cinasa (Singer et al., 1999). Los genes que codifican a la eNOS contienen ERE en su región promotora y son regulados por ER. Las neuronas piramidales de las áreas CA3 y CA1 así como las células granulares en el GD expresan receptores ER α y ER β (Jelks et al., 2007; Shughrue & Merchenthaler, 2000a; Shughrue & Merchenthaler, 2000b; Shughrue et al., 1997), con la expresión nuclear de ER α más fuerte en neuronas piramidales del CA3 que en las del CA1 (Rune et al., 2002). A concentraciones fisiológicas los E₂ inducen la formación de NO en la neocorteza y por lo tanto la vasodilatación mejora la perfusión, la cual finalmente resulta en neuroprotección (Grohé et al., 2004; Pelligrino et al., 1998). El receptor biológico para el NO más estudiado es la guanilato ciclasa soluble citoplasmática que al unirse con en NO forma GMPc e inicia las cascadas de señalización. La transmisión nitrinérgica constituye una nueva y particular forma de neurotransmisión. Por otra parte, estudios recientes de Lourenço et al., (2014), *in vitro* indican que la estimulación de neuronas glutamatérgicas promueve la elevación transitoria del nNOS en cada región del hipocampo (CA1, CA3 y GD) (Figura 21).

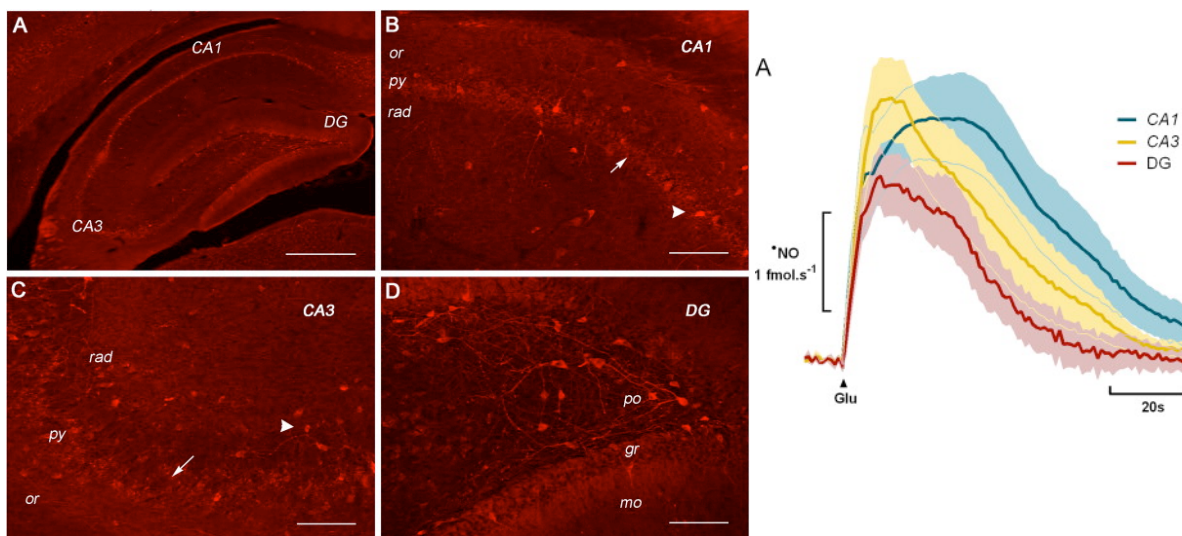


Figura 21. Inmunohistoquímica de la nNOS en el Hipocampo. Izquierda, mostrando las áreas del hipocampo (CA-CA3) y el giro dentado (DG), en B y C las capas de los campos CA1 y CA3 (oriens (or); piramidal (py) y radiatum (rad). En D, el Giro dentado y las neuronas inmunoreactivas a la nNOS en la capa polimorfa (po) del *hilus*, en la capa granular (gr) y extensiones en la capa molecular (mo). Derecha, dinámica del efecto del NO por la activación del glutamato (glu) en cada campo del hipocampo y del giro dentado (DG). (Esquema modificado de Lourenço et al., 2014).

Así, en los murinos, los estrógenos pueden contribuir con cambios bioquímicos por la interrelación entre el NO, los glucocorticoides y las neurotrofinas en el hipocampo estructura clave en los procesos de aprendizaje y memoria de tipo espacial (Maur et al., 2015).

3.6 Formación hipocampal, estrógenos y memoria

Los efectos de las hormonas sexuales tienen especial interés en la FH dada la importancia de esta estructura en la formación de memoria de tipo espacial y episódicas (Spencer et al., 2008) así como su vulnerabilidad a los efectos perjudiciales del envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer (deToledo-Morrell et al., 2007; Foy et al., 2008). Se han hecho pruebas en diferentes especies, paradigmas, tipos de estrógenos, diferentes dosis y diferentes vías de administración, los ratas y ratones son especies en las cuales mejora su desempeño con cantidades de E₂ similares a las de proestro (Daniel, 2006; Korol & Kolo, 2002; Xu & Zhang, 2006). Las pruebas diseñadas para probarlo son reconocimiento de objetos, evitación activa e inhibitoria, condicionamiento de miedo al contexto, laberinto en T, en Y, radial y acuático, entre otros, al menos 48 horas de suplementación con E₂ mejora el desempeño en estas pruebas debido a una mejor consolidación de la memoria después de la ovariectomía (Packard & Theater 1998).

Los efectos conductuales de las ratas en edad reproductiva están marcados por el ciclo estral, las altas concentraciones (proestro) y bajas concentraciones de los estrógenos (estro) dan como resultado cambios en la conducta reproductiva y en las conductas dependientes del hipocampo con resultados controversiales (Spencer et al., 2008), algunos trabajos muestran que altos niveles de E₂ y de P₄ durante el ciclo estral se asocian con un mejor desempeño en la memoria de tipo espacial (Frick et al., 2000), memoria de trabajo (Pompili et al., 2010), y uso de la estrategia espacial (Korol et al., 2004), otros estudios no reportan estas mejoras en pruebas dependientes de hipocampo (Berry et al., 1997; Markham et al., 2002; Sutcliffe et al., 2007; Walf et al., 2006; Warren & Juraska, 1997), que pone de manifiesto la dificultad de evaluar por medio de la conducta los efectos de la rápida fluctuación de los niveles hormonales en el hipocampo.

Existe cierto consenso en la literatura, al evaluar el aprendizaje y memoria de animales ovariectomizados y suplementados con E_2 , observándose un mejor desempeño en pruebas dependientes del hipocampo (Frick, 2009; Gibbs, 2010). Tanto en ratas y ratones envejecidos también se observa una disminución de la memoria dependiente de hipocampo, en particular, de la memoria de tipo espacial en una prueba de laberinto acuático de Morris (LAM), estos efectos se presentan antes en las hembras que en los machos y la aparición de esta pérdida de memoria espacial prematura en las hembras coincide con la pérdida hormonal (Frick, 2009), en efecto también la expresión de los ER α y β se reducen en el hipocampo envejecido de la hembra (Adams et al., 2002; Mehra et al., 2005; Waters et al., 2011) y las respuestas plásticas de las neuronas piramidales CA1 al E_2 (por ejemplo, la densidad de las espinas dendríticas y el número de los receptores NMDA). Además, la supresión de cualquiera de los dos receptores pueden afectar la memoria de referencia espacial en el laberinto acuático de Morris (Fugger et al., 2000; Rissman et al., 2002). Se ha demostrado que la suplementación pueden mejorar o retrasar la presentación de daños en la función cognitiva en modelos animales y humanos (Luine, 2008).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe abundante información acerca de la importancia de los estrógenos en el SNC y de su influencia en las funciones y plasticidad del hipocampo. Esta plasticidad se debe a que el hipocampo es un blanco funcional que responde de manera directa a cambios en el medio ambiente, el estrés, la edad y el aprendizaje, regulada, entre otros factores por las hormonas sexuales, entre éstas los estrógenos como el estradiol (E_2). En los animales murinos de experimentación, se sabe que pueden contribuir con cambios bioquímicos, en la estructura, distribución y número de sinapsis, lo que sugiere una relación entre los cambios morfológicos y la formación de la memoria. En la rata adulta, se han reportado cambios plásticos por la influencia del E_2 durante el ciclo estral y en animales ovariectomizados (Ovx) y suplementados con E_2 (Ovx E), en el campo CA1 y en el GD, pero hasta el momento hay poca información sobre cambios plásticos morfológicos en el sistema de fibras musgosas (FM), cuyo contenido en zinc es importante. Además se sabe poco de la influencia de los estrógenos durante el ciclo estral en el área CA3 del hipocampo. Por lo tanto, la finalidad de este trabajo es determinar la influencia que tienen los estrógenos en la actividad de la NOS constitutiva como un índice de neuroprotección y /o plasticidad así como en la organización anatómica y la conectividad sináptica de las FM; durante las diferentes etapas del ciclo estral de la rata adulta y en las ratas Ovx y los posible efectos funcionales por la suplementación con E_2 .

IV. HIPÓTESIS

1. Se producirán cambios en la actividad de la NOS constitutiva, en la organización anatómica y en conectividad sináptica de las diferentes etapas del ciclo estral, siendo mayores los cambios en la etapa de proestro, y menores en la de estro.
2. En ratas ovariectomizadas se observará una disminución de la NOS constitutiva, de la organización anatómica y de la conectividad sináptica, y se observará una recuperación con la suplementación de 10 µg de Benzoato de estradiol, observándose un mejor desempeño en una tarea de tipo espacial.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de 17β - estradiol en la actividad de la NOS constitutiva, el contenido de zinc, el área de las FM y el número de sinapsis en las tres fases del ciclo estral: Diestro (D), Proestro (P), Estro (Es), en animales ovariectomizados (Ovx) y suplementados (OvxE) con una dosis adecuada de benzoato de estradiol, así como el comparar el desempeño de una tarea conductual entre ratas Ovx, y OvxE.

V.I. OBJETIVOS PARTICULARES

V.I.1 Incubación de 500μ

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. Sujetos

Se utilizaron ratas un total de 134 hembras adultas de la cepa Sprague - Dawley, de 70-90 días de edad (270-290g), tratados de acuerdo a los lineamientos de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH y aprobado por el comité de bioética del INB-UNAM. Durante el tiempo que duró el experimento las ratas fueron alojadas de 2 o 3 animales por caja de policarbonato (45x24x21 cm) con suficiente material de anidación, adecuada limpieza además de agua y alimento (Purina Chow, formula No. 5001) *ad libitum*. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de ciclo luz invertido (12 hrs luz – 12 hrs oscuridad; la luz se encendía a las 21:00 hrs) la temperatura entre 22-23°C y humedad relativa de 40-50%. En cada animal, se tomaron frotis vaginales entre 9:00 y 10:00 am y después de tres frotis seriados se determinó la etapa del ciclo estral en cada uno de los 3 grupos estudiados en: 1. Proestro; 2. Estro y 3. Diestro.

VI.2. Cirugía

Para formar los grupos de animales ovariectomizados (Ovx), se extrajeron quirúrgicamente los ovarios, bajo anestesia con una combinación de los anestésicos Xilazina-Ketamina (30%-/70%), dosis de 1ml/kg; xilacina de Procin, PiSA A099884 y ketamina, Cheminova salud animal KTCHH11L05) mediante procedimientos asépticos. Todas las ratas operadas, recibieron ketofen (2 x 1 mg por día) por vía subcutánea durante tres días después de la cirugía para aliviar el malestar y se alojaron dos o tres animales por jaula. El periodo de recuperación fue de dos semanas y luego se formaron cada uno de los grupos para suplementar el E₂ (una inyección por día, durante tres días). La ovariectomía se verificó mediante inmunoensayo para determinar los niveles de E₂ en plasma (Beltrán-campos et al., 2010). Los niveles en sangre de E₂ en animales Ovx ($18,1 \pm 2,43$ pg / ml) se determinaron 15 días después de la cirugía. A pesar de que el método de ELISA no es suficientemente preciso para determinar el nivel de E₂ en sangre, las medidas obtenidas fueron inferiores a los reportados durante el proestro, lo que indica que la ovariectomía fue eficaz en la reducción de los niveles circulantes de E₂. Por otra parte, la ovariectomía se verificó cuidadosamente por inspección visual. La suplementación se hizo con inyecciones subcutáneas de benzoato de estradiol 17 β - estradiol (E₂) en un volumen total de 0.2ml/rata. El benzoato de estradiol (10 μ g/rata 3-Benzoato de β -Estradiol Sigma Aldrich. 5 g) se administró 2 días antes de la prueba conductual, mientras que la progesterona se hizo con inyecciones subcutáneas de pregnona (500 μ g/rata; 4 Pregnona-3, 20 diona Sigma Aldrich. 25g) se administró junto con el E₂. Las inyecciones siempre se administraron a la misma hora (9-10 am).

VI.3 Desarrollo de los objetivos particulares

VI.3.1 Objetivo particular 1 (Dosis)

La dosis adecuada se estableció midiendo la plasticidad de las FM; se midió el área del *SL* mediante la técnica de Timm (se describirá en el objetivo 4) se administraron diferentes dosis a un total de 12 ratas Ovx por vía subcutánea a la altura de las vértebras sacras con jeringa de 1 ml. Para evitar el estrés durante la inyección, los animales fueron manipulados gentilmente. Se aplicaron tres diferentes concentraciones de estrógenos (Ovx, E10, E50 y PG) y se formaron los siguientes grupos n = 3 hembras:

Grupo Ovx suplementado con vehículo (aceite vegetal) 0.2ml.

Grupo E10 suplementado con 10 µg de benzoato de estradiol.

Grupo E50 suplementado con 50 µg de benzoato de estradiol.

Grupo PG suplementado con 500 µg de Progesterona / 10 µg benzoato de estradiol.

Se comprobó que la dosis de 10 µg de Benzoato de estradiol fue la que generó mayor plasticidad en la rata, por lo tanto se utilizó para el desarrollo de los demás objetivos.

VI.3.2 Objetivo particular 2 (Análisis de la Actividad de la cNOS)

Análisis de la actividad de la cNOS dependiente de Ca^{2+} en el hipocampo se llevó a cabo midiendo la conversión de L-arginina en NO y L-citrulina. El hipocampo de 6 animales por grupo fue homogenizado en tampón (50 mM de Tris-HCl, EDTA 0,1 mM, 0,1 mM EGTA, 0,1% y B-mercaptoetanol, pH 7.5), que contiene un cóctel de inhibidores de proteasas y 0.1% (v/v) de Nonidet P-40. Se incubaron 500 microlitros de proteína 30 minutos a 37°C en presencia de 10 mM de L-arginina-HCl, 1 mM de NADPH, 100 nM de calmodulina, 30µM de tetrahidrobiopterina, 2.5 mM CaCl_2 y 0.2 mCi de [^3H] L-arginina. Para probar la actividad de iNOS, las incubaciones se realizaron en presencia de 1 mM de EGTA y CaCl_2 no se añadió. La mezcla de reacción se aplicó a una columna (Dowex-50W), que retiene [^3H] L-arginina. La cantidad de [^3H]-L-citrulina se midió utilizando un contador de centelleo Beckman LS6500. Los resultados se expresaron como ng L-citrulina/500 mg proteína/30 min (Aguilera et al., 2007).

VI.3.3. Objetivo particular 3 (Determinación del Zinc)

La determinación de zinc se llevó en 30 animales 6 por cada etapa del ciclo estral (D, P, Es) y en los grupos Ovx y OvxE (suplementado con 10µg de benzoato de estradiol) para la determinación del contenido del zinc en el hipocampo, el cual se separó del cerebro tan rápidamente como fue posible y se colocó en tubos previamente lavados con una solución de ácido nítrico al 30% para evitar la contaminación externa. Todo el hipocampo se pesó en fresco, se registraron los datos y se les agregó 1 ml de ácido nítrico redestilado a las muestras. Los tubos cuidadosamente tapados se colocaron en baño de agitación a 60 ° C por

30 minutos. El zinc fue medido en la solución resultante en un espectrofotómetro de absorción atómica equipado con un horno de grafito y corrección Zeeman fondo (Analyst 600, Perkin Elmer). El equipo fue calibrado previamente con una solución de zinc comercial (Perkin Elmer GFAAS estándar mixto). El control de calidad se aseguró mediante la determinación de zinc en una matriz biológica basada en material estándar (1577b bovino hígado, NIST); la sesión de análisis se consideró adecuada cuando el estándar de calidad de control fue del 95-105% de su valor nominal. Los resultados se expresan como mg de zinc por gramo de tejido húmedo (Montes et al., 2008).

VI.3.4. Objetivo particular 4. Área de las FM

El área de las FM, se midió en un total de 30 animales 6 por cada grupo (D, P, Es, Ovx, OvxE), se midió el área del haz suprapiramidal de las FM, teñidas con la técnica histológica de Timm. Se perfundieron por vía intracardiaca previa anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/k), con una solución de sulfuro de sodio al 0.4% pasando un total de 1ml/g. La perfusión se continuó con fijador de “Karnovsky (1.0% de paraformaldehído y 1.25% de glutaraldehído en 0.1M de solución de fosfatos a un pH 7.4) (West et al., 1981). Los cerebros fueron extraídos y para su crioprotección se colocaron en frascos con una solución de Karnovsky con sacarosa al 30% se mantuvieron en el refrigerador por 72 horas o hasta que el tejido bajó al fondo del frasco. Una vez fijados se procedió a cortar por congelación en secciones coronales de 40 μ m. Las secciones fueron colectadas en estricta seriación y procesados usando una modificación de la técnica de Timm sulfuro de plata (Cintra et al., 1997). Este método se basa en la conversión del zinc a sulfuro de zinc de los botones gigantes de las terminales nerviosas de las FM, sobre las cuales se deposita el nitrato de plata cuando los tejidos son puestos en una solución que contiene un estabilizador (goma arábiga) un agente reductor que precipita la plata (hidroquinona) (Danscher & Zimmer, 1978).

El haz de las FM que corresponde al área del *SL* se estimó en secciones del hipocampo dorsal, cada quinta sección. La primera, se obtuvo a partir de una posición inicial aleatoria dentro de los primeros cinco cortes de la serie montada. Para cada sección,

de los límites del haz suprapiramidal se definieron de acuerdo con (Amaral & Dent, 1981; Gaarskjaer, 1985), el área fue determinada en el hipocampo derecho (Figura 22).

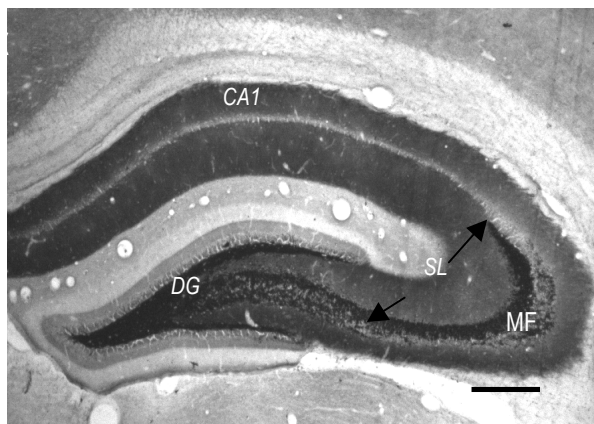


Figura 22. Corte coronal de hipocampo dorsal. Representativo usado para estimar el área de las FM en el SL (flechas negras). También se muestra el área del giro entado (DG) y zona CA1; barra, 300 μm .

La captura de las imágenes se realizó con una cámara digital acoplada a un microscopio fotónico a través de un objetivo 4 x y analizadas con el programa Ip Lab. Se eligió el primer corte dentro de las primeras 5 secciones del hipocampo y después cada 160 μm de separación entre los cortes siguientes hasta capturar seis imágenes por animal. Se delimitó el área correspondiente a las FM con el programa Image "J". El área obtenida (en μm^2) fue corregida considerando la contracción del tejido (SFV). Para este propósito, una sección coronal de la formación del hipocampo se obtuvo inmediatamente después de la perfusión usando un microtomo de congelación. El SFV se calculó para estas áreas utilizando el método descrito por Van Eden & Uylings (1985).

VI.3.5. Objetivo particular 5. Análisis de la ultraestructura sináptica

El análisis de la ultraestructura sináptica se realizó por microscopía electrónica en cuatro grupos: P, Es, Ovx y OvxE y en 3 animales por grupo, cada uno se perfundió previa anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/kg) por vía intraperitoneal, con solución salina al 0.9% 1ml/g, seguido de una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1.5 % en una solución de 0.1M de buffer fosfatos a pH 7.4, se posfijaron 2 horas más en la misma solución fijadora y se dejaron en buffer de fosfatos para ser cortados en rebanadas

coronales de 400µm en vibratomo (marca Vibratome 3000). Se separó el hipocampo dorsal según las coordenadas del atlas de Paxinos & Watson, (1982) (-3.3 Bregma), se localizó el área CA3 y cada bloque se fijó en una solución de glutaraldehído al 5% y tetróxido de osmio (Ted Pella Inc.) al 2%; posteriormente se deshidrataron en etanol a concentraciones crecientes (50%, 70%, 80%, 90%, 96% y alcohol étílico absoluto) manteniendo la orientación del tejido. La inclusión en resina del tejido se inició con una primera polimerización en plano dejándolos 24 horas para luego pegarla en una cápsula Beem, con una segunda re polimerización. Para ubicar el área de estudio, se efectuaron cortes semifinos con una cuchilla de vidrio en el Ultramicrotomo (Reichert Um03) para lo cual el tejido se separó de la cápsula y se redujeron los bordes para su orientación. Una vez lograda la orientación correcta y paralela de la capa de células piramidales del CA3, se obtuvieron los cortes finos a 90 nm en el mismo ultramicrotomo pero solo cambiando la cuchilla por la de punta de diamante. Estas secciones fueron colocadas en rejillas para ser contrastadas con acetato de uranilo y dejadas en citrato, finalmente fueron teñidas con azul de toluidina en una solución de Borato al 0.1M pH alcalino. Cada corte fue observado en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100 B (operado a 60-80 KV) y las imágenes se obtuvieron con una cámara acoplada modelo ORIUS de Gatan con resolución de 0.25nm. El Análisis de imágenes capturadas a través del microscopio electrónico se llevó a cabo primero eligiendo el área del CA3 en los cortes semifinos del hipocampo donde se identificó una célula piramidal en donde se mostraba la dendrita apical con el área de las excrescencias espinosas en el *SL* (Figura 23), y se tomaron seis campos diferentes obteniéndose imágenes a 5,000 x; 10,000 x y ampliaciones a 25,000 x y 30,000 x. Sobre las imágenes de 10,000 x, se realizaron conteos de sinapsis y mitocondrias cercanas a las sinapsis en 6 campos diferentes de tres animales con el mismo tratamiento con el programa Image “J”.

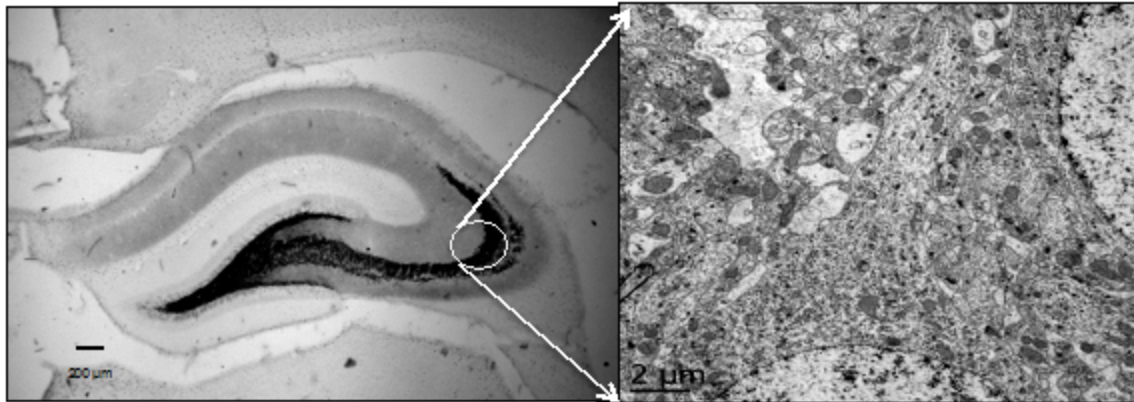


Figura 23. Corte coronal representativo del HD (Izquierda). En el cual se observa el área de FM (negro), y el lugar donde se hicieron los cortes semifinos y finos (círculo blanco), del *stratum lucidum* (SL). Barra = 200 micrómetros. Derecha identificación de la dendrita apical en la neurona piramidal (d). Aumento 5000x.

VI.3.6. Objetivo

particular 6. Suplementación de estrógenos en una prueba espacial laberinto acuático de Morris (LAM)

Comprobar el efecto de la suplementación de estradiol en la prueba espacial de LAM. Se formaron dos grupos más de ratas ovariectomizadas cada uno de 10 animales, con (OvxE) y sin suplementación de estrógenos (Ovx) después de la recuperación de la cirugía y suplementación, los dos grupos de animales se sometieron a una tarea de aprendizaje espacial en el LAM y la captura de cada ensayo se llevó a cabo mediante un sistema informático de seguimiento de Poly-track (San Diego Instruments), que controlan y registran la trayectoria de natación de las ratas para su posterior análisis. El laberinto consta de un tanque de plástico negro (1.5 m de diámetro y 45 cm de profundidad) cuyo nivel de agua fue de 26.5 cm. La temperatura del agua se ajustó a 25° C (\pm 0.5°C). Se colocó una plataforma cuadrada, de 10 cm por lado de acrílico transparente en el tanque, en una ubicación fija en el centro de un cuadrante imaginario y sumergida 1.5 cm bajo el agua. El tanque ubicado en una habitación separada, iluminada por luz blanca, y rodeada por 4 claves espaciales en la pared (Figura 24). Las ratas aprendieron a navegar a la plataforma guiándose mediante señales visuales en las cercanías del tanque (1,5 - 3 m) para escapar del agua.

El paradigma de LAM consistió en 2 sesiones idénticas una por día (LAM1 y LAM2) de 10 ensayos cada uno. Cada animal fue introducido en la piscina en diferentes puntos de partida para cada ensayo de manera aleatoria y constante para todos los animales (Ramírez-Amaya et al 2001). A cada animal se le permitió nadar hasta encontrar la plataforma, en el primer ensayo, si el animal no encontró la plataforma durante el límite de tiempo (60 s), se le guió a la plataforma con la mano y luego se colocó en una jaula de espera durante 30 s. La latencia de escape se midió en cada ensayo para cada animal. La memoria se midió 24 h después de la última sesión de entrenamiento (LAM2), una sesión de un solo ensayo se realizó en las mismas condiciones de la tarea de aprendizaje; pero sin plataforma de escape; el parámetro medido fue el tiempo que la rata tardó en llegar al área donde se encontraba la plataforma.

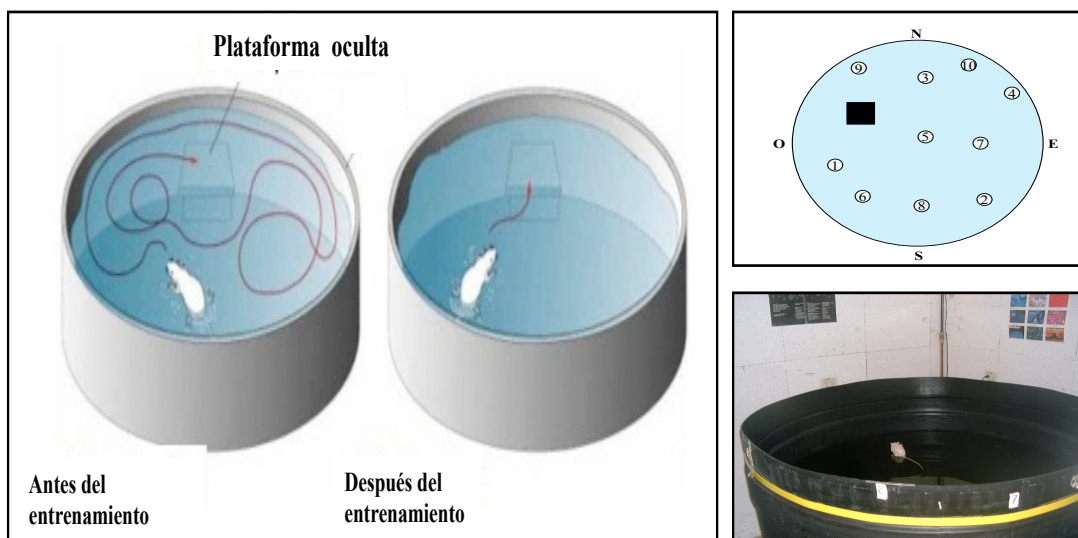


Figura 24. Esquema del laberinto acuático de Morris (LAM) (izquierda). En donde se indica una plataforma oculta, la rata nada de manera aleatoria antes del entrenamiento y después del entrenamiento la rata alcanza la plataforma rápidamente. A la derecha abajo el tanque utilizado en las sesiones de aprendizaje y memoria de LAM y se observa a la rata sobre la plataforma oculta y dos de las pistas en las paredes y arriba se muestra el esquema de los 10 puntos de salida utilizado en las sesiones y el rectángulo negro, indica, el lugar donde se localizó la plataforma.

VI.4. Análisis estadístico

Para el análisis de las variables: Actividad de la NOS, cantidad de zinc, área de las FM y densidad sináptica se realizó un ANOVA factorial de una vía seguida de la prueba *post hoc* de Fisher utilizando el programa Stat View tomando como nivel de significancia $P < 0.05$. Para la prueba del LAM, se hizo un ANOVA de medidas repetidas seguida de las pruebas *post hoc* de Fisher. La memoria se analizó midiendo el tiempo de llegada al área donde se encontraba la plataforma, se utilizó la prueba de t-student no pareada entre los grupos Ovx y OvxE. Los resultados se consideraron estadísticamente significativas con una $p \leq 0.05$.

VII. RESULTADOS

VII. 1. Análisis histológico en grupos con dosis diferentes de suplementación

Primero se analizó el área de las FM en el *SL* con la tinción de Timm en un grupo de animales con una $n=3$ por grupo para comprobar la dosis adecuada. El grupo suplementado con $10 \mu\text{g}$ de Benzoato de estradiol (E10) presentó la mayor cantidad de área de FM en el *SL* al compararlo con el grupo Ovx (Figura 25).

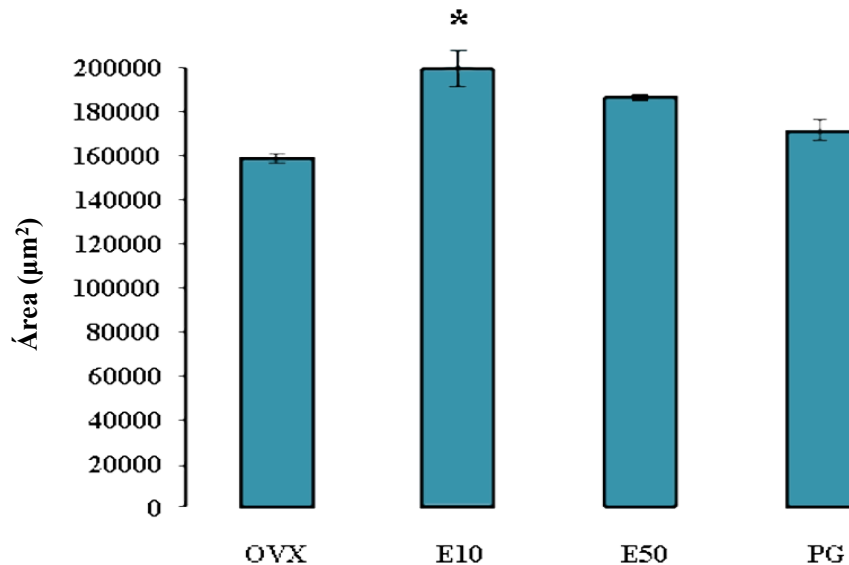


Figura 25. Área (Dosis). Gráfica en la que se muestran los valores promedio \pm E.E. de 3 animales por grupo. Ovx, Ovariectomizadas, E10, suplementadas con $10 \mu\text{g}$ de benzoato de estradiol, E50, suplementadas con $50 \mu\text{g}$ y PG, suplementadas con $P_4 500 \mu\text{g} + 10 \mu\text{g}$ de benzoato de estradiol. Se indica con un asterisco la diferencia significativa ($p < 0.01$) del incremento del área de las FM, comparado con el grupo Ovx. ANOVA factorial, seguida de la prueba *post hoc* de Fisher.

VII.2. Efecto del 17β - estradiol en la actividad de la NOS constitutiva

La ANOVA factorial de una vía de la NOS constitutiva o dependiente de la actividad de Ca^{2+} (eNOS / nNOS), muestra diferencias estadísticamente significativas ($F_{4, 19} = 4.104$; $p = 0.0146$), la prueba *post hoc* de Fisher muestra diferencias entre el grupo estro comparado con el grupo proestro, ($p = 0.0050$), del grupo Ovx comparado con el grupo proestro ($p = 0.0030$) y con el grupo OvxE ($p = 0.03$). También se observan una recuperación del grupo OvxE ya que no se encontraron diferencias significativas con el grupo proestro. ver Figura 27.

Cabe señalar que se midió la NOS inducible independiente de Ca^{2+} y no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos.

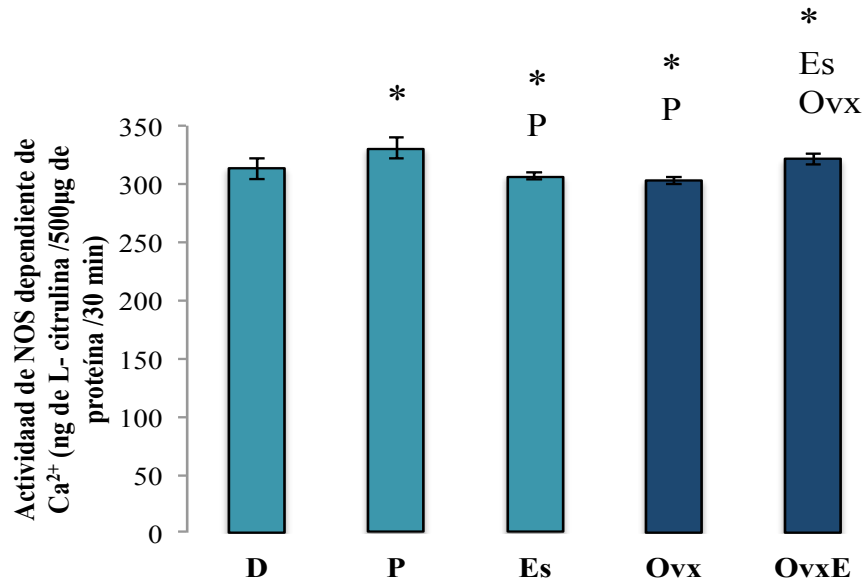


Figura 26. Actividad de NOS dependiente de Ca^{2+} Gráfica en la que se muestran los valores promedio \pm E.E. de 10 animales por grupo de la actividad de la sintasa del óxido nítrico constitutiva dependiente de calcio (NOSc). Se observan diferencias estadísticas. El asterisco (*) indica una diferencia estadística de $p < 0.01$. D, Diestro, P, Proestro, Es, Estro, Ovx, ovariectomizadas y OvxE ovariectomizadas suplementadas con E_2 . ANOVA factorial seguida de la prueba *post hoc* de Fisher.

VII.3. Análisis de la cantidad total de zinc en el hipocampo

Se determinó la variación del contenido de zinc en el hipocampo por espectrofotometría de masa atómica, y a través del ciclo estral (D, P, Es) y en animales Ovx y OvxE. El ANOVA factorial de una vía mostró diferencias estadísticas ($F_{4,25} = 4.879$; $p = 0.0048$) entre los grupos, y el análisis *post hoc* de Fisher que los grupos diestro ($p = 0.0383$), Es ($p = 0.0015$), y Ovx ($p = 0.009$) son diferentes al grupo proestro. Por otro lado, el contenido de zinc del grupo OvxE fue significativamente mayor ($p = 0.0395$) con respecto al grupo Ovx. (Figura 27).

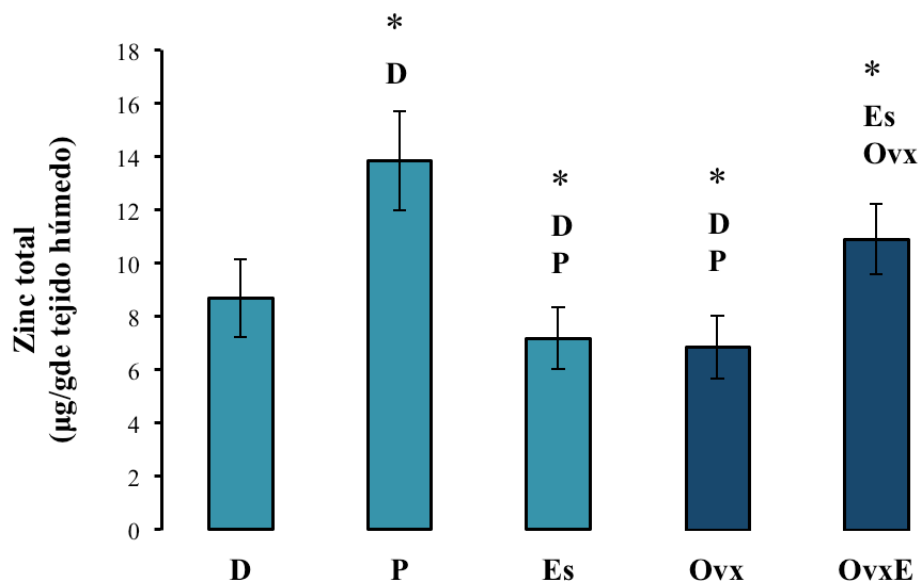


Figura 27. Contenido total de zinc. Gráfica en la que se muestran los valores promedio \pm E.E de 10 animales por grupo del contenido total de zinc. Las barras representan la cantidad de zinc en el hipocampo de los cinco grupos: D, Diestro, P, proestro, Es, estro, Ovx, ovariectomizadas y OvxE, suplementadas con E₂. El asterisco (*) indica una disminución de zinc en los grupos D, Es, y Ovx comparado con el grupo P. Se observa un incremento en el grupo OvxE comparado con los grupos Ovx y Es. ANOVA factorial seguida de la prueba *post hoc* de Fisher.

VII. 4. Análisis histológico

Se realizó una ANOVA factorial de una vía para analizar el efecto del E₂ en el área de las FM del SL en los diferentes grupos ($F_{4, 25} = 4,633$, $p = 0.0062$). En la fase de estro se observó una disminución significativa ($p = 0.0031$) del área de las FM en comparación con los animales del grupo P y OvxE. El grupo de animales Ovx también tuvo una disminución en el área de las FM comparado con el grupo P ($p = 0.0007$); y la suplementación con E₂ revirtió la pérdida del área de FM. (Figura 28).

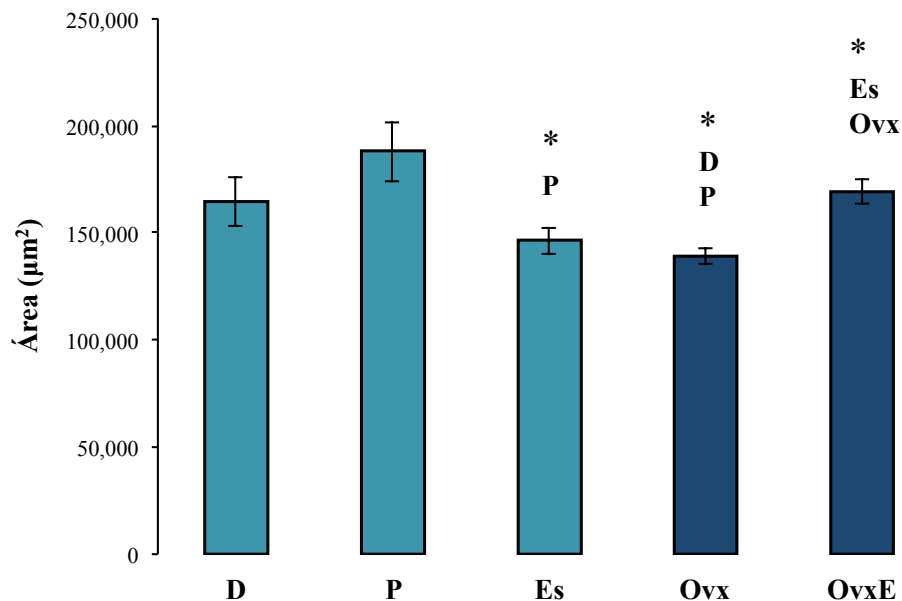


Figura 28. Área. Gráfica en la que se muestran los valores promedio \pm E.E de 6 animales por grupo. Las barras representan los cinco grupos comparados: D, Diestro, P, proestro, Es, estro, Ovx, ovariectomizadas y OvxE suplementadas con E₂. Los asteriscos (*) indican una disminución significativa en los grupos Es y Ovx comparados con el grupo P. También se observa un incremento significativo ($p < 0.01$) del grupo OvxE comparado con los grupos Ovx y Es. ANOVA factorial seguida de la prueba *post hoc* de Fisher.

En la figura 29 se muestran imágenes de cortes coronales del *Sl* representativos de cada una de las etapas del ciclo estral y de ratas Ovx, OvxE del hipocampo dorsal, obtenidas mediante la técnica de TIMM y microscopio de luz.

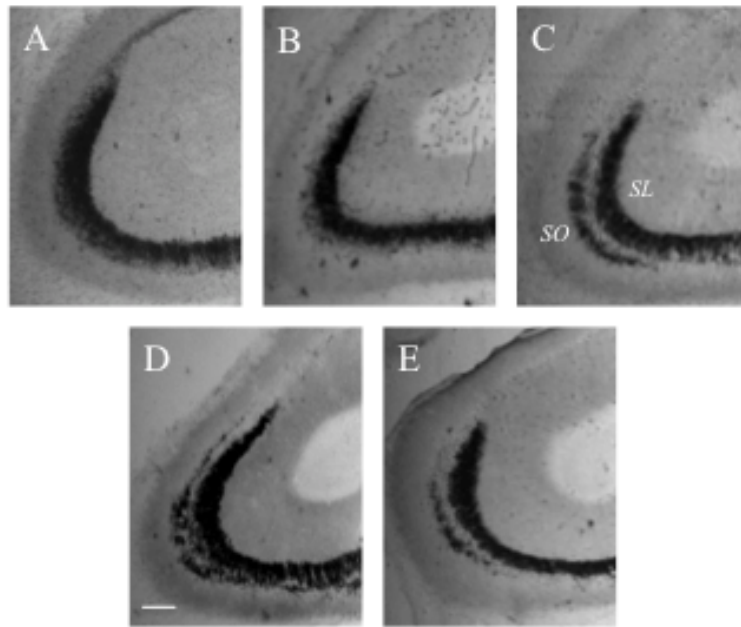


Figura 29. Imágenes representativas del *Stratum lucidum* (SL) de cada uno de los grupos. Se observa el área de las FM en negro, correspondiente al zinc precipitado en los botones gigantes, en A rata en Diestro, B, Proestro, C, Estro, D, Ovx y E, OvxE. También se aprecia una otra banda en el *Stratum oriens* (SO). Barra = 200 μm .

VII.5. Ultraestructura, densidad sináptica

Se decidió quitar el grupo diestro ya que no hay diferencias anatómicas con el grupo proestro. Se realizó una ANOVA factorial de una vía. ($F_{3,40} = 9.176$; $p < 0.0001$) con la finalidad de demostrar el efecto del E_2 en la cantidad de sinapsis en $1.828 \mu\text{m}^2$ del SL del área CA3 del hipocampo. Los resultados muestran una disminución en el número de sinapsis en los grupos Es y Ovx comparado con el grupo P, en ratas OvxE se observó una restitución de las sinapsis (Figura 29).

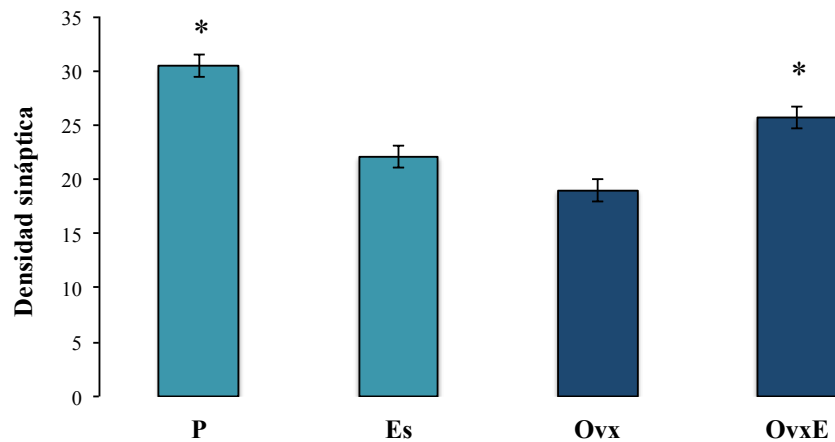


Figura 30. Densidad sináptica. Gráfica en la que se muestran los valores promedio \pm E.E de 3 animales por grupo. Las barras representan la cantidad de sinapsis en cada grupo, P, proestro, Es, estro, Ovx, ovariectomizada, OvxE, Ovariectomizada suplementada con E_2 . El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.01$) con respecto a los tres grupos. No se encontraron diferencias entre los grupos Es y Ovx. ANOVA factorial seguida de prueba *post hoc* de Fisher.

En la Figura 30 se muestran fotomicrografías representativas obtenidas en el microscopio electrónico de transmisión (MET) de cada uno de los grupos analizados (P, Es, Ovx, y OvxE). Se puede apreciar las sinapsis como zonas electrodensas que en muchas ocasiones se muestran cerca de ellas vesículas grises asumiendo que tienen en su interior glutamato y zinc; las cuales corresponden a botones de las FM y también se pueden apreciar múltiples mitocondrias. Se puede observar claramente que en el grupo proestro (A), una mayor cantidad de sinapsis, es evidente como el número de sinapsis disminuye 12 horas después durante la etapa de estro (B); también se puede apreciar la pérdida de zonas electrodensas, en las sinapsis del grupo Ovx (D) y la restitución parcial después de la suplementación con E_2 (C).

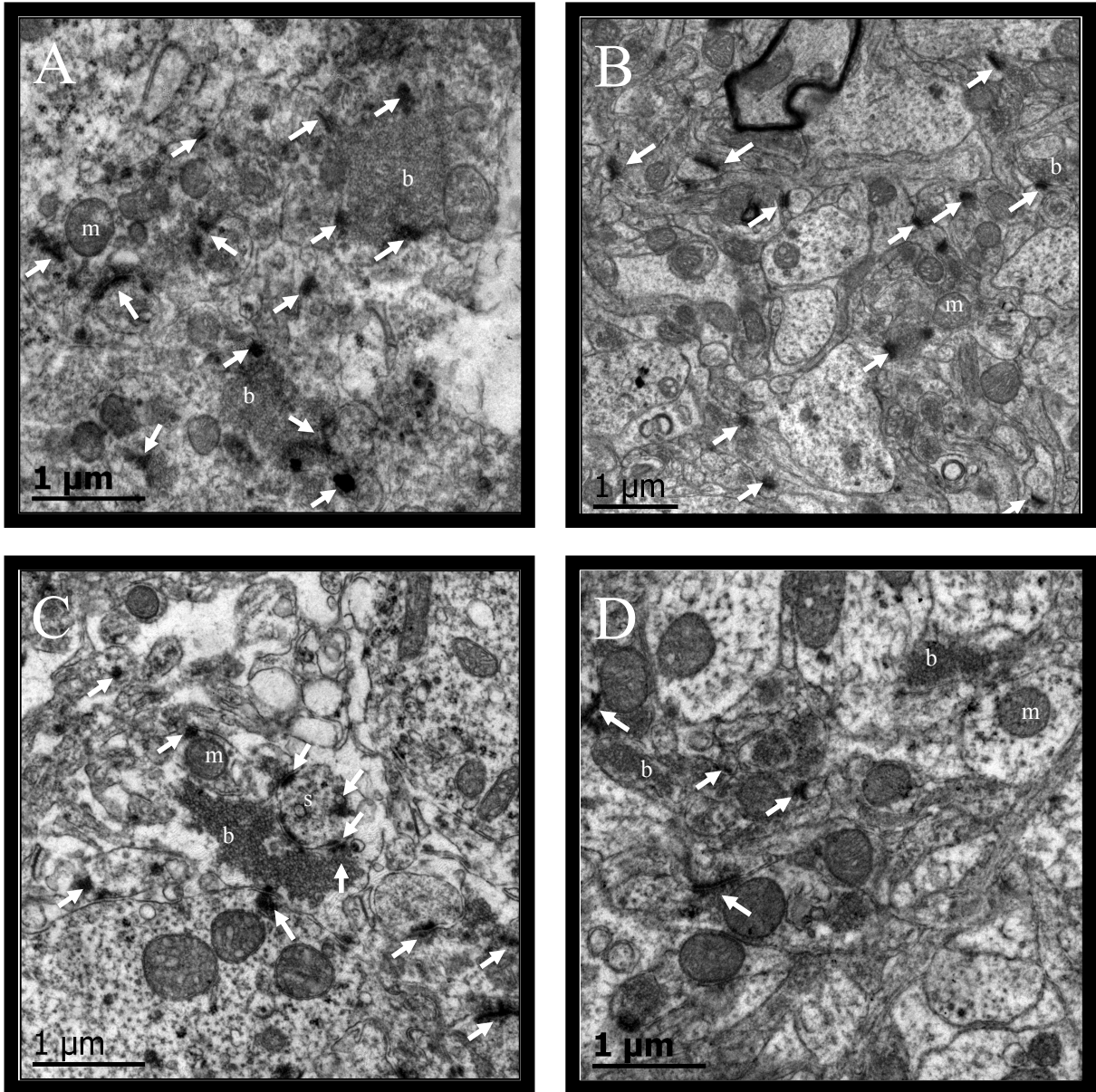


Figura 31. Fotomicrografías de imágenes representativas tomadas con el microscopio electrónico de transmisión. Las imágenes corresponden al primer tercio de la dendrita apical de las células piramidales del SL del CA3. En A, se indica el grupo en proestro; en B, grupo en estro, en C, grupo OvxE y D, grupo Ovx. Se observan botones (b), mitocondrias (m) y zonas electrodensas correspondientes a las sinapsis (flechas blancas). Se aprecia una menor cantidad de sinapsis en estro y Ovx, respectivamente. Aumento 10,000 x. Las barras indican 1 μ m.

VII. 6. Prueba de comportamiento en Ovx y OvxE (aprendizaje y memoria)

Los resultados de los dos días de ejecución en el laberinto acuático de Morris (LAM) fueron analizados con ANOVA factorial y de medidas repetidas (tiempo x tratamiento) seguido de un análisis *post hoc* con la prueba de Fisher. En la Figura 30 se observa la latencia de llegada a la plataforma de los grupos Ovx y OvxE, las ratas en ambos grupos reducen el tiempo de latencia para alcanzar la plataforma (Día 1: $F_{9,180} = 2.237$ y $p = 0.0034$; Día 2: $F_{19,180} = 2.515$ y $p = 0.00084$). Sin embargo, la comparación entre los grupos mostró que las ratas Ovx tomaron más tiempo para encontrar la plataforma que las ratas OvxE en los ensayos 9 y 10 del día 1. Este efecto fue más evidente en la sesión del día 2, alcanzando significancia estadística en los ensayos 5 y 7 – 10 ($p < 0.05$). Los resultados demuestran que el grupo OvxE presenta diferencias estadísticas entre los ensayos 1vs10 ($p = 0.042$) 1 vs 5 ($p = 0.0216$) indicando que este grupo aprendió la tarea en contraste con el grupo Ovx que exhibió deficiencias en esta prueba de aprendizaje espacial.

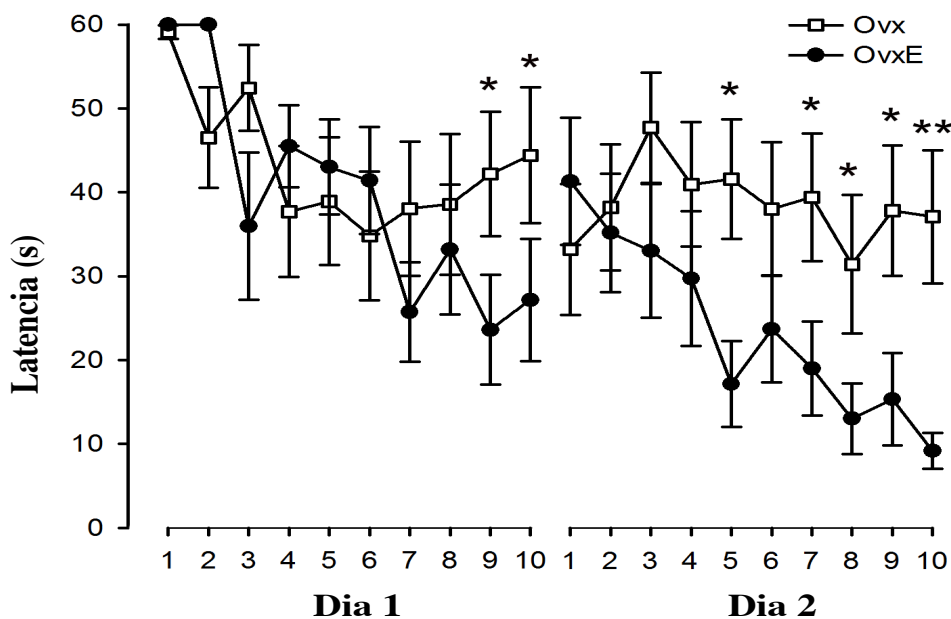


Figura 32. Aprendizaje. Gráfica en la que se muestran los valores promedio \pm E.E de 10 animales por grupo del aprendizaje en el LAM. Las gráficas representan el promedio de la latencia para encontrar la plataforma (60 segundos) en 10 ensayos durante dos días de entrenamiento. Cada punto representa la latencia promedio de llegada a la plataforma en 10 ensayos. Los asteriscos (*) indican las diferencias significativas, día 1 ($p = 0.0034$) Día 2 ($p = 0.00084$) entre ambos grupos (Ovx y OvxE). ANOVA de medidas repetidas y factorial, seguido de una prueba *post hoc* de Fisher.

Para la prueba de memoria, se midió la latencia para llegar a la localización donde se encontraba la plataforma, realizado 24 horas después de la última sesión de aprendizaje en un solo ensayo (120 segundos). Los resultados de la prueba t-student (Figura 32) muestran que las ratas OvxE recordaron la tarea ($p = 0.0366$), mientras que las ratas Ovx no alcanzaron el umbral de memoria. ANOVA de medidas repetidas y factorial

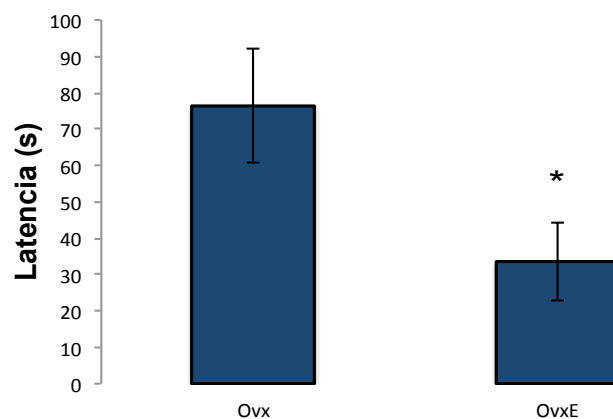


Figura 33. Memoria. Gráfica en la que se muestran los valores promedio \pm E.E de 10 animales por grupo de la latencia para llegar al lugar donde se encontraba la plataforma durante la adquisición. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos Ovx, Ovariectomizados y OvxE, ovariectomizados suplementados con E_2 . t- student no pareada

VIII. DISCUSIÓN

En este estudio presentamos evidencia que sugiere que el 17β - estradiol (E_2) tiene un papel importante en la plasticidad y mantenimiento de las FM en CA3 del hipocampo, eventos valorados por el número de sinapsis, la cantidad total de zinc, la actividad de la NOSc, el aprendizaje y la memoria de tipo espacial en la rata albina a través del ciclo estral y en ratas ovariectomizadas (Ovx) y suplementadas con E_2 (OvxE). Las FM fueron evaluadas mediante tinción de Timm; el área del haz suprapiramidal se redujo significativamente en los grupos con niveles bajos de E_2 (Estro y Ovx), fenómeno que se invierte en ambos grupos, cuando los animales presentan concentraciones altas (etapa de proestro) y en las ratas que se complementan con dosis fisiológicas del E_2 (OvxE). Además, los niveles del zinc totales en el hipocampo también se redujeron producto de la ovariectomía, y después de la suplementación con E_2 se revirtió el efecto.

Por otra parte, el E_2 modula la actividad de la NOSc dependiente de Ca^{2+} observándose un decremento en el grupo de ratas Ovx y su recuperación después de la suplementación. Finalmente al probar los grupos de ratas Ovx y OvxE en una conducta de tipo espacial, las ratas Ovx no mostraron un buen rendimiento en el LAM en comparación con aquellas que si se suplementaron con el E_2 . Así, estos resultados sugieren que el E_2 es importante en la regulación de zinc del hipocampo, cantidad de NOSc, plasticidad sináptica y por lo tanto en la memoria espacial.

El papel fisiológico del zinc en las vesículas sinápticas glutamatérgicas sigue siendo poco conocido a pesar de que se sabe que la homeostasis del zinc es modulada por la señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK- Mitogen-Activated Protein Kinase) y quinasas reguladas externamente (ERK - Extracellular signal-regulated kinases) en la presinapsis, además de que los eventos derivados de esta cascada son necesarios para la consolidación de la memoria dependiente del hipocampo. Es evidente el vínculo entre el estrógeno y la memoria espacial estudios anteriores han demostrado que la ovariectomía produce deficiencias en la adquisición de la tarea espacial como el LAM (Sarkaki et al., 2008) y otros estudios que muestran como el reemplazo hormonal mejora el rendimiento en el aprendizaje espacial (Daniel et al., 1997; Fader et al., 1998; Luine et al., 1998; El-bakri et al., 2004; Gresack & Frick, 2006; Xu & Zhang, 2006), lo que demuestra

que deficiencias en el aprendizaje pudieran estar relacionados con bajos niveles de E_2 circulante. Además, el sustrato anatómico (hipocampo) responde a los niveles bajos de E_2 por la disminución de la superficie de las FM, el nivel de zinc y menor número de sinapsis; efectos que se invirtieron con el reemplazo hormonal adecuado. Por otra parte, el área de las FM más grande y una mayor cantidad de zinc en el hipocampo se relacionan con un mejor rendimiento en las tareas espaciales en la rata. El estudio de Smith et al., (2009) está de acuerdo con el hecho de que esta hormona aumenta la función sináptica y la plasticidad sináptica en el hipocampo y altera la morfología de los sitios posinápticos. Se sabe también que las terminales de las FM forman un tipo distintivo de sinapsis las cuales son ricas en zinc y participan en la regulación de los canales iónicos y en las vías de señalización intracelular implicados en el aprendizaje, la memoria y la neuroplasticidad (Sindreu et al., 2011; Tóth, 2011). El zinc vesicular presináptico promueve y el postsináptico, inhibe la potenciación a largo plazo de las sinapsis de las FM en el CA3 (Pan et al., 2011). Al parecer, el zinc satisface varios criterios para ser un mensajero neuronal: se almacena en las vesículas sinápticas, se libera tras la despolarización, y actúa en varios receptores de la membrana. La asociación selectiva de zinc con las vesículas sinápticas que contiene glutamato sugiere que el zinc podría ser un co-transmisor en algunas sinapsis excitatorias (Paoletti et al., 1997).

El zinc puede modular la estructura y la función de la densidad posináptica, así como la organización molecular y la plasticidad de la zona presináptica, lo que permite la expresión de la plasticidad sináptica (Gundelfinger et al., 2006; Grabruker et al., 2011; Gundelfinger & Fejtova, 2012). Una característica única de este ion de metal divalente que es propuesto candidato para la transmisión como un mensajero anterógrado en neuronas posinápticas en el hipocampo (Ketterman & Li, 2008). Se discuten los efectos duales del zinc, la falta y el exceso de la señal de zinc producen disfunción de la transmisión sináptica y neurodegeneración (Takeda et al., 2013). En la revisión Tóth (2011), el autor afirma que la liberación de zinc fisiológico podría estar relacionado con el mantenimiento de una red neuronal estable y prevenir la muerte celular. La premisa paralela de estos efectos es que el zinc debe estar dentro de los niveles específicos en esta región del cerebro para cumplir una función fisiológica. El hecho de que los ratones que carecen del transportador del zinc (ZnT3) son más susceptibles a los ataques inducidos por ácido kaínico (Cole et al., 2000)

refuerza la idea de que el zinc desempeña un papel fisiológico protector, contra la sobreexcitación al glutamato, ya que la liberación de zinc a partir de las FM provocado por glutamato atenúa la entrada de calcio en las células posinápticas del CA3, lo que sugiere un papel modulador del metal en este sistema (Takeda et al., 2007). Las señales de calcio por lo tanto se modulan a través de la liberación de zinc no sólo como consecuencia de la liberación de glutamato, sino también a nivel de los canales y los receptores, ya que el zinc es capaz de inhibir los receptores de NMDA y los canales de calcio dependientes de voltaje (Paoletti et al., 2009).

También se ha encontrado que los niveles de zinc podrían estar sujetos a la regulación de esteroides en diferentes niveles, hay evidencia experimental de que las ratas ovariectomizadas muestran disminución de los niveles circulantes de zinc (Ulas & Cay, 2011). En los seres humanos, los niveles de zinc en plasma fluctúan durante el ciclo menstrual, y estos cambios tienen una correlación positiva con las concentraciones de estrógeno en el plasma (Michos et al., 2010) un hecho que podría estar relacionado con la disponibilidad de zinc disminuida durante la menstruación en todo el organismo, incluyendo el cerebro. Es posible, entonces, que el estrógeno está implicado en la homeostasis del zinc, en todo el cuerpo así como en el cerebro y, además, en áreas específicas del cerebro como es el hipocampo. Incluyendo el hecho de la producción de la hormona sexual disminuye en el envejecimiento, lo que podría estar relacionado con la homeostasis alterada de zinc en el hipocampo y por lo tanto a problemas de memoria asociados con la edad. En relación a la homeostasis del zinc disfuncional también podría estar relacionado con enfermedades neurodegenerativas ya que se ha encontrado acumulación de zinc en las placas seniles cerebrales de pacientes con Alzheimer (Danscher et al., 1997).

Se ha visto como un aumento de la superficie de FM en el *SO* del CA3 debido al exceso de entrenamiento en ratas macho produce un mejor desempeño en el LAM (Ramírez- Amaya et al., 1999; Gomes da Silva et al., 2012) sin embargo, en las hembras este efecto depende de la fase del ciclo estral y la cantidad de BDNF, que es la molécula candidato que pudiera tener mas probabilidades de estar involucrados en la regulación de las FM, sus acciones son muy complejas en parte por que hay diferentes vías por las cuales

su gene puede ser regulado, además de factores epigenéticos (Timmusk et al., 1993; Lubin et al., 2008). Se encuentran expresados ERs y trkB en todos los campos hipocampales en compartimentos pre y posinápticos (ver review Luine & Frankfurt, 2013) puede actuar como una señal para el crecimiento de nuevas y más FM ampliando la posibilidad de formar nuevas sinapsis. La ovariectomía en ratas deja una reducción de inmunoreactividad al BDNF en la vía de las FM comparado con ratas intactas (Scharfman et al., 2003) estos datos sugieren que las fluctuaciones en los niveles de plasma de E₂ también provoca una fluctuación en la concentración de proteína BDNF en las FM (Scharfman et al., 2003; Sato, et al., 2007, Wolley et al., 1992). Usando rebanadas hipocampales de ratas en diferentes etapas del ciclo estral se demostró que la transmisión se incrementa cuando las concentraciones de BDNF fueron mayores (por ejemplo en la mañana de proestro de la rata hembra) y que curiosamente es cuando los animales responden mejor a las pruebas de reconocimiento de objetos y de lugar (Scharfman, 2007).

La cantidad de las vesículas sinápticas que contienen zinc en el cerebro es especial debido a su labilidad, solo puede ser identificado mediante técnicas histoquímicas, como con el Timm (Frederickson et al., 2000). Aquí, se utilizó una variante mejorada de la antigua técnica para obtener consistentemente una mejor visualización del sistema de FM del hipocampo de los 5 grupos estudiados; los resultados mostraron que las fluctuaciones fisiológicas de los niveles de E₂ pueden afectar profundamente la zona de las FM en el hipocampo dorsal; esta área aumenta significativamente durante el proestro, en un 22% en comparación con el grupo de estro y en un 26 % en comparación con el grupo ovariectomizado. Además, la ovariectomía tiene un efecto a largo plazo, esto se pudo valorar, ya que el resultado se midió 15 días después de la cirugía, la suplementación de una dosis baja de E₂ fue suficiente para restablecer el área de las fibras musgosas en el hipocampo dorsal. Esto es consistente con el hallazgo reportado por Tanapat et al., (1999, 2005) un aumento en la neurogénesis de células granulares del GD durante el proestro y un aumento de la neurogénesis en ratas Ovx suplementadas con 10 µg de 17β - estradiol. Scharfman et al., (2007) encontraron cambios en la función del hipocampo de ratas Ovx después de dosis secuenciales bajas de E₂, ellos reportan que la estimulación de las FM evocó la expresión del BDNF. En tejido aislado del hipocampo del ratón *in vitro*, Teter et al., (1999) reportaron un incremento del 75 % en el giro dentado dorsal durante el

tratamiento con E₂ (100 pM), sin embargo esta respuesta es bloqueada por P₄ y tamoxifeno. En la mayoría de los estudios revisados la sustitución estrogénica se realiza utilizando el E₂ en distintas dosis (10 a 50 microgramos/Kg) y por diferentes vías (intracraneal, s.c. o por implantación de Pellets). En este estudio, no se encontraron diferencias significativas en el área de fibras musgosas cuando se empleó una mayor dosis (50 µg) de E₂ y con la suplementación de P₄, pero sí cuando se compararon con el grupo suplementado con 10 µg/día, este presentó una mayor plasticidad. Xu y Zhang en el 2006 suplementaron animales ovariectomizados con Benzoato de estradiol y observaron que estos animales normalizaron de manera eficaz los cambios producidos por la ovariectomía (Ovx), reduciendo el ancho de la hendidura sináptica y agrandando el grosor de densidad posináptica, incrementando el número de vesículas en la presinapsis del CA1 del hipocampo.

La relación entre las hormonas esteroideas y el zinc en el hipocampo puede tener otras implicaciones importantes, ya que se ha visto que los corticosteroides también modulan las concentraciones de zinc en neuronas zincérgicas y producen cambios en la conducta cognitiva y emocional (Takeda & Tamano, 2012).

Por otra parte y en relación a la medida de la actividad de la NOS constitutiva dependiente de la actividad de Ca²⁺ (eNOS y nNOS) en los 3 grupos de las diferentes etapas del ciclo estral y en los dos grupos Ovx y OvxE, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que la actividad depende también de la cantidad de E₂ circulante (Nicola et al., en 2008) en donde la eNOS y nNOS producen neuroprotección gracias a que mejoran la perfusión y la plasticidad sináptica y por lo tanto los procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. Los estrógenos son agentes antioxidantes por ser donantes de hidrógenos que neutralizan los radicales libres, principalmente en el radical hidroxilo. Este mecanismo general puede disminuir la cantidad de radicales libres en las células nerviosas, siendo un punto de apoyo para la protección neuronal *per se*, además de actuar en otras vías diferentes, evitando muerte celular por estrés oxidativo o excitotoxicidad, como se indica en la revisión de Woolley en 2007. El E₂ se ha propuesto que juega un rol importante en la prevención contra enfermedades neurodegenerativas, en parte, mediante la activación de sistemas de defensa antioxidantes

de especies reactivas del oxígeno, limita daños a la proteína mitocondrial, y mejora la cadena de transporte de electrones (Nilsen, 2008). También se ha reportado que el E₂ media la expresión de la relación Cu/Zn de la enzima superóxido dismutasa en cortes de cerebro, como un mecanismo para proteger a las neuronas de isquemia (Rao et al., 2011). Así, estos resultados están concuerdan con los estudios de (Grohé et al., 2004) que reportó que la disminución del E₂ en ratas Ovx disminuyó la actividad de la NOS dependiente de Ca²⁺ en el hipocampo y la suplementación revirtió los efectos, alcanzando los niveles del proestro (Figura 26).

Los datos aquí presentados sugieren un efecto plástico, de encendido / apagado de los estrógenos circulantes en la zona del *SL* del hipocampo dorsal de la rata en el transcurso del ciclo estral. El área ocupada por las FM en el *SL* fue mayor durante la etapa de proestro, que coincide con un aumento en la concentración de estrógenos circulantes. Además, la cantidad de zinc en el hipocampo se correlaciona con un mayor sustrato en el área de musgo de la FM, dando como resultado un mejor rendimiento en las tareas espaciales. En ratas Ovx los valores de estos parámetros fueron menores y se asociaron con un decremento del rendimiento en el LAM. Los presentes resultados muestran por primera vez que el estrógeno modula la plasticidad y el mantenimiento de las FM en el CA3 del hipocampo durante el proestro. Se observó en el área CA3 una fluctuación en el número de sinapsis a través del ciclo estral, el grupo estro tuvo una disminución de las sinapsis comparado con el grupo proestro, cambios que ocurren en 12 horas o menos que es el tiempo que tarda en pasar de proestro a estro; se hizo la comprobación en el laboratorio con dos grupos de ratas Ovx, uno suplementado con E₂ en el que se hubo una recuperación parcial en número de sinapsis, cambios que coinciden con lo reportado por Woolley et al., 1992 en el área CA1 del hipocampo. Es probable que el mantenimiento de sinapsis dependa también de la cantidad de E₂ circulante, *in vitro* en rebanadas de hipocampo en cultivo, la inhibición de la aromatasasa con letrozole da una regulación a la baja en la síntesis de estrógeno y por lo tanto disminuye el número de sinapsis en los cultivos hipocampales y también el número de botones sinápticos. La inmunohistoquímica revela la regulación a la baja de espinofilina un marcador de espinas, y sinaptofisina una proteína de vesículas presinápticas por acción del letrozole (Kretz et al., 2004). Por otro lado usando una reconstrucción tridimensional de electromicrografías Ledoux & Woolley (2005) encontraron que los estrógenos disminuyen

el número de vesículas sinápticas adyacentes a la membrana presináptica de las sinapsis inhibitorias. Sin afectar el número de vesículas y la densidad de entradas inhibitorias en las neuronas hipocampales de CA1. Un estudio en primates no humanos, en monos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops sabaesus*) (Leranth 2002) demostró que el número de sinapsis disminuye en un 43.33% en animales Ovx comparado con el grupo OvxE (Leranth et al., 2002). Se ha descrito que los estrógenos inducen sinaptogénesis en las neuronas piramidales de CA1 y se ha demostrado que los estrógenos sintetizados *de novo* sirven para el mantenimiento de las sinapsis y síntesis de proteínas sinápticas. Hajszan (2010) demostró como el E₂ ayuda a ratas en estrés lo que responde por primera vez la pregunta acerca de que los cambios en la conectividad sináptica, siguen el mismo patrón de plasticidad sináptica entre la FM y el SL del CA3. Otro estudio con suplementación de estrógeno conjugado equino aplicado crónicamente aumenta la densidad sináptica en el área CA1 en ratas Ovx (Silva 2000). Xu and Zhang 2006 no encontraron diferencias de densidad sináptica los diferentes grupos de ratas Ovx y suplementados con Benzoato de estradiol a dosis de 20, 100 y 200 µg/diaria S.C. por 4-5 semanas en ratones, esto pudiera ser debido a que las dosis utilizadas fueron muy altas.

En resumen, los hallazgos aquí presentados pudieran apoyar la idea de que los estrógenos tienen efectos protectores para el hipocampo; primero porque la ovariectomía disminuyó la actividad de la NOS dependiente de Ca²⁺ y la suplementación estrogénica revirtió los efectos, alcanzando los niveles del proestro. Además, la importante influencia que tienen los estrógenos en la organización anatómica y la conectividad sináptica de las fibras musgosas durante las diferentes etapas del ciclo estral de la rata adulta, conservando la plasticidad sináptica entre la fibra musgosa y el estrato lucido del CA3 indicando la gran capacidad plástica para modificar la estructura sináptica, necesaria para responder a los cambios del ciclo hormonal durante la vida adulta.

IX. CONCLUSIONES

La organización anatómica y sináptica de las FM con las células piramidales de CA3 en el *Stratum lucidum* y la concentración de zinc en el hipocampo, valoradas a través del ciclo estral presentaron un nivel máximo en la etapa de proestro y disminuyeron en la etapa de estro .

La falta de E₂ debido a la ovariectomía produjo cambios en la disminución en la actividad de la NOS constitutiva, en las concentraciones de zinc, y en la en la organización anatómica y sináptica del hipocampo dorsal, así como disminución del área de las FM y en el número de sinapsis del *Stratum lucidum*.

Todos estos efectos producidos por la falta del E₂, fueron restablecidos con la suplementación de E₂ aplicando a una dosis de 10 mg/K por vía subcutánea durante tres días.

Los cambios plásticos se podrían relacionar con la ejecución de la tarea de aprendizaje y memoria espacial evaluada en dos grupos experimentales con (OvxE) o sin suplementación (Ovx) de E₂. Así, la falta de E₂ ováricos, produce deficiencia en el desempeño de estas tareas.

La suplementación con E₂ mejora el desempeño de las ratas en un paradigma de tipo espacial; lo que sugiere fuertemente que el E₂ juega un papel importante en el mantenimiento de las sinapsis del área del CA3 del hipocampo dorsal y por lo tanto en procesos cognitivos dependientes del hipocampo dorsal de la rata.

X. BIBLIOGRAFIA

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., & Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3386–403.
- Adams, M. M., Fink, S. E., Janssen, W. G. M., Shah, R. a, & Morrison, J. H. (2004). Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 474(3), 419–26. doi:10.1002/cne.20148
- Adams, M. M., Fink, S. E., Shah, R. A., Janssen, W. G. M., Hayashi, S., Milner, T. A., ... Morrison, J. H. (2002). Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), 3608–14. doi:20026275
- Adams, M. M., Shah, R. a, Janssen, W. G., & Morrison, J. H. (2001). Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 8071–6. doi:10.1073/pnas.141215898
- Aguilera, P., Cháñez-Cárdenas, M. E., Floriano-Sánchez, E., Barrera, D., Santamaría, A., Sánchez-González, D. J., ... Jiménez, P. D. M. (2007). Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. *Neurotoxicology*, 28(6), 1200–7. doi:10.1016/j.neuro.2007.07.010
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75(6), 639–53. doi:10.1016/j.lfs.2003.10.042
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*, 357(Pt 3), 593–615. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1221991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Amaral, D. G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 182(4 Pt 2), 851–914.
- Amaral, D. G. (1979). Synaptic extensions from the mossy fibers of the fascia dentata. *Anatomy and Embryology*, 155(3), 241–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/453543>
- Amaral, D. G., & Dent, J. A. (1981). Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *The Journal of Comparative Neurology*, 195(1), 51–86. doi:10.1002/cne.901950106

- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, 163, 3–22. doi:10.1016/S0079-6123(07)63001-5
- Arnold, A. P., & Breedlove, S. M. (1985). Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Hormones and Behavior*, 19(4), 469–98.
- Assaf, S. Y., & Chung, S. H. (1984). Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature*, 308(5961), 734–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6717566>
- Bárbara, A. G., Fernando, V. N., & Cué, B. M. (1999). Estriol y sus derivados. comportamiento de la tecnología en el mundo. *Rev Cubana Farm*, 33(3), 195–200.
- Baulieu, E.-E., & Robel, P. (1990). Neurosteroids: a new brain function? *Journal Steroid Biochem. Molec. Biol*, 37(3), 395–403.
- Beltrán-campos, V., Prado-alcalá, R. A., León-jacinto, U., & Aguilar-vázquez, A. (2010). Increase of mushroom spine density in CA1 apical dendrites produced by water maze training is prevented by ovariectomy. *Brain Research*, 1369, 119–130. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.105
- Berberich, S., Jensen, V., Hvalby, Ø., Seeburg, P. H., & Köhr, G. (2007). The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction. *Neuropharmacology*, 52(1), 77–86. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.07.016
- Berry, B., McMahan, R., & Gallagher, M. (1997). Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. *Behavioral Neuroscience*, 111(2), 267–74.
- Bischofberger, J., Engel, D., Frotscher, M., & Jonas, P. (2006). Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 453(3), 361–72. doi:10.1007/s00424-006-0093-2
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31–9. doi:10.1038/361031a0
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol*, 2(10), 907–916.
- Brake, W. G., Alves, S. E., Dunlop, J. C., Lee, S. J., Bulloch, K., Allen, P. B., ... McEwen, B. S. (2001). Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology*, 142(3), 1284–9. doi:10.1210/endo.142.3.8036

- Brenman, J. E., & Bredt, D. S. (1997). Synaptic signaling by nitric oxide. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(3), 374–8.
- Brinton, R. D. (2009). Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(4), 212–22. doi:10.1016/j.tips.2008.12.006
- Buckmaster, P. S., Strowbridge, B. W., Kunkel, D. D., Schmiede, D. L., & Schwartzkroin, P. A. (1992). Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat hippocampal slice. *Hippocampus*, 2(4), 349–62. doi:10.1002/hipo.450020403
- Buckmaster, P. S., Wenzel, H. J., Kunkel, D. D., & Schwartzkroin, P. A. (1996). Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *The Journal of Comparative Neurology*, 366(2), 271–92.
- Budde, T., Minta, A., White, J. a., & Kay, a R. (1997). Imaging free zinc in synaptic terminals in live hippocampal slices. *Neuroscience*, 79(2), 347–58.
- Bunsey, M., & Eichenbaum, H. (1996). Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature*, 379(6562), 255–7. doi:10.1038/379255a0
- Cameron, H. A., & McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 435(4), 406–17.
- Chicurel, M. E., & Harris, K. M. (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 325(2), 169–82. doi:10.1002/cne.903250204
- Cintra, L., Granados, L., Aguilar, A., Kemper, T., DeBassio, W., Galler, J., ... Díaz-Cintra, S. (1997). Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus*, 7(2), 184–91. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:2<184::AID-HIPO5>3.0.CO;2-N
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1990). Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 302(2), 206–19. doi:10.1002/cne.903020203
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G. D., Fragniere, A., Tyers, P., ... Bussey, T. J. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5937), 210–3. doi:10.1126/science.1173215

- Cole, T. B., Robbins, C. A., Wenzel, H. J., Schwartzkroin, P. A., & Palmiter, R. D. (2000). Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. *Epilepsy Research*, *39*(2), 153–69.
- Colino, A., & Malenka, R. C. (1993). Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro. *Journal of Neurophysiology*, *69*(4), 1150–1159.
- Cuajungco, M. P., & Lees, G. J. (1997). Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease*, *4*(3-4), 137–69. doi:10.1006/nbdi.1997.0163
- Dalla, C., Bangasser, D. A., Edgecomb, C., & Shors, T. J. (2007). Neurogenesis and learning: acquisition and asymptotic performance predict how many new cells survive in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *88*(1), 143–8. doi:10.1016/j.nlm.2007.02.003
- Daniel, J. M. (2006). Effects of oestrogen on cognition: what have we learned from basic research? *Journal of Neuroendocrinology*, *18*(10), 787–95. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01471.x
- Daniel, J. M., Fader, A. J., Spencer, A. L., & Dohanich, G. P. (1997). Estrogen Enhances Performance of Female Rats during Acquisition of a Radial Arm Maze. *Hormones and Behavior*, *225*, 217–225.
- Danscher, G., Jensen, K. B., Frederickson, C. J., Andreasen, A., Juhl, S., Stoltenberg, M., & Ravid, R. (1997). Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer ' s diseased brains : A proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material. *Journal of Neuroscience Methods*, *76*, 53–59.
- Danscher, G., & Zimmer, J. (1978). An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry*, *55*(1), 27–40.
- Davis, E. C., Shryne, J. E., & Gorski, R. A. (1996). Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology*, *63*(2), 142–8.
- Dayer, A. G., Ford, A. A., Cleaver, K. M., Yassaee, M., & Cameron, H. A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, *460*(4), 563–72. doi:10.1002/cne.10675
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(5), 339–350. doi:10.1038/nrn2822.New

- Derrick, B. E., & Martinez, J. O. E. L. (1994). Frequency-dependent associative long-term potentiation at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*, 10290–10294.
- Derrick, E. (1992). Mu Opioid Receptors Are Associated Hippocampal Mossy Fiber Long-Term antagonists. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *263*(2), 725–733.
- deToledo-Morrell, L., Stoub, T. R., & Wang, C. (2007). Hippocampal atrophy and disconnection in incipient and mild Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*, *163*, 741–53. doi:10.1016/S0079-6123(07)63040-4
- Dinerman, J. L., Dawson, T. M., Schell, M. J., Snowman, A., & Snyder, S. H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(10), 4214–8.
- Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., ... Vaudry, H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *30*(3), 259–301. doi:10.1016/j.yfrne.2009.05.006
- Drake, C. T., Chavkin, C., & Milner, T. a. (2007). Opioid systems in the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, *163*, 245–63. doi:10.1016/S0079-6123(07)63015-5
- Duva, C. a, Floresco, S. B., Wunderlich, G. R., Lao, T. L., Pinel, J. P., & Phillips, a G. (1997). Disruption of spatial but not object-recognition memory by neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus in rats. *Behavioral Neuroscience*, *111*(6), 1184–96.
- Eichenbaum, H. (2001). The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behavioural Brain Research*, *127*(1-2), 199–207.
- El-bakri, N. K., Islam, A., Zhu, S., & Elhassan, A. (2004). Effects of estrogen and progesterone treatment on rat hippocampal NMDA receptors : Relationship to Morris water maze performance. *J.Cell.Mol.Med*, *8*(4), 537–544.
- Fader, A. J., Hendricson, A. W., & Dohanich, G. P. (1998). Estrogen Improves Performance of Reinforced T-Maze Alternation and Prevents the Amnesic Effects of Scopolamine Administered Systemically or Intrahippocampally. *Neurobiology of Learning and Memory*, *240*(69), 225–240.
- Fagan, K. A., Tyler, R. C., Sato, K., Fouty, B. W., Morris, K. G., Huang, P. L., ... Rodman, D. M. (1999). Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *The American Journal of Physiology*, *277*(3 Pt 1), L472–8.

- Falconer, E. M., & Galea, L. a M. (2003). Sex differences in cell proliferation, cell death and defensive behavior following acute predator odor stress in adult rats. *Brain Research*, 975(1-2), 22–36.
- Fester, L., Prange-Kiel, J., Jarry, H., & Rune, G. M. (2011). Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 345(3), 285–94. doi:10.1007/s00441-011-1221-7
- Foy, Baudry, Brinton, & Thompson. (2008). Estrogen and Hippocampal Plasticity in Rodent Models Michael. *J.Alzheimers Dis.*, 15(4), 1–25.
- Foy, M. R. (2001). 17beta-estradiol: effect on CA1 hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 76(3), 239–52. doi:10.1006/nlme.2001.4018
- Frederickson, C. J., Suh, S. W., Silva, D., Frederickson, C. J., & Thompson, R. B. (2000). Zinc and Health : Current Status and Future Directions Importance of Zinc in the Central Nervous System : The Zinc-Containing. *The Journal of Nutrition*, 1471–1483.
- Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347–470. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I
- Frick, K. M. (2009). Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Hormones and Behavior*, 55(1), 2–23. doi:10.1016/j.yhbeh.2008.08.015
- Frick, K. M., Burlingame, L. a, Arters, J. a, & Berger-Sweeney, J. (2000). Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience*, 95(1), 293–307.
- Frotscher, M. (1991). Target cell specificity of synaptic connections in the hippocampus. *Hippocampus*, 1(2), 123–30. doi:10.1002/hipo.450010202
- Frotscher, M., Jonas, P., & Sloviter, R. S. (2006). Synapses formed by normal and abnormal hippocampal mossy fibers. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 361–7. doi:10.1007/s00441-006-0269-2
- Frotscher, M., Soriano, E., & Misgeld, U. (1994). Divergence of hippocampal mossy fibers. *Synapse (New York, N.Y.)*, 16(2), 148–60. doi:10.1002/syn.890160208
- Fugger, H. N., Foster, T. C., & Rissman, E. F. (2000). Novel effects of estradiol and estrogen receptor a and b on cognitive. *Brain Research*, 883, 258–264.
- Gaarskjaer, F. B. (1985). The development of the dentate area and the hippocampal mossy fiber projection of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 241(2), 154–70. doi:10.1002/cne.902410204

- Garcia-Segura, L. M., Lorenz, B., & DonCarlos, L. L. (2008). The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction (Cambridge, England)*, *135*(4), 419–29. doi:10.1530/REP-07-0540
- Gibbs, R. B. (2010). Does short-term estrogen therapy produce lasting benefits in brain? *Endocrinology*, *151*(3), 843–5. doi:10.1210/en.2009-1453
- Goldman, J. M., Murr, Ñ. A. S., & Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle : Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research*, *97*, 84–97. doi:10.1002/bdrb
- Gomes da Silva, S., Unsain, N., Mascó, D. H., Toscano-Silva, M., de Amorim, H. A., Silva Araújo, B. H., ... Arida, R. M. (2012). Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. *Hippocampus*, *22*(2), 347–58. doi:10.1002/hipo.20903
- Gonzales, R. B., Galvan, C. J. D. E. L., Rangel, Y. M., & Claiborne, B. J. (2001). Distribution of Thorny Excrescences on CA3 Pyramidal Neurons in the Rat Hippocampus, *368*(June 1995), 357–368.
- Gorski, R. a, Gordon, J. H., Shryne, J. E., & Southam, a M. (1978). Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Research*, *148*(2), 333–46.
- Gothard, K. M., Skaggs, W. E., Moore, K. M., & McNaughton, B. L. (1996). Binding of hippocampal CA1 neural activity to multiple reference frames in a landmark-based navigation task. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(2), 823–35.
- Gould, E., Tanapat, P., Hastings, N., & Shors, T. (1999). Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends in Cognitive Sciences*, *3*(5), 186–192.
- Grabrucker, A. M., Knight, M. J., Proepper, C., Bockmann, J., Joubert, M., Rowan, M., ... Boeckers, T. M. (2011). Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *The EMBO Journal*, *30*(3), 569–81. doi:10.1038/emboj.2010.336
- Gresack, J. E., & Frick, K. M. (2006). Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *84*(1), 112–9. doi:10.1016/j.pbb.2006.04.013
- Grohé, C., Kann, S., Fink, L., Djoufack, P. C., Paehr, M., van Eickels, M., ... Fink, K. B. (2004). 17 Beta-estradiol regulates nNOS and eNOS activity in the hippocampus. *Neuroreport*, *15*(1), 89–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15106837>

- Gundelfinger, E. D., Boeckers, T. M., Baron, M. K., & Bowie, J. U. (2006). A role for zinc in postsynaptic density assembly and plasticity? *Trends in Biochemical Sciences*, *31*(7), 366–73. doi:10.1016/j.tibs.2006.05.007
- Gundelfinger, E. D., & Fejtova, A. (2012). Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(3), 423–30. doi:10.1016/j.conb.2011.10.005
- Hardingham, N., Dachtler, J., & Fox, K. (2013). The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(October), 190. doi:10.3389/fncel.2013.00190
- Hargreaves, E. L., Rao, G., Lee, I., & Knierim, J. J. (2013). Major Dissociation Between Medial and Lateral Entorhinal Input to Dorsal Hippocampus, *1792*(2005). doi:10.1126/science.1110449
- Harrison, N. L., & Gibbons, S. J. (1994). Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology*, *33*(8), 935–52.
- Hawkins, R. A., Freedman, B., Marshall, A., & Killen, E. (1975). Rat peripheral plasma. *Br. J. Cancer*, *32*, 179–185.
- Henze, D. A., Urban, N. N., & Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience*, *98*(3), 407–427.
- Hojo, Y., Murakami, G., Mukai, H., Higo, S., Hatanaka, Y., Ogiue-Ikeda, M., ... Kawato, S. (2008). Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *290*(1-2), 31–43. doi:10.1016/j.mce.2008.04.017
- Houser, C. R. (2007). Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Progress in Brain Research*, *163*, 217–32. doi:10.1016/S0079-6123(07)63013-1
- Howell, G. A., Welch, M. G., & Frederickson, C. J. (1984). Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature*, *308*(5961), 736–8.
- Hu, Y., & Zhu, D.-Y. (2014). *Hippocampus and nitric oxide. Vitamins and hormones* (1st ed., Vol. 96, pp. 127–60). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800254-4.00006-4
- Huang, G. Z., & Woolley, C. S. (2012). Estradiol acutely suppresses inhibition in the hippocampus through a sex-specific endocannabinoid and mGluR-dependent mechanism. *Neuron*, *74*(5), 801–8. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.035
- Hunsaker, M. R., Mooy, G. G., Swift, J. S., & Kesner, R. P. (2007). Dissociations of the medial and lateral perforant path projections into dorsal DG, CA3, and CA1 for spatial

and nonspatial (visual object) information processing. *Behavioral Neuroscience*, 121(4), 742–50. doi:10.1037/0735-7044.121.4.742

- Ikeda, T., Matsuki, N., & Yamada, M. K. (2006). Estrogen Produced in Cultured Hippocampal Neurons Is a Functional Regulator of a GABAergic Machinery. *Journal of Neuroscience Research*, 1777(April), 1771–1777. doi:10.1002/jnr
- Imielski, Y., Schwamborn, J. C., Lüningschrör, P., Heimann, P., Holzberg, M., Werner, H., ... Kaltschmidt, B. (2012). Regrowing the adult brain: NF- κ B controls functional circuit formation and tissue homeostasis in the dentate gyrus. *PloS One*, 7(2), e30838. doi:10.1371/journal.pone.0030838
- Ishizuka, N., Weber, J., & Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 295(4), 580–623. doi:10.1002/cne.902950407
- Iwase, K., Miyanaka, K., Shimizu, A., Nagasaki, A., Gotoh, T., Mori, M., & Takiguchi, M. (2000). Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 11929–33.
- Izumi, Y., Auberson, Y. P., & Zorumski, C. F. (2006). Zinc modulates bidirectional hippocampal plasticity by effects on NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(27), 7181–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.1258-06.2006
- Jaffe, D. B., & Gutierrez, R. (2007). Mossy fiber synaptic transmission : communication from the dentate gyrus to area CA3. *Progress in Brain Research*, 163, 109–132. doi:10.1016/S0079-6123(07)63006-4
- Jaffrey, S. R., & Snyder, S. H. (1995). Nitric oxide: a neural messenger. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11, 417–40. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.002221
- Jelks, K. B., Wylie, R., Floyd, C. L., McAllister, a K., & Wise, P. (2007). Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor-alpha. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(26), 6903–13. doi:10.1523/JNEUROSCI.0909-07.2007
- Jesko, H., Chalimoniuk, M., & Strosznajder, J. B. (2003). Activation of constitutive nitric oxide synthase(s) and absence of inducible isoform in aged rat brain. *Neurochemistry International*, 42(4), 315–22.
- Jia, Y., Jeng, J.-M., Sensi, S. L., & Weiss, J. H. (2002). Zn²⁺ currents are mediated by calcium-permeable AMPA/Kainate channels in cultured murine hippocampal

- neurones. *The Journal of Physiology*, 543(1), 35–48.
doi:10.1113/jphysiol.2002.020172
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*, 26(7), 360–8. doi:10.1016/S0166-2236(03)00162-0
- Kato, A., Hojo, Y., Higo, S., Komatsuzaki, Y., Murakami, G., Yoshino, H., ... Kawato, S. (2013). Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(October), 149. doi:10.3389/fncir.2013.00149
- Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H., & Frankland, P. W. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 10(3), 355–62. doi:10.1038/nn1847
- Ketterman, J. K., & Li, Y. V. (2008). Presynaptic Evidence for Zinc Release at the Mossy Fiber Synapse of Rat Hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 434(May 2007), 422–434. doi:10.1002/jnr
- Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, 29(14), 2905–19.
- Korol, D. L., & Kolo, L. L. (2002). Estrogen-induced changes in place and response learning in young adult female rats. *Behavioral Neuroscience*, 116(3), 411–20.
- Korol, D. L., Malin, E. L., Borden, K. a, Busby, R. a, & Couper-Leo, J. (2004). Shifts in preferred learning strategy across the estrous cycle in female rats. *Hormones and Behavior*, 45(5), 330–8. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.01.005
- Laplagne, D. A., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. A., Zhao, C., van Praag, H., ... Schinder, A. F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biology*, 4(12), e409. doi:10.1371/journal.pbio.0040409
- Lawrence, J. J., Grinspan, Z. M., & McBain, C. J. (2003). Quantal transmission at mossy fibre targets in the CA3 region of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 554(1), 175–193. doi:10.1113/jphysiol.2003.049551
- Legendre, B. Y. P., & Westbrook, G. L. (1990). *Health Sciences*, 429–449.
- Li, Y., Hough, C. J., Suh, S. W., Sarvey, J. M., & Frederickson, C. J. (2001). Rapid translocation of Zn(2+) from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. *Journal of Neurophysiology*, 86(5), 2597–604.

- Lisman, J. E. (1999). Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron*, 22(2), 233–42.
- Liu, Y. A. N., Fowler, C. D., Young, L. J., Yan, Q., Insel, T. R., & Wang, Z. (2001). Expression and Estrogen Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene and Protein in the Forebrain of Female Prairie Voles. *The Journal of Comparative Neurology*, 514(January), 499–514.
- Lourenço, C. F., Ferreira, N. R., Santos, R. M., Lukacova, N., Barbosa, R. M., & Laranjinha, J. (2014). The pattern of glutamate-induced nitric oxide dynamics in vivo and its correlation with nNOS expression in rat hippocampus, cerebral cortex and striatum. *Brain Research*, 1554, 1–11. doi:10.1016/j.brainres.2014.01.030
- Lu, Y. M., Taverna, F. A., Tu, R., Ackerley, C. A., Wang, Y. T., & Roder, J. (2000). Endogenous Zn(2+) is required for the induction of long-term potentiation at rat hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Synapse (New York, N.Y.)*, 38(2), 187–97. doi:10.1002/1098-2396(200011)38:2<187::AID-SYN10>3.0.CO;2-R
- Lubin, F. D., Roth, T. L., & Sweatt, J. D. (2008). Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(42), 10576–86. doi:10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008
- Luine, V., & Frankfurt, M. (2013). Interactions between estradiol, BDNF and dendritic spines in promoting memory. *Neuroscience*, 239, 34–45. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.10.019
- Luine, V. N. (2008). Sex steroids and cognitive function. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 866–72. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01710.x
- Luine, V. N., Richards, S. T., Wu, V. Y., & Beck, K. D. (1998). Estradiol Enhances Learning and Memory in a Spatial Memory Task and Effects Levels of Monoaminergic Neurotransmitters. *Hormones and Behavior*, 162, 149–162.
- MacLusky, N. J., Luine, V. N., Hajszan, T., & Leranth, C. (2005). The 17alpha and 17beta isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *Endocrinology*, 146(1), 287–93. doi:10.1210/en.2004-0730
- Maggi, A., Ciana, P., Belcredito, S., & Vegeto, E. (2004). Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annual Review of Physiology*, 66, 291–313. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032802.154945
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, 62, 179–185.

- Markham, J. a., Pych, J. C., & Juraska, J. M. (2002). Ovarian Hormone Replacement to Aged Ovariectomized Female Rats Benefits Acquisition of the Morris Water Maze. *Hormones and Behavior*, 42(3), 284–293. doi:10.1006/hbeh.2002.1819
- Maur, D. G., Pascuan, C. G., Genaro, A. M., & Zorrilla-Zubilete, M. A. (2015). Involvement of Nitric Oxide, Neurotrophins and HPA Axis in Neurobehavioural Alterations Induced by Prenatal Stress. *Advances in Neurobiology*, 10, 61–74. doi:10.1007/978-1-4939-1372-5_4
- McBain, C. J. (2008). *Differential mechanisms of transmission and plasticity at mossy fiber synapses*. *Progress in brain research* (Vol. 169, pp. 225–40). Elsevier. doi:10.1016/S0079-6123(07)00013-1
- Mcbain, C. J. (2009). Diferential mechanisms of transmission at mossy fiber synapses. *Prog Brain Res*, 6123(07), 225–240. doi:10.1016/S0079-6123(07)00013-1.Differential
- Mcbain, C. J., Mcbain, C. J., Freund, T. F., & Mody, I. (1999). Glutamatergic synapses onto hippocampal interneurons : precision timing without lasting plasticity, 2236(98).
- McEwen, B., Akama, K., Alves, S., Brake, W. G., Bulloch, K., Lee, S., ... Milner, T. a. (2001). Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7093–100. doi:10.1073/pnas.121146898
- McEwen, B. S., Coirini, H., Westlind-Danielsson, A., Frankfurt, M., Gould, E., Schumacher, M., & Woolley, C. (1991). Steroid hormones as mediators of neural plasticity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 39(2), 223–32.
- McGinty, J. F., Henriksen, S. J., Goldstein, A., Terenius, L., & Bloom, F. E. (1983). Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(2), 589–93.
- Mcnaughton, B. L. (1980). Evidence for two phisiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata. *Brain Research*, 199(1), 1–19.
- Mehra, R. D., Sharma, K., Nyakas, C., & Vij, U. (2005). Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study. *Brain Research*, 1056(1), 22–35. doi:10.1016/j.brainres.2005.06.073
- Michos, C., Kalfakakou, V., Karkabounas, S., Kiortsis, D., & Evangelou, A. (2010). Changes in copper and zinc plasma concentrations during the normal menstrual cycle in women. *Gynecological Endocrinology : The Official Journal of the International*

Society of Gynecological Endocrinology, 26(4), 250–5.
doi:10.3109/09513590903247857

- Milner, T. a, Ayoola, K., Drake, C. T., Herrick, S. P., Tabori, N. E., McEwen, B. S., ... Alves, S. E. (2005). Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *The Journal of Comparative Neurology*, 491(2), 81–95. doi:10.1002/cne.20724
- Montes, S., Riojas-Rodríguez, H., Sabido-Pedraza, E., & Ríos, C. (2008). Biomarkers of manganese exposure in a population living close to a mine and mineral processing plant in Mexico. *Environmental Research*, 106(1), 89–95.
doi:10.1016/j.envres.2007.08.008
- Morrell, M. J. (2002). Epilepsy in women. *American Family Physician*, 66(8), 1489–94.
- Moser, E., Moser, M. B., & Andersen, P. (1993). Synaptic potentiation in the rat dentate gyrus during exploratory learning. *Neuroreport*, 5(3), 317–20.
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608–19. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7
- Mukai, H., Kimoto, T., Hojo, Y., Kawato, S., Murakami, G., Higo, S., ... Ogiue-Ikeda, M. (2010). Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800(10), 1030–44. doi:10.1016/j.bbagen.2009.11.002
- Naber, P. A., Witter, M. P., & Lopes Silva, F. H. (2000). Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911, 392–403.
- Nadel, L. (1992). Multiple memory systems: what and why. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 4(3), 179–88. doi:10.1162/jocn.1992.4.3.179
- Nerad, L., Ramírez-Amaya, V., Ormsby, C. E., & Bermúdez-Rattoni, F. (1996). Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66(1), 44–50.
- Nicoll, R. a, & Roche, K. W. (2013). Long-term potentiation: peeling the onion. *Neuropharmacology*, 74, 18–22. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.02.010
- Nicoll, R. a, & Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(11), 863–76. doi:10.1038/nrn1786
- Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 377(6545), 115–8. doi:10.1038/377115a0

- Nilsen, J. (2008). Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(4), 463–75. doi:10.1016/j.yfrne.2007.12.005
- O'Keefe, J. (1990). A computational theory of the hippocampal cognitive map. *Progress in Brain Research*, 83, 301–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2203101>
- Packard, M. G. (1998). Posttraining estrogen and memory modulation. *Hormones and Behavior*, 34(2), 126–39. doi:10.1006/hbeh.1998.1464
- Pan, E., Zhang, X., Huang, Z., Krezel, A., Zhao, M., Tinberg, C. E., ... McNamara, J. O. (2011). Vesicular zinc promotes presynaptic and inhibits postsynaptic long-term potentiation of mossy fiber-CA3 synapse. *Neuron*, 71(6), 1116–26. doi:10.1016/j.neuron.2011.07.019
- Paoletti, P., Ascher, P., & Neyton, J. (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(15), 5711–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9221770>
- Paoletti, P., Vergnano, A. M., Barbour, B., & Casado, M. (2009). Review zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, 158(1), 126–136. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.061
- Parducz, a, Hajszan, T., Maclusky, N. J., Hoyk, Z., Csakvari, E., Kurunczi, a, ... Leranth, C. (2006). Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience*, 138(3), 977–85. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.07.008
- Paxinos, G., & Watson, C. (1982). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition (Google eBook)* (Vol. 2006, p. 456). Academic Press.
- Pelletier, G. (2010). *Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects. Progress in brain research* (First edit., Vol. 181, pp. 193–207). Elsevier. doi:10.1016/S0079-6123(08)81011-4
- Pelligrino, D. A., Santizo, R., Baughman, V. L., & Wang, Q. (1998). Cerebral vasodilating capacity during forebrain ischemia: effects of chronic estrogen depletion and repletion and the role of neuronal nitric oxide synthase. *Neuroreport*, 9(14), 3285–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9831465>
- Pike, C. J., Carroll, J. C., Rosario, E. R., & Barron, A. M. (2009). Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(2), 239–58. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.015

- Pompili, A., Tomaz, C., Arnone, B., Tavares, M. C., & Gasbarri, A. (2010). Working and reference memory across the estrous cycle of rat: a long-term study in gonadally intact females. *Behavioural Brain Research*, *213*(1), 10–8. doi:10.1016/j.bbr.2010.04.018
- Prange-kiel, J., Fester, L., Zhou, L., Lauke, H., Rune, G. M., & Carre, J. (2006). Inhibition of Hippocampal Estrogen Synthesis Causes Region-Specific Downregulation of Synaptic Protein Expression in Hippocampal Neurons. *Hippocampus*, *471*, 464–471. doi:10.1002/hipo
- Prange-Kiel, J., & Rune, G. M. (2006). Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience*, *138*(3), 765–72. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.05.061
- Quinta-Ferreira, M. E., Matias, C. M., Arif, M., & Dionísio, J. C. (2004). Measurement of presynaptic zinc changes in hippocampal mossy fibers. *Brain Research*, *1026*(1), 1–10. doi:10.1016/j.brainres.2004.07.054
- Ramírez- Amaya, V., Escobar, M. L., Chao, V., & Bermudez, F. (1999). Synaptogenesis of Mossy Fibers Induced by Spatial Water Maze Overtraining. *Hormones and Behavior*, *636*(9), 631–636.
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D. F., Gage, F. H., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(47), 12237–41. doi:10.1523/JNEUROSCI.2195-06.2006
- Rao, A. K., Dietrich, A. K., Ziegler, Y. S., & Nardulli, A. M. (2011). 17 β -Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: a mechanism to protect neurons from ischemia. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *127*(3-5), 382–9. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.06.008
- Rapp, P. R., & Gallagher, M. (1996). Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(18), 9926–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38531&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Reddy, D. (2011). Neurosteroids: Endogenous Role in the Human Brain and Therapeutic Potentials. *Progress in Brain Research*, *186*, 113–137. doi:10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7.Neurosteroids
- Rissman, E. F., Heck, A. L., Leonard, J. E., Shupnik, M. A., & Gustafsson, J.-åke. (2002). Disruption of estrogen receptor α gene impairs spatial learning in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3996–4001.

- Rolls, E. T., & Kesner, R. P. (2006). A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in Neurobiology*, 79(1), 1–48.
doi:10.1016/j.pneurobio.2006.04.005
- Rune, G. M., & Frotscher, M. (2005). Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience*, 136(3), 833–42.
doi:10.1016/j.neuroscience.2005.03.056
- Rune, G. M., Wehrenberg, U., Zhou, L., Adelman, G., & Frotscher, M. (2002). Estrogen up-regulates estrogen receptor K and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience*, 113(1), 167–175.
- Saha, R. N., & Pahan, K. (2006). Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(5-6), 929–47. doi:10.1089/ars.2006.8.929
- Sandler, R., & Smith, A. D. (1991). Coexistence of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. *The Journal of Comparative Neurology*, 303(2), 177–92. doi:10.1002/cne.903030202
- Sarkaki, A., Amani, R., Badavi, M., Safahani, M., & Aligholi, H. (2008). Effect of ovariectomy on reference memory version of Morris water maze in young adult rats. *Iranian Biomedical Journal*, 12(2), 123–8.
- Sato, K., Akaishi, T., Matsuki, N., Ohno, Y., & Nakazawa, K. (2007). beta-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Research*, 1150, 108–20.
doi:10.1016/j.brainres.2007.02.093
- Scharfman, H. E. (1994). Evidence from simultaneous intracellular recordings in rat hippocampal slices that area CA3 pyramidal cells innervate dentate hilar mossy cells. *Journal of Neurophysiology*, 72(5), 2167–80.
- Scharfman, H. E. (2007). The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, 163, 627–37. doi:10.1016/S0079-6123(07)63034-9
- Scharfman, H. E., Hintz, T. M., Gomez, J., Stormes, K. A., Barouk, S., Malthankar-phatak, G. H., ... Neil, J. (2008). Changes in hippocampal function of ovariectomized rats after sequential low doses of estradiol to simulate the preovulatory estrogen surge. *Eur J Neurosci.*, 26(9), 2595–2612.
- Scharfman, H. E., & MacLusky, N. J. (2006). Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27(4), 415–35.
doi:10.1016/j.yfrne.2006.09.004

- Scharfman, H. E., Mercurio, T. C., Goodman, J. H., Wilson, M. A., & Maclusky, N. J. (2003). Hippocampal Excitability Increases during the Estrous Cycle in the Rat : A Potential Role for Brain-Derived Neurotrophic Factor. *The Journal of Neuroscience*, *23*(37), 11641–11652.
- Scharfman, H. E., & Myers, C. E. (2012). Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Frontiers in Neural Circuits*, *6*(January), 106. doi:10.3389/fncir.2012.00106
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateralhipòcampal lesions. *J.Neurol. Neurosurg.Psychiat.*, *20*, 11–21.
- Seress, L., & Ribak, C. E. (1983). GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Experimental Brain Research*, *50*(2-3), 173–82.
- Shepherd, G. M. G., & Harris, K. M. (1998). Three-Dimensional Structure and Composition of CA3 3 CA1 Axons in Rat Hippocampal Slices : Implications for Presynaptic Connectivity and Compartmentalization. *The Journal of Neuroscience*, *18*(20), 8300–8310.
- Sherwin, B. B. (2009). Estrogen therapy: is time of initiation critical for neuroprotection? *Nature Reviews. Endocrinology*, *5*(11), 620–7. doi:10.1038/nrendo.2009.193
- Shughrue, P. J., & Merchenthaler, I. (2000a). 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. doi:10.1006/frne.1999.0190
- Shughrue, P. J., & Merchenthaler, I. (2000b). Evidence for novel estrogen binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience*, *99*(4), 605–12.
- Shughrue, P., Scrimo, P., Lane, M., Askew, R., & Merchenthaler, I. (1997). The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology*, *138*(12), 5649–5652.
- Si, B., & Treves, A. (2009). The role of competitive learning in the generation of DG fields from EC inputs. *Cognitive Neurodynamics*, *3*(2), 177–87. doi:10.1007/s11571-009-9079-z
- Sik, A., Penttonen, M., & Buzsáki, G. (1997). Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *The European Journal of Neuroscience*, *9*(3), 573–88.
- Sindreu, C., Palmiter, R. D., & Storm, D. R. (2011). Zinc transporter ZnT-3 regulates presynaptic Erk1 / 2 signaling and hippocampus-dependent memory. *PNAS*, *108*(8), 2–6. doi:10.1073/pnas.1019166108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1019166108

- Singer, C. A., Figueroa-Masot, X. A., Batchelor, R. H., & Dorsa, D. M. (1999). The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(7), 2455–63.
- Singh, M., Meyer, E., & Simpkins, W. (2014). The Effect of Ovariectomy and Estradiol Replacement Messenger on Brain-Derived Neurotrophic Factor Ribonucleic Acid Expression in Cortical Hippocampal Brain Regions of Female Sprague-Dawley Rats and . *The Endocrine Society*, *136*(5), 2320–2324.
- Smejkalova, T., & Woolley, C. S. (2010). Estradiol acutely potentiates hippocampal excitatory synaptic transmission through a presynaptic mechanism. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(48), 16137–48. doi:10.1523/JNEUROSCI.4161-10.2010
- Smith, C. C., & McMahon, L. L. (2005). Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(34), 7780–91. doi:10.1523/JNEUROSCI.0762-05.2005
- Smith, C. C., Vedder, L. C., & McMahon, L. L. (2009). Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology*, *34 Suppl 1*, S130–42. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.06.003
- Smith, M. S., Freeman, M. E., & Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, *96*(1), 219–26. doi:10.1210/endo-96-1-219
- Sohrabji, F., Miranda, R. C., & Toran-Allerand, C. D. (1995). Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(24), 11110–4.
- Sorra, K. E., & Harris, K. M. (2000). Overview on the Structure , Composition , Function , Development , and Plasticity of Hippocampal Dendritic Spines. *Hippocampus*, *10*, 501–511.
- Spencer, J. L., Waters, E. M., Romeo, R. D., Wood, G. E., Milner, T. A., Mcewen, B. S., ... York, N. (2008). Uncovering the Mechanisms of Estrogen Effects on Hippocampal Function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *29*(2), 219–237.

- Squire, L. R. (1992). Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 4(3), 232–43. doi:10.1162/jocn.1992.4.3.232
- Squire, L. R., Knowlton, B., & Musen, G. (1993). The structure and organization of memory. *Annual Review of Psychology*, 44, 453–95. doi:10.1146/annurev.ps.44.020193.002321
- Stahnisch, F. W., & Nitsch, R. (2002). Santiago Ramón y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on. *Trends in Neurosciences*, 25(11), 589–591.
- Suh, H., Deng, W., & Gage, F. H. (2009). Signaling in adult neurogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 253–75. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113256
- Sutcliffe, J. S., Marshall, K. M., & Neill, J. C. (2007). Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural Brain Research*, 177(1), 117–25. doi:10.1016/j.bbr.2006.10.029
- Takeda, A., Minami, A., Sakurada, N., Nakajima, S., & Oku, N. (2007). Response of hippocampal mossy fiber zinc to excessive glutamate release. *Neurochemistry International*, 50(2), 322–7. doi:10.1016/j.neuint.2006.08.015
- Takeda, A., Nakamura, M., Fujii, H., & Tamano, H. (2013). Synaptic Zn(2+) homeostasis and its significance. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 5(5), 417–23. doi:10.1039/c3mt20269k
- Takeda, A., & Tamano, H. (2012). Proposed glucocorticoid-mediated zinc signaling in the hippocampus. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 4(7), 614–8. doi:10.1039/c2mt20018j
- Tanapat, P., Hastings, N. B., & Gould, E. (2005). Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *The Journal of Comparative Neurology*, 481(3), 252–65. doi:10.1002/cne.20385
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, J., & Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), 5792–801.
- Tashiro, A., Makino, H., & Gage, F. H. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(10), 3252–9 (March 21, 2007). doi:10.1523/JNEUROSCI.4941-06.2007

- Teter, B., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (1999). Role of apolipoprotein e and estrogen in mossy fiber sprouting in hippocampal slice cultures. *Neuroscience*, *91*(3), 1009–1016.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., & Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*, *10*(3), 475–489. doi:10.1016/0896-6273(93)90335-O
- Tóth, K. (2011). Zinc in neurotransmission. *Annual Review of Nutrition*, *31*, 139–53. doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145218
- Treves, a, Tashiro, a, Witter, M. P., & Moser, E. I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, *154*(4), 1155–72. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.04.073
- Ueno, S., Tsukamoto, M., Hirano, T., Kikuchi, K., Yamada, M. K., Nishiyama, N., ... Ikegaya, Y. (2002). Mossy fiber Zn²⁺ spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. *The Journal of Cell Biology*, *158*(2), 215–20. doi:10.1083/jcb.200204066
- Ulas, M., & Cay, M. (2011). Effects of 17 β -estradiol and vitamin E treatments on blood trace element and antioxidant enzyme levels in ovariectomized rats. *Biological Trace Element Research*, *139*(3), 347–55. doi:10.1007/s12011-010-8669-2
- Urban, N. N., & Henze, D. A. (2001). Revisiting the Role of the Hippocampal Mossy Fiber Synapse. *Hippocampus*, *417*, 408–417.
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(4), 272–82. doi:10.1038/nrn2614
- Walf, A. a, Rhodes, M. E., & Frye, C. a. (2006). Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *86*(1), 35–46. doi:10.1016/j.nlm.2006.01.004
- Warren, S. G., Humphreys, A. G., Juraska, J. M., & Greenough, W. T. (1995). LTP varies across the estrous cycle : enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Research*, *703*, 26–30.
- Warren, S. G., & Juraska, J. M. (1997). Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behavioral Neuroscience*, *111*(2), 259–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106666>
- Waters, E. M., Yildirim, M., Janssen, W. G. M., Lou, W. Y. W., McEwen, B. S., Morrison, J. H., & Milner, T. a. (2011). Estrogen and aging affect the synaptic distribution of estrogen receptor β -immunoreactivity in the CA1 region of female rat hippocampus. *Brain Research*, *1379*, 86–97. doi:10.1016/j.brainres.2010.09.069

- Westwood, F. R. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375–84. doi:10.1177/0192623308315665
- Witter, M. P., Groenewegen, H. J., Lopes da Silva, F. H., & Lohman, a. H. M. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology*, 33(3), 161–253. doi:10.1016/0301-0082(89)90009-9
- Woolley, C. S. (2007). Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 657–80. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105219
- Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1992). Estradiol Mediates during the Estrous Fluctuation in Hippocampal Cycle in the Adult Rat Synapse Density. *The Journal of Neuroscience*, 12(July), 2549–2554.
- Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1992). Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(7), 2549–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613547>
- Woolley, S., & McEwen, S. (1990). Naturally Occurring Fluctuation in Dendritic Hippocampal Pyramidal Neurons Spine Density on Adult. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, (December).
- Xie, X., & Smart, T. G. (1994). Modulation of long-term potentiation in rat hippocampal pyramidal neurons by zinc. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 427(5-6), 481–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7971146>
- Xu, X., & Zhang, Z. (2006). Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sciences*, 79(16), 1553–60. doi:10.1016/j.lfs.2006.04.020
- Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1990). Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4963), 1619–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2114039>
- Zhou, L., Lehan, N., Wehrenberg, U., Disteldorf, E., von Lossow, R., Mares, U., ... Rune, G. M. (2007). Neuroprotection by estradiol: a role of aromatase against spine synapse loss after blockade of GABA(A) receptors. *Experimental Neurology*, 203(1), 72–81. doi:10.1016/j.expneurol.2006.07.020

XI. ANEXOS

Se anexan dos artículos publicados que se derivaron de este trabajo de tesis:

- **Padilla-Gómez E**, Beltrán-Campos V, Montes S, Díaz-Ruíz A, Quirarte G, Ríos C, Diaz-Cintra S. Effect of 17 β -estradiol on zinc content of hippocampal mossy fibers in ovariectomized adult rats. **Biometals**, Biometals. 2012. Dec; 25(6):1129-1139. Febrero, **2012**, revisado Abril 22-2012, re-enviado junio 2012. Aceptado Julio, 2012. DOI 10.1007/s10534-0129575-1. Print ISSN: 0966-0844. Online ISSN: 0966- **FI= 3.23**.
- Beltrán-Campos V, **Padilla-Gómez E**, Díaz-Ruiz, M. Alcaraz-Zubeldia, S. Galván-Arzate, C. Ríos, Prado-Alcalá RA, Ramírez-Amaya V, Díaz-Cintra S: Estrogen modulation, oxidative stress and aging on dendritic spines of CA1 pyramidal cells of the dorsal hippocampus. **Neurología. 2014**.
- Beltrán-Campos, Vicente, **Padilla-Gómez, Eúridice**, Aguilar-Vázquez, Azucena, Palma, Lourdes, Díaz-Cintra, Sofía. Bases neurobiológicas del envejecimiento neuronal. Revista Universitaria Digital, Marzo 2011 Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de marzo de 2011, Vol. 12, No.3. Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num3/art32/index.html> ISSN: 1607-6079.

Effect of 17 β -estradiol on zinc content of hippocampal mossy fibers in ovariectomized adult rats

E. Padilla-Gómez · V. Beltrán-Campos ·
S. Montes · A. Díaz-Ruíz · G. L. Quirarte ·
C. Ríos · S. Diaz-Cintra

Received: 3 February 2012 / Accepted: 13 July 2012
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

Abstract Sex hormones such as estrogen (17 β -estradiol) may modulate the zinc content of the hippocampus during the female estrous cycle. The mossy fiber system is highly plastic in the adult brain and is influenced by multiple factors including learning, memory, and stress. However, whether 17 β -estradiol is able to modulate the morphological plasticity of the mossy fibers throughout the estrous cycle remains unknown. Ovariectomized (Ovx) female 70- to 90-day-old Sprague-Dawley rats without or with estrogen

supplement (OvxE) were compared with control rats in three stages of the estrous cycle: diestrus, proestrus, and estrus. The brain tissue from each of the five groups was processed with Timm's silver sulfide technique using the Image J program to measure the mossy fiber area in the *stratum lucidum* of CA3. Total zinc in the hippocampus was measured using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry. Two additional (Ovx and OxvE) groups were examined in spatial learning and memory tasks using the Morris water maze. Similar increases in total zinc content and mossy fiber area were observed. The mossy fiber area decreased by $26 \pm 2\%$ (difference \pm SEM percentages) in Oxv and $23 \pm 4\%$ in estrus as compared to the proestrus group and by $18 \pm 2\%$ in Oxv compared to OxvE. Additionally, only the OxvE group learned and remembered the task. These results suggest that estradiol has a significant effect on zinc content in hippocampal CA3 during the proestrus stage of the estrous cycle and is associated with correct performance in learning and memory.

Keywords Zinc · Hippocampus · Mossy fibers · Estrous cycle · Estrogen

E. Padilla-Gómez · V. Beltrán-Campos ·
S. Diaz-Cintra (✉)
Departamento de Neurobiología del Desarrollo y
Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad
Nacional Autónoma de México, Campus UNAM
Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, 76230 Querétaro,
Mexico
e-mail: yoldi@unam.mx

V. Beltrán-Campos
División de Ciencias de la Salud e Ingenierías,
Universidad de Guanajuato, campus Celaya-Salvatierra,
38110 Guanajuato, Mexico

S. Montes · A. Díaz-Ruíz · C. Ríos
Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de
Neurología y Neurocirugía, SSA, 14269 Mexico, DF,
Mexico

G. L. Quirarte
Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva,
Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Campus Juriquilla, 76230
Querétaro, Mexico

Introduction

In the adult rat hippocampus, mossy fiber axons of dentate granule cells converge in the dentate *hilus* and run through a narrow area called the *stratum lucidum*, where the axons form excitatory glutamatergic

synapses with hilar and CA3 pyramidal neurons. The well-documented synaptic rearrangement of mossy fibers is associated with several events such as seizures (Weidner et al. 2011), temporal lobe epilepsy (Sanchez et al. 2012), malnutrition (Granados-Rojas et al. 2004), learning, memory (Sindreu and Storm 2011), hormone-related factors like stress (Takeda and Tamano 2012), and the pathogenesis of depression (Takeda 2012); these rearrangements could play a crucial role in both neuroprotective and neurotoxic functions (for review see Tóth 2011). The mossy fiber architecture is linked to neurotrophic factors such as fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Paradiso et al. 2011); the latter has also been proposed as a key regulator and mediator of long-term synaptic modifications related to learning and memory maintenance (Gómez-Palacio-Schjetnan and Escobar 2008). During proestrus, hippocampal mossy fiber axons contain the highest concentration of BDNF (Scharfman et al. 2003).

The first evidence of zinc accumulation in hippocampal mossy fibers was obtained 50 years ago, using the Timm staining method which precipitates metal cations in situ and allows their visualization by silver amplification (Timm 1958; Danscher 1981). The physiological role of synaptic zinc has remained enigmatic, and many of the recent findings on synaptic zinc had not been anticipated until 5 years ago. In mossy fibers, zinc-containing vesicles represent a subpopulation with a unique composition of membrane proteins (Tóth 2011). Recent studies using knock-out mice for the synapse-specific zinc transporter ZnT-3 indicate that vesicular zinc is required for the formation of hippocampus- and amygdala-dependent memories; these two brain centers are prominently innervated by zinc-rich fibers (Sindreu and Storm 2011). Pre-synaptic zinc is observed in brain from mammals but is largely restricted to cortical and limbic regions and the mossy fiber terminals of the hippocampus, which represent a special case, as they are both glutamatergic and GABAergic (Ruiz et al. 2004; Beltrán et al. 2012). Several studies have also examined the effects of zinc on synaptic ion channels, receptors (GABA, kainate, NMDA, AMPA), and plasticity that participate in the molecular mechanisms underlying the increased propensity of these fibers to invade the inner molecular layer (Lin et al. 2011) or the basal dendrites localized in the *stratum oriens* of CA3, indicating its high plasticity due to overtraining

in spatial memory tasks (Ramírez-Amaya et al. 1999; 2001).

Estrogens have a profound influence on neuronal excitability, seizures, and epilepsy (Scharfman and MacLusky 2006) and in hippocampal damage induced by *status epilepticus* (Velísková et al. 2000); they also have neuroprotective effects in Alzheimer's disease (Petrovska et al. 2012), ischemia (Díaz Cintra et al. 2009; Lebesgue et al. 2009), stroke (Rexrode and Manson 2012), and other conditions leading to neuronal cell death, suggesting that acute estrogen therapy has an anti-apoptotic effect and increases cerebral plasticity. Thus, multiple lines of evidence suggest that estrogens play an important role in cerebroprotection (Wappler et al. 2011).

Estrogens are known to elicit broad effects on neuronal plasticity, as shown in studies of estrogen-deprivation that leads to increased vulnerability of granule cells in adult hippocampus and may cause a predisposition to neurological diseases and increased incidence of deficits in working memory occurring after menopause (Liu et al. 2001). In addition, estrogen enhances spine density on apical dendrites of CA1 pyramidal cells in the hippocampus, a brain region required for spatial learning (Woolley et al. 1997; Woolley 2007; McEwen 2002; Smith et al. 2009). In CA3–CA1 synapses between pyramidal cells, estrogen has also been shown to enhance the synaptic NMDA receptor current and the magnitude of long-term potentiation (LTP), having cellular correlates with learning and memory (Woolley 2007). This hormone increases synaptic function and, in doing so, it modulates potential mechanisms contributing to estrogen-induced changes in synaptic morphology and plasticity (Tanapat et al. 1999; Xu and Zhang 2006; Sato et al. 2007). Zinc plays an important role in glutamatergic synapses, which form clusters with large amounts of zinc in the mossy fibers. The incorporation of zinc into vesicles is associated with a pre-synaptic transporter protein (ZnT3) which is only expressed in brain (Palmiter et al. 1996; Wenzel et al. 1997). This transporter has been located by immunocytochemistry along mossy fibers in CA4, CA3, and the *hilus* of dentate gyrus (Cole et al. 1999). The physiological activity of free zinc in brain might largely depend on the pool of synaptic-vesicle zinc, which is determined by ZnT3 (Lee et al. 2011). Both zinc and its transporter (ZnT3) are necessary for LTP in the hippocampus (Sindreu and Storm 2011).

In spite of its crucial role, only scarce information is available regarding the role of zinc in estrogen-induced morphological and functional changes of the mossy fibers and *stratum lucidum* in CA3 pyramidal cells over the course of the estrous cycle. Hippocampal zinc regulation by 17β -estradiol in CA3 could be a key event in hippocampus since this could be related to hippocampal estrogen-receptor density which, in turn, varies during the estrous cycle (Gruart and Delgado-García 2007). The only study on this subject showed that ovariectomy in mice increased total and vesicular zinc, while estrogen supplement in ovariectomized rats reduced zinc levels (Lee et al. 2004). However, the latter study did not determine whether estrogens can alter the zinc content of hippocampal mossy fibers in every stage of the estrogenic cycle. Thus, we designed this study in order to determine if changes in the level of hippocampal zinc can be related to histological changes during the rat estrous cycle and how estrogen is related to learning and memory performance.

Materials and methods

Subjects

A total of 80 Sprague-Dawley female rats, 70–90 days of age (270–290 g), were used and treated in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals, and the local Animal Care and Use Committee approved the experiments. Rats were pair-housed in polycarbonate cages (45 × 24 × 21 cm) with adequate clean nesting material and free access to food (standard Purina Chow, formula 5001) and purified water throughout the experiment. Animals were maintained with a 12/12-h inverted light/dark cycle (lights off at 9:00 h) at 22–23 °C and 40–50 % humidity. To detect normal cycles, three vaginal smears were taken daily from 36 female rats, and groups were euthanized at proestrus, estrus, or diestrus (12 rats per stage). Tissue from each group ($n = 6$) was obtained for either Timm staining or zinc measurement. Additionally, 44 female rats were ovariectomized (Ovx), and half of them were supplemented with 17β -estradiol (OvxE). Four groups of six rats were formed and studied either by Timm staining or zinc measurement, and two more groups of ten rats each were tested for learning and memory in the Morris Water Maze (MWM).

Surgery

Ovaries were surgically removed (Ovx groups) from 38 animals under anesthesia with a combination of ketamine/xylazine (65/7.5 mg/kg) using aseptic procedures. These rats received ketofen (2×1 mg per day, s.c.) for 3 days following surgery to alleviate discomfort. After surgery, two animals were housed per cage. The recovery period was 2 weeks; then, four groups were formed for hormone supplementation (one injection per day, s.c., for 3 days): (1) the Ovx group was injected with vehicle, 0.2 ml of vegetable oil, and (2) the OvxE group was supplemented with 10 μ g of estradiol benzoate. Ovariectomy was verified by using immunoassay to determine estradiol plasma levels (Beltrán-Campos et al. 2011). Blood estradiol levels in Ovx animals (18.1 ± 2.43 pg/ml) were determined 15 days after surgery. Even though the ELISA method is not accurate enough to precisely determine blood estradiol, measures obtained were below those reported during proestrus, indicating that ovariectomy was effective in reducing the circulating levels of estradiol. Moreover, ovariectomy was carefully verified by visual inspection.

Tissue collection for Timm staining

To estimate the area of the suprapyramidal bundle of the mossy fibers, a total of 30 animals (proestrus, estrus, diestrus, Ovx, and OvxE), six per group, were analyzed using the Timm histological technique. All animals were anesthetized (pentobarbital, 0.63 mg/kg), weighed, and perfused transcardially with a buffered sodium sulfide solution (5.85 g Na_2S , 5.95 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 500 ml distilled water) followed by 1 % paraformaldehyde and 1.25 % glutaraldehyde in 0.10 M phosphate buffer, pH 7.4 (as described by West et al. 1988). Brains were removed, weighed, and post-fixed in the same fixative containing 30 % sucrose and remained in this solution until they sank to the bottom of the container. Then the hippocampal formation was frozen and cut into coronal sections at a nominal 40 μ m thickness. Sections were serially mounted and processed using a modification of Timm's sulfide silver technique, as described elsewhere (Cintra et al. 1997; Granados-Rojas et al. 2004). Each slide was assigned a random number to ensure that the observer was blind to treatments (Fig. 1).

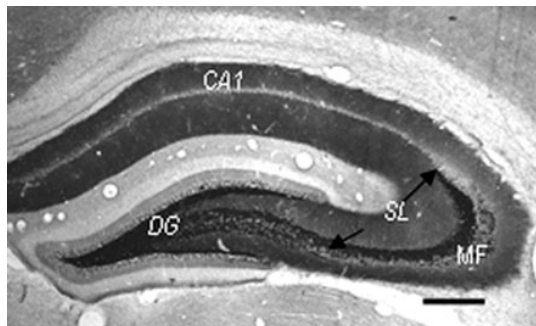


Fig. 1 Representative hippocampal coronal section used to estimate the area of the mossy fibers (MF) in the *stratum lucidum* (SL), limited with arrows; also shown are the dentate gyrus (DG) and CA1 areas; bar, 300 μm

Area of the mossy fiber system suprapyramidal bundle

The mossy fiber area in the suprapyramidal bundle, corresponding to the *stratum lucidum*, was estimated in sections selected from the dorsal hippocampus; every fifth section was obtained from a random starting position within the first five serially mounted sections. For each section, the boundaries of the suprapyramidal bundle were defined in agreement with Gaarskjaer (1985) and Amaral and Dent (1981), and its area was determined in right-side hippocampal sections with a $4\times$ objective lens and with the aid of a computer-assisted imaging analysis system (Image J), Fig. 1. The mean section thickness was $39.1 \pm 1.2 \mu\text{m}$. This was estimated from measurements of sections selected by a systematic, random-sampling procedure, using a microcator attached to the stage of a microscope and a $100\times$ oil immersion objective lens (Granados-Rojas et al. 2001, 2004). The area obtained (in μm^2) was subsequently corrected by a tissue shrinkage factor (SFv). For this purpose, a coronal section of hippocampal formation was obtained immediately after perfusion using a freezing microtome. The section was photographed and its cross-sectional area determined; the adjacent section was processed with Timm staining and photographed, and its cross-sectional area was determined. The SFv was then calculated for these areas using the method described by Van Eden and Uylings (1985). No significant differences were found in this parameter among the studied groups, i.e., the same SFv (1.11) was used throughout.

Zinc determination

Six animals per group at each stage of the EC (diestrus, proestrus and estrus), Ovx, and OvxE were used for zinc determination. Hippocampal tissue was dissected out from brain as rapidly as possible and placed in tubes previously washed with 30 % nitric acid solution to avoid external contamination. All the hippocampus weights were carefully recorded, and 1 ml of redistilled nitric acid was added to the samples. Tubes were then capped and placed on a shaking bath at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min. The resulting solution was assayed for zinc content in an atomic absorption spectrophotometer equipped with a graphite furnace and Zeeman background correction (Analyst 600, Perkin Elmer). The equipment was previously calibrated with a commercial zinc solution (Perkin Elmer GFAAS mixed standard). Quality control was assured by determination of zinc in a biological matrix-based standard material (Bovine liver 1577b, NIST); the analytical session was considered adequate when the quality control standard was 95–105 % of its nominal value. Results are expressed as μg of zinc per gram of wet tissue.

Spatial navigation apparatus

After surgery recovery and treatments, the two ten-animal groups were given a spatial training task in a MWM consisting of a circular pool with the computer SMART system (San Diego Instruments) software program, which monitored and recorded the swimming path of the rats for later analysis. The maze was constructed of black plastic (1.5 m diameter and 45 cm deep) and filled with water to a depth of 26.5 cm. The water temperature was adjusted to $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$). A 10-cm square, transparent acrylic platform was placed into the tank at a fixed location in the center of one imaginary quadrant and submerged 1.5 cm under water. The water maze tank was located in a separate room, illuminated by dim light, and surrounded by several spatial cues. As the platform could not be seen or detected by smell, rats had to learn to navigate to the platform by using visual cues (e.g. posters) in the vicinity of the tank (1.5–3 m) to escape the cold water. The training in the MWM consisted of 1 or 2 identical daily sessions (MWM1 and MWM2) of ten trials each. Every animal was introduced into the pool at different starting points for

each trial, and their order was constant for all the animals (Ramírez-Amaya et al. 2001; Beltrán-Campos et al. 2011). Each animal was allowed to swim until finding the platform and permitted to stay on the platform for 30 s. In the first trial, if the animal did not find the platform during the time limit (60 s), it was led to the platform by hand and then placed in a waiting cage for 30 s. Escape latency was measured on each trial for every animal. To measure memory, 24 h after the last training session, MWM2, a single-trial session was conducted under training conditions similar to those of the learning task; the only variation was that the platform was removed, and the measured parameter was the time spent in the quadrant where the platform was previously localized.

Statistical analysis

Repeated measures Analyses of Variance (ANOVA) tests were performed for acquisition results, and when the F-ratios were significant, Fisher's protected least significant difference test (Fisher's PLSD) was used to determine potential statistical differences of pair-wise comparisons. The memory parameter was analyzed with an unpaired Student's *t* test between Ovx and OvxE groups. Results were considered to be statistically significant if $P < 0.05$. Statview software was used for the analysis.

Results

Histological analysis

Figure 1 shows a representative Timm's silver staining of the hippocampal formation, highlighting mossy fibers in the *stratum lucidum*; images were digitalized and analyzed as described in the methods section.

To find out if the estrous cycle in the rat influences signal from these areas, we used female rats from different estrous phases, as well as Ovx and OvxE animals ($F_{4,25} = 4.633$; $P = 0.0062$). We found that female rats in estrus phase showed decreased mossy fibers ($23 \pm 4\%$, difference \pm SEM percentages) in comparison with animals in proestrus phase ($P < 0.05$). Ovx animals also showed decreased signal area ($P < 0.05$) in both groups this decreased was estimated by a $26 \pm 2\%$ compared to proestrus; estrogen supplement in OvxE partially prevented this

effect which was calculated by a $10 \pm 3\%$ as compared to the proestrus group (Fig. 2).

Tissue zinc content

Timm's staining is related to zinc content, for this reason the metal content was determined in hippocampal tissue ($F_{4,25} = 4.879$; $P = 0.0048$). Figure 3 shows that zinc content was lower in the hippocampus of rats in estrus ($71 \pm 13\%$) and diestrus ($37 \pm 13\%$) than in those from proestrus. In addition, a reduction in zinc content ($81 \pm 12\%$) was observed in the hippocampus of Ovx animals ($P < 0.05$ versus proestrus). Interestingly, hormonal supplement partially restored in a $46 \pm 12\%$ Zn levels as compared to Ovx animals.

Behavioral test in Ovx and OvxE

After observing that zinc, mossy fiber, and *stratum lucidum* areas evaluated by Timm's staining varied

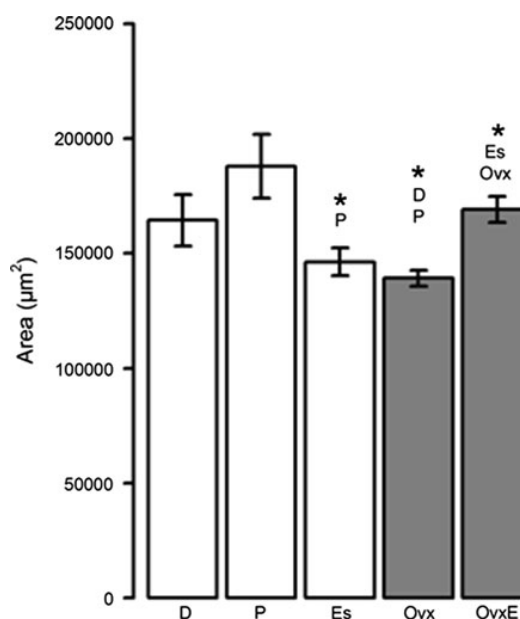


Fig. 2 Area (mean \pm SEM) of the mossy fiber *stratum lucidum* in five groups: gonadally intact: diestrus (D), proestrus (P), and estrus (Es) from cycling female rats; and ovariectomized without supplementation (Ovx) and with a 10 μ g dose of 17 β -estradiol (OvxE). Note the *significant decreases in Ovx compared to D ($P < 0.05$), Es ($P < 0.001$) and Ovx ($P < 0.001$) in relation with P, and a significant increase in OvxE ($P < 0.01$) compared to Ovx and Es

depending on the estrous cycle, and since zinc has been related to the LTP phenomenon in the hippocampus, we explored the possibility that spatial learning and memory may also be influenced by estrogens in female rats.

Learning performance in MWM was evaluated individually and showed that rats in both the Ovx and OvxE groups reduced the latency time to reach the platform after sequential training (Day 1: $F_{(19,180)} = 2.237$ and $P = 0.0034$; Day 2: $F_{(19,180)} = 2.515$ and $P = 0.00084$). However, the comparison between groups showed that Ovx rats took more time to find the platform than OvxE rats in trials 9 and 10 on day 1. This effect was more evident on the sessions of day 2, reaching statistical significance on trials 5 and 7–10 (Fig. 4).

For the memory test, latency to reach the learned platform location was measured 24 h after the last learning session in a single trial. Figure 5 shows that OvxE rats remembered the task ($P = 0.0366$) while Ovx rats did not attain the memory threshold.

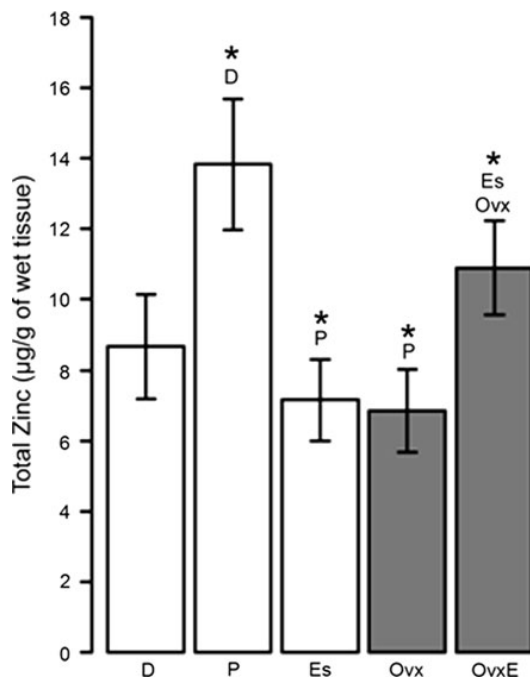


Fig. 3 Zinc content (mean \pm SEM) in five groups: gonadally intact: diestrus (D), proestrus (P), and estrus (Es) from cycling female rats, Ovx and OvxE. Note the *significant decreases in the D, Es, and Ovx groups in relation to the P group and a significant increase in OvxE compared to Ovx and Es

Discussion

In this study we present suggestive evidence that estrogen plays an important role in the plasticity and maintenance of mossy fibers in hippocampal CA3 evaluated by Timm’s staining. The area of the suprapyramidal bundle of the mossy fibers, evaluated by Timm’s staining, was significantly reduced in Ovx, with a $26 \pm 2 \%$ decrease compared to proestrus; a phenomenon that is reversed when the animals are supplemented with physiological doses of 17β estradiol (OvxE).

Zinc levels are also reduced in $46 \pm 12 \%$ in that same brain area in Ovx compared to OvxE rats. Interestingly, Ovx rats showed a poorer performance in the MWM than the Ovx rats supplemented with estrogen. The results obtained here suggest that estrogen, hippocampal zinc regulation, and spatial memory could be related.

The physiological role of vesicular zinc at glutamatergic synapses remains poorly understood, even though it is well known that zinc homeostasis is modulated by pre-synaptic MAPK/ERK signaling and that events derived from this cascade are required for hippocampus-dependent memory consolidation. A link between estrogen, and spatial memory is in

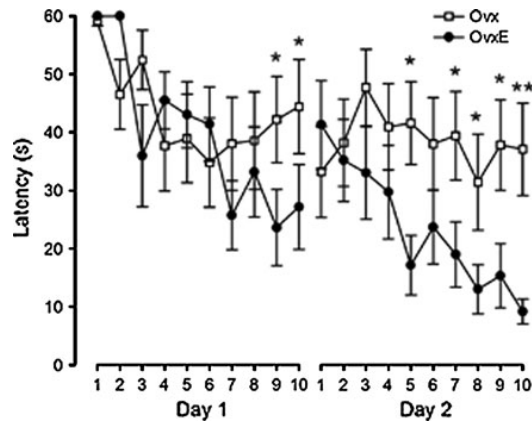


Fig. 4 Mean \pm SEM of acquisition performance of animals subjected to 2 days of training (MWM1 and MWM2). Each point represents the latency to reach the target platform on each consecutive trial. Repeated measures ANOVA showed *significant differences on trials 9 and 10 of day 1 and on trials 5, 7, 8, 9, and 10 on day 2 for trained OvxE groups. Also, between trials 1 and 10, only the OvxE group showed significantly reduced latency; the Ovx group did not reach the required latency threshold (30 s) that would indicate learning

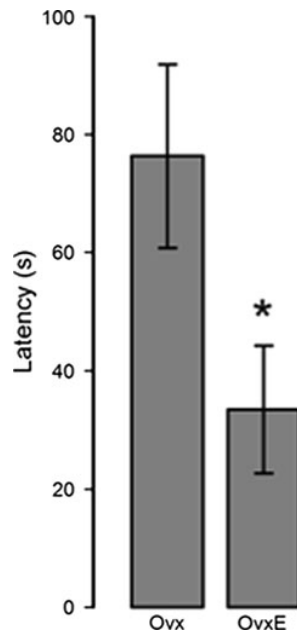


Fig. 5 Mean \pm SEM of water maze performance during the memory test after 2 days of learning. Latency in seconds spent by the Ovx and OvxE groups to locate the platform area. The Student's *t* test showed *significant differences between groups

agreement with previous studies in which ovariectomy produces deficits in the acquisition of the MWM task (Xu and Zhang 2006; Sarkaki et al. 2008) and with others showing that hormone replacement improves performance in spatial learning tasks (Daniel et al. 1997; Fader et al. 1998; Luine et al. 1998; El-Bakri et al. 2004; Li et al. 2004; Xu and Zhang 2006; Gresack and Frick 2006), demonstrating that these learning deficits are related to low levels of circulating estradiol. In addition, the anatomical substrate (hippocampus) responds to low levels of estradiol by decreasing the area of mossy fibers and the level of zinc; both effects were reversed with adequate hormone replacement. Moreover, the larger mossy fiber area and greater zinc density of the hippocampal mossy fibers correlate with better performance in spatial tasks in the rat. The increase of mossy fiber area in the *stratum oriens* of CA3 due to overtraining in male rats (Ramírez-Amaya et al. 1999) or to exercise (Toscano-Silva et al. 2010; Gomes da Silva et al. 2010) is well documented; however, in females this effect depends on the estrous cycle stage and on BDNF, which is the most likely candidate molecule to be involved in regulating mossy fiber pathfinding and

may act as a signal for new mossy fibers to fasciculate and extend further to form synapses (Scharfman et al. 2003; Sato et al. 2007). Another important observation is that, in adult female rats, hippocampal changes occur when estradiol rises on the morning of proestrus, when animals respond better to object- and place-recognition tests (Scharfman et al. 2007). The study of Smith et al. (2009) agrees with the fact that this hormone increases synaptic function and plasticity and alters synaptic morphology.

Mossy fiber terminals form a distinctive type of synapse rich in zinc and involved in regulating ion channels and intracellular signaling pathways implicated in learning, memory, and neuroplasticity (Sindreu and Storm 2011; Tóth 2011). Vesicular zinc promotes presynaptic and inhibits postsynaptic long-term potentiation of mossy fiber-CA3 synapses (Pan et al. 2011). Thus, zinc seems to satisfy several criteria for a neural messenger: it is stored in synaptic vesicles, is released upon depolarization, and acts at various membrane targets. The selective association of zinc with glutamate-containing synaptic vesicles suggests that zinc might be a co-transmitter at some excitatory synapses (Paoletti et al. 2009). Zinc may modulate the structure and the function of the post-synaptic density as well as the molecular organization and plasticity of the pre-synaptic cytomatrix zone, allowing the expression of synaptic plasticity (Gundelfinger et al. 2006; Grabrucker et al. 2011; Gundelfinger and Fejtova 2011). A feature unique to this divalent metal ion is that it is a candidate for transynaptic anterograde messenger into postsynaptic neurons in the hippocampus (Ketterman and Li 2008).

The pool of zinc-containing synaptic vesicles in brain is special because of its lability; it can be identified using simple histochemical techniques such as Timm's staining or dye fluorescence (Frederickson et al. 1987). Here, we used an improved variant of the former technique to obtain consistently better visualization of the hippocampal mossy fiber system in the five groups studied; the results showed that physiological fluctuations of estradiol levels profoundly affect the area of the mossy fibers in the dorsal hippocampus; this area increases significantly during proestrus, by $22 \pm 4\%$ compared to the estrus group and by $26 \pm 2\%$ compared to the Ovx group. Ovariectomy has a long-term effect, because the result was measured 15 days after surgery. The low dose (10 μg) of estradiol was enough to re-establish the

area of the mossy fibers. This is consistent with the finding of increased neurogenesis of granular cells during proestrus and a neurogenesis peak in Ovx rats supplemented with 10 μg of 17β -estradiol (Tanapat et al. 1999, 2005). Scharfman et al. (2007) found changes in hippocampal function of Ovx rats after sequential low doses of estradiol; they reported that mossy fiber stimulation evoked the expression of BDNF and multiple population spikes in CA3. In mouse hippocampal slices in vitro, Teter et al. (1999) reported an increase of 75 % in dorsal sprouting of the dentate gyrus during treatment with 17β -estradiol (100 pM); however, this response is blocked by both progesterone and tamoxifen. We did not find significant differences in the mossy fiber area when a daily dose of 50 μg of 17β -estradiol was compared to the low dose of 10 $\mu\text{g}/\text{day}$ (data not shown).

In the recent review by Tóth (2011), the fact that Zn can be either disruptive or protective in the hippocampus connectivity is suggestive; furthermore, the author states that physiological zinc release could be related to maintaining a stable neuron network and preventing cell death. The premise for these effects is that zinc should be within specific levels in this brain region to fulfill a physiological role. The fact that mice lacking the ZnT3 transport are more susceptible to kainic acid-induced seizures (Cole et al. 2000) reinforces the idea that zinc is playing a physiological, protective role against glutamate overexcitation, since zinc release from mossy fibers excited by glutamate attenuated calcium entrance into postsynaptic CA3 cells, suggesting a modulatory role of the metal (Takeda et al. 2007). Calcium signals are thus modulated through Zn release not only as a consequence of glutamate release, but also at the level of channels and receptors, since zinc is able to inhibit NMDA receptors (Paoletti et al. 2009) and voltage-dependent calcium channels (Takahashi and Akaike 1991).

It has also been reported that zinc levels could be subject to steroidal regulation at different levels; there is experimental evidence that ovariectomized rats showed decreased levels of circulating zinc (Ulas and Cay 2011). In humans, plasma zinc levels fluctuate during the menstrual cycle, and these changes showed a positive correlation with plasma estrogen concentrations (Michos et al. 2010), a fact that could be related to diminished zinc availability during menstruation in the whole organism, including brain. It is possible, then, that estrogen is involved in zinc

homeostasis, in the whole body as well as in brain and, furthermore, in specific brain areas.

With the results presented here, we cannot discard the possibility that estradiol could be acting to counterbalance the effects produced by corticosteroid hormones in the hippocampus, on both zinc levels and cognitive performance, as observed in severe stress: reduced cognitive performance, reduced zinc neurotransmission, and increased corticosteroid hormones (Takeda and Tamano 2012).

The relationship between steroid hormones and zinc in the hippocampus may have other important implications, including the fact of diminished sex hormone production in aging, which could be related to altered zinc homeostasis in the hippocampus and thus to memory impairments associated with age. In a more speculative vein, dysfunctional zinc homeostasis could also be linked to neurodegenerative diseases since zinc accumulation in the senile plaques from Alzheimer brain patients has been reported (Danscher et al. 1997).

The data reported here suggest a plastic, on/off effect of circulating estrogen in the *stratum lucidum* area of the rat dorsal hippocampus over the course of the estrous cycle. The area occupied by mossy fibers in the *stratum lucidum* was larger during the proestrus stage, which coincides with a higher concentration of circulating estrogens. In addition, the amount of zinc in the hippocampus correlates with mossy fiber area as well as with better performance in spatial tasks. In Ovx rats, the values of these parameters were lower and were associated with poorer performance in the MWM. The present results show for the first time that estrogen modulates the plasticity and maintenance of mossy fibers in hippocampal CA3 during proestrus. While suggestive, these data are not sufficient to infer changes in synaptic connectivity; therefore, another approach to the problem would be to use electron microscopy to look for ultrastructural modifications at pre- and post-synaptic sites (i.e., post-synaptic density in thorny excrescences in the *stratum lucidum* as well as pre-cytomatrix density in mossy fibers) in groups of rats with different estrogen levels associated with ZnT3 levels, the key protein for zinc transport by synaptic vesicles.

Acknowledgments This work was carried out in partial fulfillment of the requirements to obtain the Doctor's Degree (Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM) by E. Padilla-Gómez, who was a recipient of graduate scholarship from CONACYT (17276) and by the support of DGAPA-UNAM.

The authors wish to thank A. Aguilar Vázquez, T. Martínez, L. Palma, N. Hernández, N. Serafin, and M. García for technical assistance. We are grateful to M.Sc. S. Castro for her invaluable suggestions on the manuscript and to Dr. D. Pless for proofreading.

References

- Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: a light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51–86
- Beltrán JQ, Reyes S, Pérez-Guzmán JA, Elías-Viñas D, Gutiérrez R (2012) Dissociation of CA3 pyramidal cells with attached, functional, identified mossy fiber and interneuronal boutons for studying glutamatergic and GABAergic synaptic transmission. *J Neurosci Methods* 208:155–160
- Beltrán-Campos V, Prado-Alcalá RA, León-Jacinto U, Aguilar Vázquez A, Quirarte GL, Ramírez-Amaya V, Díaz-Cintra S (2011) Increase of mushroom spine density in CA1 apical dendrites produced by water maze training is prevented by ovariectomy. *Brain Res* 1369:119–130
- Cintra L, Granados L, Aguilar A, Kemper T, Debassio W, Galler J, Morgane P, Durán P, Díaz-Cintra S (1997) Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus* 7:184–191
- Cole TB, Wenzel HJ, Kafer KE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1999) Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1716–1721
- Cole TB, Robbins CA, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (2000) Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. *Epilepsy Res* 39:153–169
- Daniel JM, Fader AJ, Spencer AL, Dohanich GP (1997) Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav* 32:217–225
- Danscher G (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry* 71:1–16
- Danscher G, Jensen KB, Frederickson CJ, Kemp K, Andreasen A, Juhl S, Stoltenberg M, Ravid R (1997) Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's diseased brains: a proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material. *J Neurosci Methods* 76:53–59
- Díaz Cintra S, Xue B, Spigelman I, Van K, Wong AM, Obenaus A, Ribak CE (2009) Dentate granule cells form hilar basal dendrites in a rat model of hypoxia-ischemia. *Brain Res* 1285:182–187
- El-Bakri NK, Islam A, Zhu S, Elhassan A, Mohammed A, Winblad B, Adem A (2004) Effects of estrogen and progesterone treatment on rat hippocampal NMDA receptors: relationship to Morris water maze performance. *J Cell Mol Med* 8:537–544
- Fader AJ, Hendricson AW, Dohanich GP (1998) Estrogen improves performance of reinforced T-maze alternation and prevents the amnesic effects of scopolamine administered systemically or intrahippocampally. *Neurobiol Learn Mem* 69:225–240
- Frederickson CJ, Kasarskis EJ, Ringo D, Frederickson RE (1987) A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J Neurosci Methods* 20:91–103
- Gaarskjaer FB (1985) The development of the dentate area and the hippocampal mossy fiber projection of the rat. *J Comp Neurol* 241:154–170
- Gomes da Silva S, Unsain N, Mascó DH, Toscano-Silva M, de Amorim HA, Silva Araújo BH, Simões PS, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Mortara RA, Scorza FA, Cavaleiro EA, Arida RM (2010) Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. *Hippocampus* 22:347–358
- Gómez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML (2008) In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neurosci Lett* 445:62–67
- Grabrucker AM, Knight MJ, Proepper C, Bockmann J, Joubert M, Rowan M, Nienhaus GU, Garner CC, Bowie JU, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Boeckers TM (2011) Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *EMBO J* 30:569–581
- Granados-Rojas L, Larriva Sahd J, Cintra L, Gutierrez-Ospina G, Rondán A, Díaz-Cintra S (2001) Prenatal protein decreases mossy fibers CA3 thorny excrescences asymmetrical synapses in adult rats. *Brain Res* 933:164–171
- Granados-Rojas L, Aguilar A, Díaz-Cintra S (2004) The mossy fiber system of the hippocampal formation is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *Nutr Neurosci* 7:301–308
- Gresack JE, Frick KM (2006) Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. *Pharmacol Biochem Behav* 84:112–119
- Gruart A, Delgado-García JM (2007) Activity-dependent changes of the hippocampal CA3–CA1 synapse during the acquisition of associative learning in conscious mice. *Genes Brain Behav* 6:24–31
- Gundelfinger ED, Fejtova A (2011) Molecular organization and plasticity of the cytomatrix at the active zone. *Curr Opin Neurobiol* 22:1–8
- Gundelfinger ED, Boeckers TM, Baron MK, Bowie JU (2006) A role for zinc in postsynaptic density assembly and plasticity. *Trends Biochem Sci* 31:366–373
- Ketterman JK, Li YV (2008) Presynaptic evidence for zinc release at the mossy fiber synapse of rat hippocampus. *J Neurosci Res* 86:422–434
- Lebesgue D, Chevaleyre V, Zukin RS, Etgen AM (2009) Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids* 74:555–561
- Lee JY, Kim JH, Hong SH, Lee JY, Cherny RA, Bush AI, Palmiter RD, Koh JY (2004) Estrogen decreases zinc transporter 3 expression and synaptic vesicle zinc levels in mouse brain. *J Biol Chem* 279:8602–8607
- Lee JY, Kim JS, Byun HR, Palmiter RD, Koh JY (2011) Dependence of the histofluorescently reactive zinc pool on zinc transporter-3 in the normal brain. *Brain Res* 1418:12–22
- Li CJ, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R, Magarinos AM, Allen PB, Greengard P, Luine V,

- McEwen BS (2004) Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2185–2190
- Lin H, Huang Y, Wang Y, Jia J (2011) Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the mossy fiber sprouting and synaptic plasticity following seizures. *Mol Cell Biochem* 358:201–205
- Liu Z, Gastard M, Verina T, Bora S, Mouton PR, Koliatsos VE (2001) Estrogens modulate experimentally induced apoptosis of granule cells in the adult hippocampus. *J Comp Neurol* 441:1–8
- Luine VN, Richards ST, Wu VY, Beck KD (1998) Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav* 34:149–162
- McEwen B (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57:357–384
- Michos C, Kalfakakou V, Karkabounas S, Kiortsis D, Evangelou A (2010) Changes in copper and zinc plasma concentrations during the normal menstrual cycle in women. *Gynecol Endocrinol* 26:250–255
- Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD (1996) ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14934–14939
- Pan E, Zhang XA, Huang Z, Krezel A, Zhao M, Tinberg CE, Lippard SJ, McNamara JO (2011) Vesicular zinc promotes presynaptic and inhibits postsynaptic long-term potentiation of mossy fiber-CA3 synapse. *Neuron* 71:1116–1126
- Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158:126–136
- Paradiso B, Zucchini S, Su T, Bovolenta R, Berto E, Marconi P, Marzola A, Navarro Mora G, Fabene PF, Simonato M (2011) Localized overexpression of FGF-2 and BDNF in hippocampus reduces mossy fiber sprouting and spontaneous seizures up to 4 weeks after pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsia* 52:572–578
- Petrovska S, Dejanova B, Jurisic V (2012) Estrogens: mechanisms of neuroprotective effects. *J Physiol Biochem Feb* 28 Epub ahead of print
- Ramírez-Amaya V, Escobar ML, Chao V, Bermúdez-Rattoni F (1999) Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* 9:631–636
- Ramírez-Amaya V, Balderas I, Sandoval J, Escobar ML, Bermúdez-Rattoni F (2001) Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci* 21:7340–7348
- Rexrode KM, Manson JE (2012) Estrogens and stroke: disentangling a complex relationship. *Menopause* 19:247–249
- Ruiz A, Walker MC, Fabian-Fine R, Kullmann DM (2004) Endogenous zinc inhibits GABA(A) receptors in a hippocampal pathway. *J Neurophysiol* 91:1091–1096
- Sanchez RM, Ribak CE, Shapiro LA (2012) Synaptic connections of hilar basal dendrites of dentate granule cells in a neonatal hypoxia model of epilepsy. *Epilepsia* 53:98–108
- Sarkaki A, Amani R, Badavi M, Safahani M, Aligholi H (2008) Effect of ovariectomy on reference memory version of Morris water maze in young adult rats. *Iran Biomed J* 12:123–128
- Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K (2007) Beta-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing. Brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res* 1150:108–120
- Scharfman HE, MacLusky NJ (2006) Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Front Neuroendocrinol* 27:415–435
- Scharfman HE, Mercurio TC, Goodman JH, Wilson MA, MacLusky NJ (2003) Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23:11641–11652
- Scharfman HE, Hintz TM, Gomez J, Stormes KA, Barouk S, Malthankar-Phatak GH, McCloskey DP, Luine VN, MacLusky NJ (2007) Changes in hippocampal function of ovariectomized rats after sequential low doses of estradiol to simulate the preovulatory estrogen surge. *Eur J Neurosci* 26:2595–2612
- Sindreu C, Storm DR (2011) Modulation of neuronal signal transduction and memory formation by synaptic zinc. *Front Behav Neurosci* 5:68
- Smith CC, Vedder LC, McMahon LL (2009) Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology* 34(Suppl 1):S130–S142
- Takahashi K, Akaike N (1991) Calcium antagonist effects on low-threshold (T-type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 256:169–175
- Takeda A (2012) Zinc signaling in the hippocampus and its relation to pathogenesis of depression. *J Trace Elem Med Biol* 26:80–84
- Takeda A, Tamano H (2012) Proposed glucocorticoid-mediated zinc signaling in the hippocampus. *Metallomics*. doi: [10.1039/c2mt20018j](https://doi.org/10.1039/c2mt20018j)
- Takeda A, Minami A, Sakurada N, Nakajima S, Oku N (2007) Response of hippocampal mossy fiber zinc to excessive glutamate release. *Neurochem Int* 50:322–327
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E (1999) Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19:5792–5801
- Tanapat P, Hastings NB, Gould E (2005) Adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J Comp Neurol* 481:252–265
- Teter B, Harris-White ME, Frautschy SA, Cole GM (1999) Role of apolipoprotein E and estrogen in mossy fiber sprouting in hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 91:1009–1016
- Timm F (1958) Histochemistry of zinc. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 47:428–431
- Toscano-Silva M, Gomes da Silva S, Scorza FA, Bonvent JJ, Cavalheiro EA, Arida RM (2010) Hippocampal mossy fiber sprouting induced by forced and voluntary physical exercise. *Physiol Behav* 101:302–308
- Tóth K (2011) Zinc in neurotransmission. *Annu Rev Nutr* 31:139–153
- Ulas M, Cay M (2011) Effects of 17 β -estradiol and vitamin E treatments on blood trace element and antioxidant enzyme levels in ovariectomized rats. *Biol Trace Elem Res* 139:347–355
- Van Eden CG, Uylings HB (1985) Postnatal volumetric development of the prefrontal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 241:268–274

- Velísková J, Velíšek L, Galanopoulou AS, Sperber EF (2000) Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus. *Epilepsia* 41:S30–S35
- Wappler EA, Gál A, Skopál J, Nagy Z (2011) Single, high-dose 17 β -estradiol therapy has anti-apoptotic effect and induces cerebral plasticity following transient forebrain ischemia in gerbils (Short communication). *Acta Physiol Hung* 98: 189–194
- Weidner KL, Goodman JH, Chadman KK, McCloskey DP (2011) Aging-induced seizure-related changes to the hippocampal mossy fiber pathway in forebrain specific BDNF overexpressing mice. *Aging Dis* 2:308–317
- Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1997) Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12676–12681
- West MJ, Coleman PD, Flood DG (1988) Estimating the number of granule cells in the dentate gyrus with the disector. *Brain Res* 448:167–172
- Woolley CS (2007) Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:657–680
- Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA (1997) Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci* 17:1848–1859
- Xu X, Zhang Z (2006) Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sci* 79:1553–1560

XIII. ANEXO 2

+Model
NRL-615; No. of Pages 6

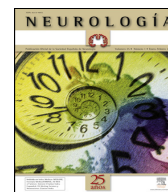
ARTICLE IN PRESS

Neurología. 2014;xxx(xx):xxx-xxx



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



ORIGINAL

Efecto de la tibolona en la densidad de las espinas dendríticas en el hipocampo de la rata

V. Beltrán-Campos^a, A. Díaz-Ruiz^b, E. Padilla-Gómez^c, H. Aguilar Zavala^a,
C. Ríos^b y S. Díaz Cintra^{c,*}

^a División de Ciencias de las Salud e Ingenierías, Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, Guanajuato, México

^b Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Dr. Manuel Velasco Suarez, México D.F., México

^c Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla Querétaro, Querétaro, México

Recibido el 14 de febrero de 2014; aceptado el 2 de marzo de 2014

PALABRAS CLAVE

Hipoestrogenismo;
Tibolona;
Hipocampo;
Área CA1;
Morfología;
Espinias dendríticas

Resumen

Introducción: El hipoestrogenismo produce estrés oxidativo (EO) y cambios en las neuronas del hipocampo (H) y reduce la densidad de las espinas dendríticas (ED). Estas alteraciones repercuten en la respuesta plástica del H. La terapia de sustitución intraperitoneal con estrógenos revierte estos efectos, pero no se sabe si ocurre lo mismo con la tibolona (TB). El objetivo fue comprobar los efectos neuroprotectivos de la TB administrada por vía oral a largo plazo y su capacidad para revertir la poda de ED de las neuronas piramidales (NP) del CA1 del H.

Métodos: Ratas Sprague Dawley jóvenes: distribuidas en 3 grupos: control en proestro (Pro) y 2 grupos ovariectomizados (Ovx), uno suplementado con dosis diaria de TB (1 mg/kg), OvxTB, y otro con vehículo (OvxV), por 40 días. Se analizaron la peroxidación de lípidos y la densidad de las ED en 3 segmentos de la dendrita apical de las NP del CA1 del H.

Resultados: La TB no redujo la peroxidación de lípidos en el H, pero recuperó la poda de espinas en las NP del CA1 del H, producida por la ovariectomía.

Conclusiones: La terapia de sustitución estrogénica en el hipoestrogenismo por ovariectomía tiene un efecto protector.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Estrogen deficiency;
Tibolone;
Hippocampus;
Area CA1;
Morphology;
Dendritic spines

Effect of tibolone on dendritic spine density in the rat hippocampus

Abstract

Introduction: Oestrogen deficiency produces oxidative stress (OS) and changes in hippocampal neurons and also reduces the density of dendritic spines (DS). These alterations affect the plastic response of the hippocampus. Oestrogen replacement therapy reverses these effects, but it remains to be seen whether the same changes are produced by tibolone (TB). The aim of

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: yoldi@unam.mx (S. Díaz Cintra).

this study was to test the neuroprotective effects of long-term oral TB treatment and its ability to reverse DS pruning in pyramidal neurons (PN) of hippocampal area CA1.

Methods: Young Sprague Dawley rats were distributed in 3 groups: a control group in proestrus (Pro) and two ovariectomised groups (Ovx), of which one was provided with a daily TB dose (1 mg/kg), OvxTB and the other with vehicle (OvxV), for 40 days in both cases. We analysed lipid peroxidation and DS density in 3 segments of apical dendrites from PNs in hippocampal area CA1.

Results: TB did not reduce lipid peroxidation but it did reverse the spine pruning in CA1 pyramidal neurons of the hippocampus which had been caused by ovariectomy.

Conclusions: Oestrogen replacement therapy for ovariectomy-induced oestrogen deficiency has a protective effect on synaptic plasticity in the hippocampus.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El incremento de los radicales libres, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (EO) como mecanismos interdependientes se han propuesto como los principales factores que producen daño cerebral al promover reacciones en cadena en presencia de iones metálicos catalíticos dañando a los fosfolípidos de las membranas, a las proteínas y, principalmente, al ADN de la célula¹⁻³. El EO junto con la inflamación se incrementan con la edad, así como la función inmunitaria innata y la comunicación neuronal con las células gliales, que son eventos críticos en el envejecimiento del cerebro y las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer^{4,5}. Por la edad, en el humano y en primates, ocurren cambios en la morfología de las neuronas corticales e hipocámpales, manifestados como reducciones en la complejidad y longitud del árbol dendrítico, y de los sitios postsinápticos o espinas dendríticas (ED)⁶. Las ED son complejos morfológicamente especializados para la interacción sináptica y se han estudiado *in vitro*, encontrando que tanto el número como el tipo de espinas son altamente mutables sobre una escala de tiempo de segundos a días por diversos mecanismos intrínsecos que ejercen un control dinámico sobre ellas⁷. *In situ*, estos cambios en el tipo y en la densidad de espinas ocurren bajo condiciones fisiológicas y patológicas, las cuales han sido ligadas con alteraciones funcionales de los circuitos neuronales y pérdida de la memoria^{8,9}. Las ED representan la región postsináptica de entrada excitatoria de las neuronas que responden a la estimulación con cambios en su densidad y en su tipo; el mecanismo por el cual estos cambios ocurren son a través de la activación de los genes primarios agregados al efecto de los factores de crecimiento; ambos modifican la citoarquitectura membranar, dando como resultado la generación de nuevas espinas o bien la maduración de las ya existentes¹⁰.

Por otra parte, en la mujer, diversas actividades pueden contribuir a los cambios o modificaciones que ocurren en estas entradas de información, como el proceso de envejecimiento, pérdida de la memoria, la homeostasis redox y la disminución de los niveles circulantes de estradiol. Para reducir estas alteraciones relacionadas con la disminución de hormonas circulantes durante la menopausia, se han probado diversas terapias sustitutivas con productos que tienen acción estrogénica (fitoestrógenos; 17- β -estradiol, progestágenos, acetato de medroxiprogesterona)^{11,12} y derivados

estrogénicos como la tibolona (TB), la cual es el precursor de metabolitos hidroxilados. En vivo, este se comporta como estrógenos en el hígado y el endometrio, y puede tener acción como progestágeno y actividad androgénica (bajando triglicéridos y colesterol) y protege contra la pérdida de la masa ósea¹³. En 2008, de Aguiar et al.¹⁴ reportaron los efectos del valerato de estradiol (VE, 0,3 mg/kg) y 2 concentraciones de TB (0,5 y 1,0 mg/kg) sobre el EO en el cerebro y en la bioquímica de la sangre en ratas hembras ovariectomizadas, en 3 estados: joven, adulto y viejo. Encontraron disminución del hidroperóxido de lípido en la corteza cerebral de ratas jóvenes y viejas, y ambas dosis de TB produjeron un incremento de la capacidad antioxidante total en comparación con los niveles obtenidos en las ratas hembras adultas tratadas con VE y las ovariectomizadas en todos los tratamientos mostraron los niveles más bajos de la capacidad antioxidante total en el hipocampo comparadas con sus controles. El EO fue más alto en las viejas comparadas con las jóvenes y las ovariectomizadas tratadas con TB (1,0 mg/kg), en donde se aumentaron los niveles de lípidos de baja densidad comparados con los animales control y con los tratados con EV. En este estudio, el objetivo fue comprobar los efectos antioxidantes y neuroprotectores implicados en la actividad farmacológica de la TB, administrada por vía oral a largo plazo, y si este tratamiento es capaz de revertir el EO y la poda de ED de las células piramidales del CA1 en el hipocampo.

Metodología

Animales

El protocolo se realizó conforme con las normas internacionales para el manejo y uso de animales de experimentación establecidas por los *National Institutes of Health* y la *National Academy of Science*, y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Un total de 30 ratas hembras Sprague-Dawley (200 a 250 g de peso) fueron utilizadas para los diferentes procedimientos. Las ratas se alojaron individualmente en jaulas de policarbonato (45 \times 24 \times 21 cm), con aserrín limpio como material de habitación y teniendo libre acceso a la alimentación (comida estándar Purina®, fórmula de 5001) y agua purificada durante todo el experimento. Se mantuvieron

Cómo citar este artículo: Beltrán-Campos V, et al. Efecto de la tibolona en la densidad de las espinas dendríticas en el hipocampo de la rata. *Neurología*. 2014. doi:10.1016/j.nrl.2014.03.002

bajo condiciones de ciclo de luz/oscuridad 12 h/12 h (luces encendidas a las 7:00 am), a una temperatura de entre 22 y 23 °C y con un 40-50% de humedad.

Diseño experimental y obtención de las muestras

Se diseñó un estudio experimental, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo con un total de 30 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 200 a 250 g de peso, las cuales fueron divididas en 3 grupos con las siguientes características: grupo 1, animales controles en etapa de proestro (Pro); grupo 2, ratas ovariectomizadas (Ovx) y tratadas con vehículo (solución salina) cada 24 h por 40 días (OvxV), y grupo 3, animales con Ovx y suplementadas con TB a una dosis de 1 mg/kg de peso cada 24 h por 40 días (OvxTB). Pasado este tiempo y después de la administración del tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación para la obtención del cerebro, que se colocó en una matriz calibrada de metal, se seccionó para separar en forma aleatoria ambos hemisferios para los análisis bioquímico y morfométrico.

Cuantificación de la peroxidación de lípidos

Para cuantificar los productos finales de la peroxidación de lípidos (PL), se utilizó la técnica descrita por Triggs y Willmore¹⁵. Se separó el hipocampo de uno de los hemisferios cerebrales, el cual fue homogenizado en 3 ml de solución salina (0,9% NaCl), se tomó una alícuota de 1 ml y se le añadieron 4 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) y las muestras se dejaron incubar durante 30 min en hielo para permitir la separación de la fase clorofórmica que contenía los productos finales fluorescentes de la PL; posteriormente, se obtuvo una alícuota de 1 ml que fue leída en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin Elmer L5500B a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro fue ajustado a 330 U de fluorescencia con una solución estándar de quinina (0,1 µg/ml). Los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia por gramo de tejido fresco.

Análisis morfométrico de la densidad de las espinas dendríticas

Se procesaron 6 hemisferios, con la técnica de Golgi rápido¹⁶; se fijaron por inmersión en formalina al 10% en PBS, después de 72 h; se obtuvieron bloques rostrales de 4 mm de ancho abarcando el área de hipocampo dorsal (bregma 2,8-4,2) y colocados durante 13 días en una solución de dicromato de potasio al 4,5% con ácido ósmico al 1% (8:1), diferenciados en nitrato de plata al 0,75% durante 24 h, seguida de su deshidratación en alcoholes graduales (50% hasta alcohol etílico absoluto y éter) por 30 min en cada uno. Se obtuvieron cortes coronales de 120 µm en un microtomo de deslizamiento (Leitz Wetlar 47160), previa inclusión en nitrocelulosa de baja viscosidad. Su deshidratación se hizo en alcoholes graduales y su aclaramiento en terpinol, seguido de xileno y su montaje con entellan. En las preparaciones así obtenidas de cada sujeto experimental, se seleccionaron aquellas neuronas piramidales (NP) del

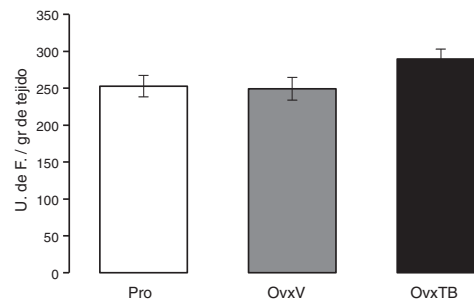


Figura 1 Gráfica en donde se muestran los valores promedio ± error estándar de 10 animales por grupo. Los resultados se expresan en unidades de fluorescencia por gramo de tejido fresco.

OvxV: ovariectomizados con vehículo (OvxV); OvxTB: ovariectomizados tratados con Tibolona (1 mg/kg); Pro: animales en proestro.

CA1 del hipocampo que mostraban su árbol dendrítico completo, el soma piramidal y dendritas basales (fig. 2 A). Las mediciones se efectuaron evitando que el observador conociera el grupo experimental, asignando un número al azar a cada preparación. Se midieron aquellas NP que pudieran ser observadas en un plano focal que las permitiera ver claramente a 10X, con una impregnación homogénea y cuyas dendritas apicales estuvieran completas hasta su término en el *stratum lacunosum moleculare* (SLM). Estas NP del CA1 se caracterizan por tener de 3 a 5 dendritas basales primarias y un árbol dendrítico apical que asciende hasta el SLM con ramas secundarias sobre el *stratum radiatum*. Las dendritas se dividieron en 3 segmentos representativos de sus aferencias principales (fig. 2 B). El proximal de 100 µm (comisurales y zona principal de entradas inhibitorias). El segmento medial entre 150 µm del soma y el límite de 350 µm (comisurales de Shaffer). El segmento distal se localizó en el inicio de la curvatura de la dendrita sobre el SLM (aferencias del patrón perforante)¹⁷ y el número de las espinas se contó en segmentos de 10 µm a 100X en cada dendrita.

Análisis estadístico

Todos los valores fueron analizados con la prueba de Levene para determinar la homogeneidad de la variancia y utilizar una estadística paramétrica. Posteriormente, el análisis estadístico de los resultados de la PL se llevó a cabo con la prueba de análisis de variancia (ANDEVA) de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey; se tomó como diferencia estadísticamente significativa un valor de $p \leq 0,05$. Para el análisis del total de espinas en los grupos de tratamiento se realizó con un ANDEVA de una vía, en donde el factor independiente es el tratamiento y el dependiente el promedio del número total de espinas en cada uno de los segmentos estudiados. Seguida de una prueba *post hoc* de Tukey con una $p \leq 0,05$.

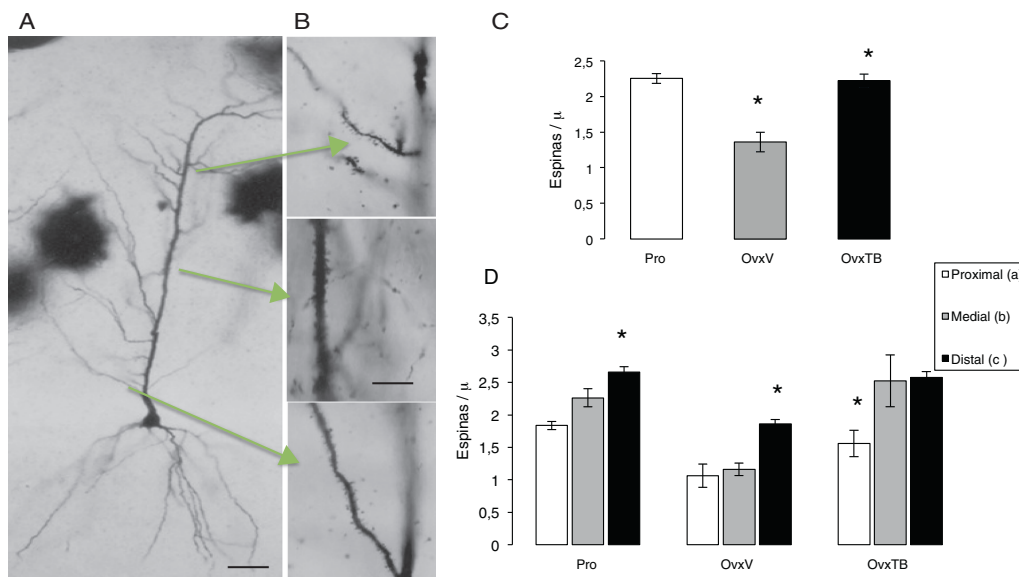


Figura 2 A) Fotomicrografías de una célula piramidal completa del CA1 del hipocampo. B) Las flechas indican los segmentos estudiados, así como las abreviaturas que representan la entrada de información. En B los segmentos dendríticos a 40X. En las gráficas C y D se indica la media ± error estándar del total de espinas/μ lineal y en los 3 grupos: proestro (Pro), ovariectomizados tratados únicamente con vehículo (OvxV) y ovariectomizados tratados con tibolona (OvxTB). Nótese en la gráfica C las reducciones significativas (* $p < 0,005$) del grupo OvxV vs. los grupos OvxTB y Pro. En las gráficas de los segmentos en los 3 grupos (D), se indican reducciones significativas (*) entre el segmento c vs. a y b en los grupos Pro y OvxV y entre los segmentos a vs. b y c en el grupo OvxTB.

AC: comisurales de asociación; PP: patrón perforante; SC: colaterales de Schaffer.

Resultados

Peroxidación de lípidos

Los resultados obtenidos del efecto de la TB sobre los niveles de la PL presente en el hipocampo de ratas con Ovx se muestran en la figura 1. Los resultados están dados como el valor promedio ± error estándar de 10 animales por grupo y están expresados en unidades de fluorescencia por gramo de tejido fresco. Se puede observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedio de los 3 grupos evaluados (Pro, OvxV y OvxTB), 40 días después de la administración de los tratamientos. ANDEVA de una vía ($F_{2,25} = 2,429$, $p = 0,107$).

Efectos sobre la densidad total de espinas dendríticas

El ANDEVA de una vía realizado para la densidad total de espinas, donde se incluyen todos los segmentos (fig. 2 C), muestra diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de tratamiento ($F_{2,9} = 2.323,306$, $p < 0,003$). La prueba *post hoc* de Fisher indicó que el grupo OvxV posee menor densidad de espinas dendríticas

comparadas con el grupo OvxTB y con el grupo control en etapa de proestro (Pro) con valores de $p = 0,003$ y $0,002$, respectivamente.

Efectos sobre la densidad de las espinas dendríticas

El ANDEVA de 2 vías realizado para la densidad de espinas dendríticas en cada uno de los segmentos revela diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento ($F_{2,27} = 2.2946,00$; $p < 0,001$) entre los diferentes grupos. En la figura 2 C, se muestran las diferencias estadísticamente significativas respecto a cada uno de los segmentos estudiados ($F_{2,27} = 17,39$; $p < 0,001$), pero no hay diferencias en la intersección entre ellos. La prueba *post hoc* de Fischer muestra que el grupo Pro aumenta la densidad de espinas en los segmentos proximal, medial y distal, mientras que los animales OvxTB muestran diferencias significativas en la densidad de espinas del segmento proximal con respecto al segmento distal. Además, los animales Ovx tuvieron diferencias significativas en la densidad de espinas del segmento distal con respecto a los segmentos proximal y medial ($p < 0,02$) para cada uno de los casos. Esto permite inferir que el segmento distal es el que no se encuentra afectado por el tratamiento o que posee mayor resistencia a los cambios de niveles hormonales derivados de estrógenos.

Cómo citar este artículo: Beltrán-Campos V, et al. Efecto de la tibolona en la densidad de las espinas dendríticas en el hipocampo de la rata. Neurología. 2014. doi:10.1016/j.nrl.2014.03.002

Discusión

Los resultados mostraron que el tratamiento con TB no tuvo efecto sobre la PL en los 3 grupos estudiados, lo que concuerda con lo reportado por de Aguilar et al. (2008)¹⁴, quienes administraron 2 dosis (0,5 mg/kg y 1 mg/kg) de TB por 12 semanas a ratas adultas ovariectomizadas y no encontraron efecto sobre los niveles de PL, concluyendo que la TB no incide sobre el daño oxidativo generado por efecto de la ovariectomía. Sin embargo, en este estudio, la dosis de TB (1 mg/kg) administrada al grupo Ovx, durante 40 días, revirtió la poda de las espinas provocada por la ovariectomía. En la evaluación histológica del conteo de espinas realizada en los segmentos proximal, medial y distal en las células piramidales del CA1 del hipocampo de ratas ovariectomizadas mostró una reducción en la cantidad de espinas, lo que indica que las ED como sitios postsinápticos son altamente sensibles a la falta de estrógenos. En estudios previos, realizados por nuestro grupo y por otros¹⁸⁻²⁰, se ha reportado que la distribución de las ED es heterogénea, dependiendo del segmento estudiado. Se sabe que en el segmento distal existe un mayor número de espinas en comparación con el segmento proximal; esta distribución fue observada nuevamente en los 3 grupos estudiados en este trabajo. Por otra parte, se comprobó que el grupo Ovx mostró un menor número de espinas, aunque conservando el mismo patrón de distribución normal, es decir, hay una mayor reducción de espinas en el segmento distal (en donde hay más espinas) que en el segmento proximal (donde de manera normal hay menos espinas). Asimismo, la suplementación oral de TB recupera la pérdida de espinas en esta área plástica cerebral que participa en la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria. El mecanismo por el cual la TB ejerce este efecto no se conoce, ya que es el primer trabajo donde se describe la capacidad de la TB para inhibir la reducción en el número de espinas en las células piramidales del CA1 del hipocampo. En relación con el efecto de la TB, solo existe un reporte por Espinoza Raya et al. (2012)²¹, en el cual se demuestra que el tratamiento con TB mejora el aprendizaje de ratas ovariectomizadas. Los autores reportan que el mecanismo puede estar relacionado con la modulación de la función colinérgica y del sistema serotoninérgico, ya que se observó un aumento del contenido de triptófano hidroxilasa por efecto del tratamiento con TB. Sobre la base de esta información, es probable que la TB ejerza su efecto neuroprotector tanto por la regulación de la síntesis de neurotransmisores involucrados en la memoria y el aprendizaje, como por las vías de señalización relacionadas con las ED.

Por otra parte, en el humano, se infiere que técnicas terapéuticas con estrógenos sintéticos pueden modificar la diversas actividades fisiológicas a nivel de órganos sistémicos como del cerebro y huesos; sin embargo, aún se discuten los efectos de los compuestos, como la TB, en vista de los importantes efectos secundarios que se reportan¹⁰ después de la menopausia y en asociación entre los niveles de tejido y las funciones cerebrales, así como de la distribución de sus metabolitos mono y trisulfatados²².

En este estudio, aunque no se encontró la respuesta antioxidante del tratamiento con TB, hubo una recuperación o rescate de la poda de ED producida por la ovariectomía a lo largo de la dendrita apical de las neuronas piramidales del

CA1, dato que se relaciona con diversos estudios de plasticidad hipocámpal con tratamientos con estrógenos exógenos, considerándose estos cambios plásticos como fluctuaciones inherentes al cambio de las concentraciones hormonales en el plasma a lo largo del ciclo estral^{18,19}. Es interesante que la ovariectomía afecta a los 3 segmentos estudiados (proximal, medial y distal), mientras que el tratamiento con TB tiene un efecto diferencial sobre el segmento proximal donde la densidad de espinas dendríticas no es capaz de recuperarse después de la administración por 40 días de esta la hormona sintética. Estos resultados permiten indagar en un futuro cuáles serían los mecanismos de neuroprotección específicos de la TB que favorecen la plasticidad cerebral y qué relación podríamos encontrar con respecto al segmento proximal y los receptores a estrógenos que se expresan en esta zona determinada, que es la vía de entrada comisural de información proveniente de las colaterales de Shaffer, afectando al intracircuito del hipocampo para el paso de información de memoria de corto a largo plazo.

Financiación

Este trabajo fue financiado parcialmente por el CONACYT (Becas: 173299 y 17276), Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas (PDCB), DGAPA-UNAM y PROMEP UGTO-PTC-324. Programa para el mejoramiento del profesorado (PROMEP), Universidad de Guanajuato.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer A. Aguilar Vázquez, M. García Servín y a L. López Villanueva por su ayuda con el cuidado de los animales.

Bibliografía

1. Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM. The role of oxidative stress in the aging process. *Scientific World Journal*. 2010;10:1121–8.
2. Chakrabarti S, Munshi S, Banerjee K, Thakurta IG, Sinha M, Bagh MB. Mitochondrial dysfunction during brain aging: Role of oxidative stress and modulation by antioxidant supplementation. *Aging Dis*. 2011;2:242–56.
3. Sharma S, Ebadi M. Significance of metallothioneins in aging brain. *Neurochem Int*. 2014;65C:40–8.
4. Aliev G, Priyadarshini M, Reddy VP, Grieg NH, Kaminsky Y, et al. Oxidative stress mediated mitochondrial and vascular lesions as markers in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Curr Med Chem*. 2013. [Epub ahead of print].
5. Perez-Cruz C, Nolte MW, van Gaalen MM, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, et al. Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011;31:3926–34.

6. Dickstein DL, Kabaso D, Rocher AB, Luebke JI, Wearne SL, Hof PR. Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell*. 2007;6:275–84.
7. Smart FM, Halpain S. Regulation of dendritic spine stability. *Hippocampus*. 2000;10:542–54.
8. Gould E, Woolley C, Frankfurt M, McEwen B. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*. 1990;10:1286–91.
9. Korkotian E, Segal M. Structure-function relations in dendritic spines: Is size important? *Hippocampus*. 2000;10:587–95.
10. Li CJ, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R, et al. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:2185–90.
11. Al-Anazi AF, Qureshi VF, Javaid K, Qureshi S. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2:154–63.
12. Rozenberg S, Vandromme J, Antoine C. Menopausal hormone treatment in 2011. *Rev Med Brux*. 2011;32:239–42.
13. Jamin C, Poncelet C, Madelenat P. Tibolone. *Presse Med*. 2002;31:1314–22.
14. De Aguiar RB, Dickel OE, Cunha RW, Monserrat JM, Barros DM, Martinez PE. Estradiol valerate and tibolone: Effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats. *Biogerontology*. 2008;9:285–98.
15. Triggs WJ, Willmore LJ. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J Neurochem*. 1984;42:976–80.
16. Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyás AI. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*. 2001;102:527–40.
17. Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Resnick O, Morgane PJ. Nucleus raphe dorsalis: A morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res*. 1981;207:1–16.
18. Woolley CS. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:657–80.
19. MacLusky NJ, Luine VN, Hajszan T, Leranth C. The 17 α and 17 β isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *Endocrinology*. 2005;146:287–93.
20. Beltrán-Campos V, Prado-Alcalá RA, León-Jacinto U, Aguilar-Vázquez A, Quirarte GL, Ramírez-Amaya V, et al. Increase of mushroom spine density in CA1 apical dendrites produced by water maze training is prevented by ovariectomy. *Brain Res*. 2011;1369:119–30.
21. Espinosa-Raya J, Neri-Gómez T, Orozco-Suárez S, Campos MG, Guerra-Araiza C. Chronic administration of tibolone modulates anxiety-like behavior and enhances cognitive performance in ovariectomized rats. *Horm Behav*. 2012;61:76–83.
22. Verheul HA, Kloosterboer HJ. Metabolism of exogenous sex steroids and effect on brain functions with a focus on tibolone. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;102:195–204 [revisión].

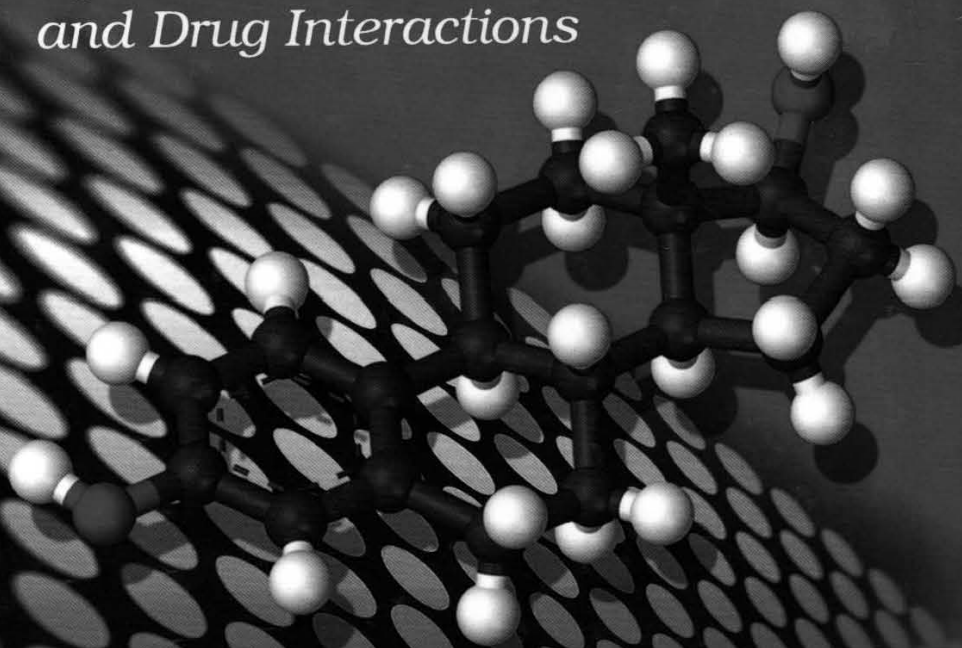
Endocrinology Research and Clinical Developments

Estradiol

*Synthesis, Health Effects
and Drug Interactions*

N
o
v
a

B
i
o
m
e
d
i
c
a
l



Ricco Palmeri
Sal Grimaudo
Editors

NOVA

Estrogen Modulation of Oxidative Stress and Synaptic Plasticity in the Dorsal Hippocampus

Beltrán-Campos V, Padilla-Gómez E, Medina-Aguirre GI, Castro-Chavira SA and Díaz-Cintra S

Abstract

Estrogens are important for antioxidant mechanisms, maintenance of synaptic plasticity and modulation of zinc content in the hippocampus of young and senile animals. The female brain is influenced by multiple factors including the decrease in estrogen levels, with that commonly accompanies to stress and aging. However, plasticity in the hippocampus in pre- and postsynaptic sites, such as the mossy fiber system and dendritic spines, responds to the neuroprotective and antioxidant actions of hormone supplementation. Furthermore, in hippocampus, the ovariectomy produces spine pruning in pyramidal cells of CA1, a reduction of the mossy fiber area in CA3, a decrease of the zinc in the whole hippocampus and an increase in oxidative stress. Following supplementation with a minimal dose of 17 β -estradiol, the effects are revers and these parameters have values similar to those observed during the proestrus stage of the estrous cycle, which is associated with a better performance in learning and memory in female rats. These studies confirm the roles of estrogen in protecting the hippocampus before oxidative stress and maintaining its synaptic plasticity.

Introduction

Estrogens are known to have broad effects on hippocampus synaptic plasticity which is also affected by oxidative stress and aging (Foy, 2010). Multiple lines of evidence suggest that loss of estrogens in the aging brain may play a role in the cognitive decline associated with Alzheimer's disease (Janicki & Schupf, 2010; Barron & Pike, 2012). The hippocampus has steroid receptors (Spencer-Segal et al., 2012)

that make it sensitive to the interaction between antioxidant defense systems and sex steroids. This effect is shown in studies of estrogen deprivation which increases the vulnerability to injury of granule cells in the adult hippocampus and may predispose to neurological diseases and deficits in working memory occurring after menopause (Liu et al., 2001). Estrogen can prevent oxidative stress in neurons (Behl et al., 1997, 2003), and, in the hippocampus, they can act as an antioxidant agent to modulate lipid oxidation, thereby regulating oxidative phosphorylation (Yao, et al, 2011). It has been demonstrated that estrogens produce a neurotrophic effect that prevents neuronal damage in the adult brain, protecting and supporting synaptic connections which are essential for signaling and neural survival (Maggi et al, 2004; Yao et al., 2011; Srivastava, 2012). This mechanism regulates pre- and postsynaptic proteins such as synaptophysin, syntaxin, and spinophilin in CA1 pyramidal cells (Brake et al., 2001; Prange-Kiel et al., 2006). These synaptic changes in hippocampal pyramidal cells are also related to spatial behavioral experience (Ramírez-Amaya et al., 1999; 2001; Beltrán Campos et al., 2010).

In the hippocampus of the adult rat, mossy fiber (MF) axons from dentate granule cells converge in the dentate hilus and run through a narrow area called the *stratum lucidum* (CA3) forming excitatory glutamatergic synapses. The well-documented synaptic rearrangement of MFs is associated with several factors like learning, memory, temporal lobe epilepsy (Koyama et al., 2004), malnutrition (Díaz-Cintra et al., 1991, 1997, 2007), stress and neurotrophic factors. The idea that levels of circulating estrogens are also important for cognition is supported by animal studies in which ovariectomy produces acquisition deficits in Morris water maze (MWM) task (Xu & Zhang, 2006; Sarkaki et al., 2008).

Here the main objectives were to study the protective effects of estrogens before oxidative stress and the pre and postsynaptic dorsal hippocampal plasticity (MFs and spines, respectively) involved in the regulation of spatial memory. Our experiments designs were performed in female Sprague-Dawley rats which were treated in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The experimental protocols were approved by the local Animal Care and Use Committee.

1. Estrogen Modulation of Hippocampal

Oxidative Stress

Oxidative stress (OS) together with inflammatory processes and the aggregation of oxidized products of aberrant proteins in the brain induces apoptosis and autophagy (Caballero & Coto-Montes, 2012). Biological aging is associated with neurodegeneration due to the presence of lipid peroxidation products, protein oxidation and oxidative modifications in nuclear and mitochondrial DNA (Richwine et al., 2005; Zhu et al., 2006; Poon et al., 2006). In addition, the decrease of sexual steroid levels due to aging can have an impact on brain functions; thus, therapies to replace these hormones may reduce this impact, which is supported by evidence in

experimental animals (Green & Simpkins, 2000; Garcia-Segura et al., 2001; Lee & McEwen, 2001; Feng, 2005). To test if the interaction between antioxidant defense systems and sex steroids affects the antioxidant activity in the hippocampus of young and senile animals, we evaluated lipid peroxidation in five experimental groups, each contain 10 animals: young proestrus (Pro), young ovariectomized (OvxV), young ovariectomized supplemented with a minimal dose of 17 β -estradiol (OvxE), senile (SenV) and senile supplemented with the same minimal 17 β -estradiol dose (SenE).

Methodology and Results

The young animals were ovariectomized (Ovx, n = 20) with xylazine/ketamine anesthesia (13 mg/kg xylazine and 40 mg/kg ketamine) to minimize pain and discomfort, using aseptic procedures. An incision was made in the abdominal zone to visualize the ovaries. A clip was placed 1 cm below the ovaries which were then completely removed. A two-week recovery period was provided before hormone supplementation. Then, one of the young ovariectomized (OvxE) and one of the senile (SenE) groups were given hormone supplementation (10 μ g of 17- β - estradiol in 0.2 ml oil solution). Two other groups (OvxV and SenV) received vehicle (0.2 ml of oil). The supplementation was administered subcutaneously every 24 h for 3 consecutive days. After the treatments, the animals were sacrificed, and the brains of the animals (in all groups) were extracted and distributed randomly (6 hemi-brains per assay) for different measurements. Quantification of lipid peroxidation and determination of its final products were performed using the technique of Triggs & Willmore (1984). The complete hippocampus of each of the 6 hemi-brains per group was carefully removed and homogenized in 3 ml of saline solution (0.9% NaCl in buffer); an aliquot of 1 ml of this homogenate was mixed with 4 ml of chloroform/methanol (2:1 v/v) and then left on ice for 30 min to allow phase separation fluorescence of the chloroform was measured in a Perkin Elmer L5500B spectrophotometer (luminescence: excitation at 370 nm and emission at 430 nm). The spectrophotometer sensitivity was adjusted to 330U of fluorescence with a standard solution of quinine (0.1 μ g/ml). The results were expressed in fluorescence units per gram of tissue. ANOVA tests showed significant differences in the levels of lipid peroxidation they were similar in the young female rats in proestrus (Pro) and after treatment (OvxE). Moreover, supplementation with a low dose of 17 β -estradiol produced a decrease in lipid peroxidation levels in senile females (SenE) as well as in young OvxE as shown in Figure 1.

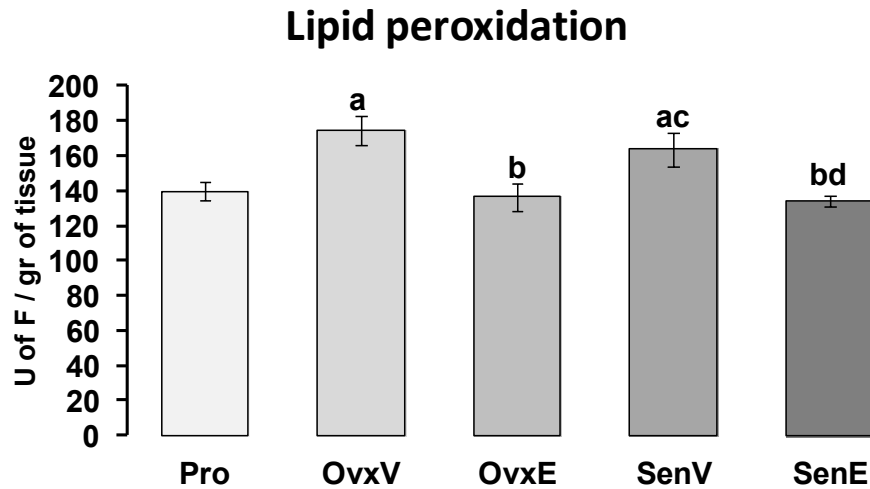


Figure 1. Mean \pm SEM of fluorescence units (U of F) per gram of tissue and the significant differences ($p < 0.05$) between groups: a - vs Pro; b - vs OvxE; c - vs OvxF; d - vs SenV. Modified from Beltrán-Campos et al. (2011).

2. Estrogen Supplementation

Effects on Spine Density

Structural synaptic changes are believed to be responsible for stabilizing the activity patterns in neuronal ensembles during memory consolidation (Hebb, 1949). Following learning, structural remodeling of synapses has been studied in different brain regions after varied learning experiences in several animal species (Bailey et al., 2008; Butz et al., 2009). In hippocampal CA1 pyramidal neurons, the number of dendritic spine increases when rats experience, for several days, a complex environment that promotes spatial learning (Moser et al., 1994). Also, training rats in the MWM spatial task induces changes in the distribution of dendritic spines in CA1 neurons as observed using electron microscopy (Rusakov et al., 1997). Trace eyeblink conditioning training, which is an associative learning task dependent on the integrity of the hippocampus (Solomon et al., 1986), increases spine density in CA1 neurons as observed with Golgi staining 24 h after learning (Leuner et al., 2003). This staining method has also revealed that spatial water maze training increases the number of some, but not all, spine types in CA1 neurons (Diamond et al., 2006). Interestingly, the dendritic spine number in CA1 neurons can also be modulated by extrinsic factors such as circulating gonadal steroids (Brusco et al., 2008; González-Burgos, 2005). Dendritic spines have a highly plastic capacity and can modify their structure in respond to hormonal influences (Murakami et al., 2006; Sato et al., 2007). For example, it is well established that ovariectomy in young animals reduces their dendritic spine number in CA1 hippocampal pyramidal neurons, and this effect is reversed by estradiol and progesterone replacement (Gould et al., 1990). We studied this effect in the same CA1 hippocampal pyramidal neurons by administering of 17 β -estradiol not only in ovariectomized young, but also in senile females, in order to know if these spines retain their plastic capacity as a result of estradiol influence.

Moreover, we evaluated if the spine number recovered to levels similar to those observed in animals at proestrus, which are the highest of the estrous cycle.

Methodology and Results

The dorsal hippocampus (Bregma -2.8 to - 4.2; Paxinos & Watson, 1998) of each hemi-brain (10 per group) was carefully removed, immediately fixed in a 10% buffered formalin solution, and divided into 4mm-thick blocks after 4 hours with the aid of a stereoscopic microscope. Each block was impregnated using the rapid Golgi technique following the modification of Díaz-Cintra et al. (1994). After 12 days, each block was transferred to a solution of 0.75% silver nitrate in double distilled water for 12 h, washed in 50% alcohol, embedded in low-viscosity nitrocellulose, and cut along the frontal plane at a thickness of 120 μm . Each section was collected in 70% alcohol, dehydrated, and mounted in Entellan® medium. Each slide had 16 sections of the dorsal hippocampus and was assigned a random number to ensure that observers were blind to experimental conditions. Morphometric analysis was made in six complete and well-impregnated CA1 dorsal hippocampus neurons chosen randomly from each of the 6 animals per group and was analyzed using an Optiphot-2 Nikon microscope. A 20x Plan® objective (0.5 NA) with an optically calibrated reticule and a 100 \times Plan-Apochromat® objective (1.3 NA) were used for the analysis. An image of the selected pyramidal cell was captured with the 20x objective by carefully identifying the optical plane in which the whole apical dendrite was visible. This image was then used as the reference image. This study was performed only in the CA1 Golgi-impregnated pyramidal neurons whose dendrites reached the *stratum lacunosum moleculare (slm)* as shown in Figure 2. Using the reference image, the apical dendrite segments were designated according to the following criteria: The proximal segment was considered as the first 100 μm closer to the soma. The distal segment was considered to start at the *slm*, where the apical dendrite folds. Finally, the medial segment was considered the whole section between the proximal and distal segments. The spine density analysis was performed on one secondary dendritic branch attached to the main apical dendrite of each segment. In each selected branch, a 25 μm length was chosen randomly for spine classification and density analysis. We analyzed secondary branches, rather than the main dendritic shaft, because the proximal segment of the main apical dendrite is devoid of spines within the first 100 μm from the soma (Megías et al., 2001). Golgi-stained neurons were classified and analyzed for spine density by direct microscopic observation. Dendritic spine density was calculated as the number of spines divided by 125 microns (sum of these three segments) in the apical dendrite in hippocampal CA1 neurons, and analyzed by one-way ANOVA comparing groups (Pro, OvxV, OvxE, SenV and SenE). Significant differences ($P < 0.0001$) were found and a subsequent a *post hoc* Fisher's test indicated significant reductions ($P < 0.0001$) in the OvxV and the SenV groups compared to the Pro group as shown in Figure 2. These results show that the young animals tested during the proestrus stage had 1.7 spines per linear μm , but a decrease of more than 50% in Ovx animals was found. After the 10 μg dose of 17- β estradiol,

spine density recovered and was similar to that in young animals at proestrus. Also, the spine density of the senile groups showed equivalent pruning and recovery effects, Figure 2.

3. Effect of 17 β -Estradiol on Plasticity of Hippocampal MF

Studies testing the hippocampal plasticity show an increased propensity of MFs synapses to reorganize in the inner molecular layer following seizures (Lin et al., 2011). Estrogen deprivation increases the vulnerability to injury of granule cells in the adult hippocampus and may predispose to neurological diseases and an increased incidence of memory deficits after menopause (Liu et al., 2001; Sherwin, 2012). In hippocampal pyramidal cells, estrogen has also been shown to enhance long-term potentiation and potentiate acute excitatory transmission, a cellular correlate of learning and memory (Woolley, 2007; Smejkalova & Wooley, 2010). It is well accepted that estrogen increases synaptic function and induces neurogenesis in the adult (Gould et al., 2000). Neurogenesis and less apoptosis in hippocampal dentate gyrus during proestrus and in rats with estrogenic supplementation have been reported (Tanapat et al., 2005). The MFs is highly plastic in the adult brain and is influenced by multiple factors including learning and memory. In addition, zinc plays an important modulatory role in hippocampal neuronal signal transduction (Sindreu & Storm, 2011) and in memory formation and stress. Since the relation between MFs plasticity and their zinc content in entire hippocampus throughout the estrous cycle remains unknown, we designed this study in order to test estrogen (17 β -estradiol) modulation and zinc content of the hippocampus over the course of the female estrous cycle. Thus, ovariectomized female rats without (Ovx) or with estrogen supplement (OvxE) were compared with control rats at three stages of the estrous cycle: diestrus, proestrus, and estrus.

Methodology and Results

Subjects, their ovariectomy surgery, and estrogenic supplementation were described earlier in this chapter. In order to detect normal cycles, daily vaginal smears were taken for three days from 36 female rats that were euthanized at proestrus (P), estrus (Es) or diestrus (D) stages (12 rats per stage). Groups of six rats were used either for Timm staining or zinc measurement. For estrogen deprivation and replacement, 24 female rats were ovariectomized (Ovx), half of which were supplemented with E (OvxE). Four six-rat groups were formed and studied either by Timm staining or zinc-measurement. Additionally, 20 female rats were ovariectomized (Ovx), and ten of them supplemented with E (OvxE), and subjected to behavioral

testing in the MWM (Section 4, Effects of ovariectomy on the performance of a spatial task).

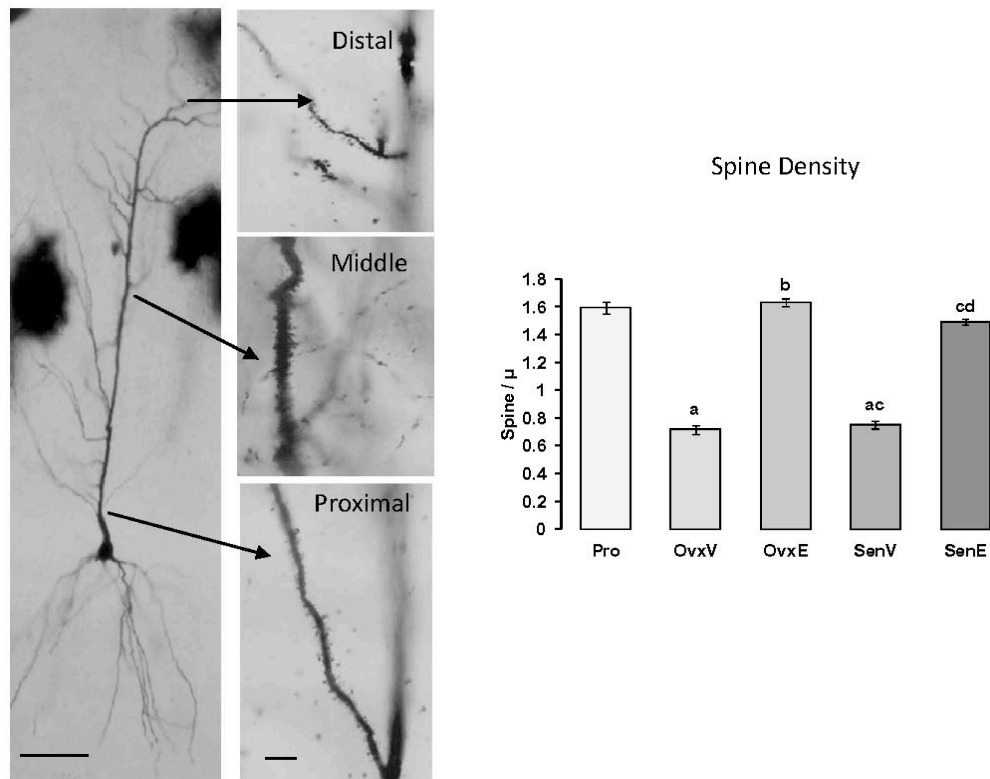


Figure 2. Example of a CA1 pyramidal cell stained with the rapid Golgi technique and enlargements of its dendritic segments (distal, middle and proximal). Scale bars: 100 and 10 μ m, on left and right respectively. Graphs show the mean \pm SEM spine density (spine / μ) in the five groups analyzed; significant ($p < 0.05$) reductions in OvxE and SenV groups and recovery with estrogen supplementation were found (OvxE and SenE groups); a - vs Pro; b - vs OvxE; c - vs OvxE; d - vs SenV. Modified from Beltrán-Campos et al. (2011).

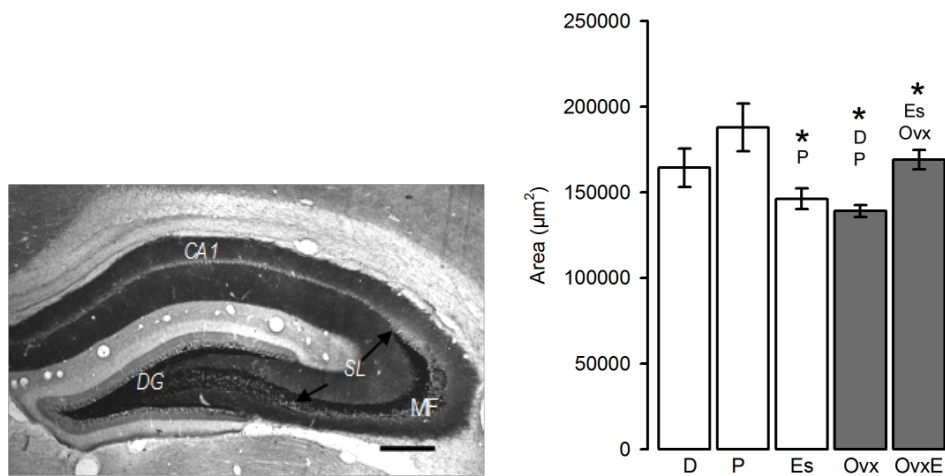


Figure 3. Example of hippocampal coronal section used to estimate the volume of the mossy fibers (MF) limit with arrows; and to estimate areas: dentate gyrus (DG), CA1, and stratum lucidum (SL); bar, 300 µm. The graph shows the mean \pm SEM of the MF stratum lucidum area in five groups: gonadally intact divided into: diestrus (D), proestrus (P) and estrus (Es) from cycling young female rats, and two ovariectomized (Ovx) without supplementation and with a 10µg dose of 17β-estradiol (OvxE). Note the significant decreases in the Es ($p = 0.001$) and Ovx ($p = 0.01$) groups relative to the P group and a significant ($p = 0.001$) increase in OvxE with respect to the Ovx and Es groups. Modified from Padilla-Gómez et al. (2012).

Tissue collection (Timm staining). A total of 30 animals (P, Es, D, Ovx and OvxE), 6 per group, were studied with the histological Timm technique (Padilla-Gómez et al., 2011). Sections were serially mounted and processed using a modification of Timm's sulfide silver technique as described elsewhere (Granados et al., 2002). A coronal section from the hippocampal formation was obtained immediately after perfusion. These sections were used to estimate the area of the suprapyramidal bundle of the MF system. Every fifth section was selected from a random starting position within the first five serially mounted sections. Each slide was assigned a random number to ensure that the observer was unaware of the experimental conditions. The area of the MF system (expressed in µm²) was measured in the suprapyramidal bundle, which broadly corresponds to the stratum lucidum (SL), and in the sections selected from the dorsal hippocampus (Figure 3A). The results are shown in Figure 3, with the mean area \pm SEM of the MF system and SL in five groups: cycling female rats (D, P, Es) and Ovx alone or with 17β-estradiol supplement (OvxE). ANOVA testing showed significant ($p = 0.006$) differences among groups and Fisher's *post hoc* test showed a significant ($p = 0.003$) area reduction in Es and Ovx ($p = 0.0007$) groups in relation with P group. The zinc determination was made in six animals at each stage of the estrous cycle (D, P, Es), and in Ovx and OvxE. Hippocampal tissue was dissected out from the skull as rapidly as possible and placed in tubes previously washed with 30% nitric acid solution to avoid external contamination. All the hippocampus weights were recorded, and 1 ml of redistilled nitric acid was added to the samples. Tubes were then capped and placed on a shaking bath at 60°C for 30 min. The resulting solution was assayed for zinc content in an atomic absorption spectrophotometer equipped with a graphite furnace and Zeeman background correction (Analyst 600, Perkin Elmer). Results are expressed as µg of zinc per gram

of wet tissue as shown in Figure 3b. This data showed that estrogen modulates the plasticity and maintenance of MFs during proestrous in hippocampal CA3 during proestrous because the MF area is reduced in Ovx animals and recover to normal when they are supplemented with a physiological doses of 10 μ g dose of 17 β -estradiol. Estradiol supplementation had similar effects on the hippocampal zinc content in the same five experimental groups: cycling female rats (D, P, Es) and Ovx with or without E (OvxE) (Figure 4).

4. Effects of Ovariectomy on the Performance of a Spatial Task

Ovariectomy produces deficits in the performance of hippocampus-dependent learning tasks (Wallace et al., 2006); these deficits are ameliorated by estradiol administration (Xu & Zhang, 2006), demonstrating that they are due to inadequate levels of circulating estradiol. Some studies have found that ovariectomy may improve hippocampus-dependent learning (Bimonte-Nelson et al., 2003); however, this effect was observed 1.5–6 months after ovariectomy, when the endocrine system of the animal had already adapted to the lack of ovaries, and estrogens might be released from other sources, such as adipose tissue (for reviews see Mendelson & Simpson, 1987; Nelson & Bulun, 2001). Moreover, it has also been observed that low estrogen levels during the estrous cycle inhibit the acquisition of spatial tasks (Frye & Sturgis, 1995; Sarkaki et al., 2008), which is consistent with the detrimental effect of ovariectomy on hippocampus-dependent spatial- memory tasks. In order to demonstrate the effect of hormone replacement we studied learning and memory in Ovx and OvxE groups using a MWM.

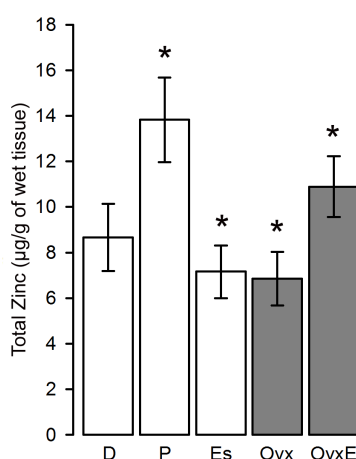


Figure 4. Zinc content (mean \pm SEM) in five groups: gonadally intact: diestrus (D), proestrous (P) and estrous (E) from cycling female rats, Ovx and OvxE. Note the significant decreases in the E, D, and Ovx groups in relation to the P group and a significant increase in the OvxE compared to the Ovx group. Modified from Padilla-Gómez et al. (2012).

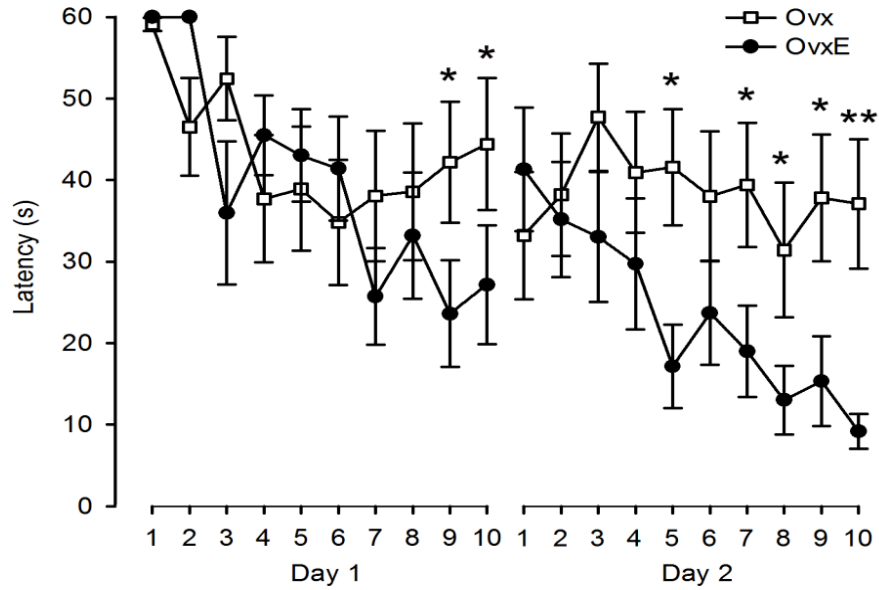


Figure 5. Mean \pm SEM of acquisition performance of animals subjected to 2 days of training. Points represent the latency to reach the target platform on consecutive trial. Repeated measures ANOVA showed significant differences (*) between the Ovx and OvxE groups on trials 9 and 10 on day 1; and on trials 5, 7, 8, 9, and 10 on day 2. Also, between trials 1 to 10, only the OvxE group showed significantly reduced latency; the Ovx group did not reach the latency threshold (30 s) that would indicate learning. Modified from Padilla-Gómez et al. (2012).

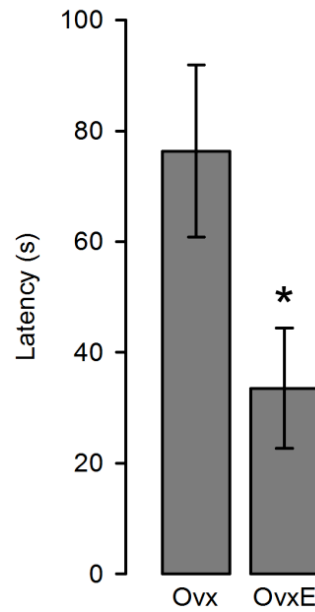


Figure 6. Mean \pm SEM of water maze performance during the memory test after two days of learning. Latency in seconds spent by the Ovx and OvxE groups to locate the platform area. The Student's t-test showed significant differences (*) between groups. Modified from Padilla-Gómez et al. (2012).

Methodology and Results

We trained young Ovx and OvxE animals in the MWM spatial training task (Subjects described in Methodology for Section 3). The training consisted of one session of 10 trials. The animal was introduced into the pool at a different starting point for each trial up to a total of 10 trials (Ramírez-Amaya et al., 2001). The animal was allowed to swim for a maximum of 60 s, or until it located the platform, and it was allowed to stand on the platform for 30 s. Escape latency was measured for each trial. Figure 5, shows that Ovx rats, had higher latencies, indicating poorer performance in the MWM. Learning was evaluated in two sessions of 10 trials each, and memory was tested 24 h later. The OvxE group performed significantly better in both learning (trials 5, 8, 9, 10 on, day 1 and trials 5, 9, 10 on, day 2) and in memory, Figure 6.

Concluding Remarks and Future Directions

We have reported that ovariectomy produces an increase in oxidative stress and spine pruning in CA1 pyramidal cells (Beltrán-Campos et al., 2010); other effects found are reduction in the MF area in the CA3 and a decrease in the level of total hippocampal zinc (Padilla-Gómez et al., 2011). Animals treated with a minimal dose of 17 β -estradiol, showed a reversal of these latter effects and had MF areas and zinc levels similar to those observed during the proestrus stage of the estrous cycle. In addition, the OvxE group acquired and remembered the spatial task, suggesting the important role of estrogen for maintaining hippocampal plasticity and zinc level in MF-CA3 synapses during proestrus, parameters associated with better performance in learning and memory. While suggestive, these data are not sufficient to infer changes in synaptic connectivity; therefore, another approach to the problem will be to use electron microscopy to look for ultrastructural modifications at postsynaptic sites through the estrous cycle of rats.

The findings concerning spine density support the idea that gonadal activity is required for some structural changes in spines underlying hippocampus-dependent cognition in female animals (Gould et al., 1990; Woolley et al., 1993; 1997). We have reported (Beltrán-Campos, 2010) that the different dendritic spine types (stubby, thin, and mushroom) had different density distributions across the apical dendrite from CA1 pyramidal neurons, because the sites of the input are altered differentially. Ovariectomy (Ovx) produced spine pruning in all dendritic segments. It is necessary to know the differential effects of estrogen supplementation on oxidative stress (protective), on hippocampal plasticity (maintenance) and on the the density of spine (recovery), which have high plastic capacity to modify their structure in relation with estrogen levels.

Acknowledgments

This study was supported by PDCB, DGAPA-UNAM, and CONACYT fellowships (173299, 17276, 210873) and CB2012-178841, UNAM-PAPIIT IN-201613. The authors wish to thank A. Aguilar Vázquez, T. Martínez, L. Palma, N. Hernández, N. Serafin and M. García for technical assistance. We are grateful to Dr. D. Pless for proofreading.

References

- Barron, A. M. & Pike, Ch. J. (2012). Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Front Biosci.* 4, 976–997.
- Behl, Ch., Shutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, ChJ. & Holsboer, F. (1997). Neuroprotection against Oxidative Stress by Estrogens: Structure-Activity Relationship. *Molec. Pharmacol.* 51, 535–541.
- Behl, Ch. (2003). Estrogen can protect neurons, modes of action. *J Ster Biochemist. Molec. Biolog.* 83, 195–197.
- Beltrán-Campos, V., Prado-Alcalá, R. A., León-Jacinto, U., Aguilar Vázquez, A., Quirarte, G. L., Ramírez-Amaya, V. & Díaz-Cintra, S. (2011). Increase of mushroom spine density in CA1 apical dendrites produced by water maze training is prevented by ovariectomy. *Brain Res*, 1369, 119-130.
- Bailey, C. H. & Kandel, E. (2008). Synaptic remodeling, synaptic growth and the storage of long-term memory in Aplysia. *Prog. Brain Res.* 169, 179–198.
- Bimonte-Nelson, H. A., Singleton, R. S., Hunter, C. L., Price, K. L., Moore, A. B. & Granholm, A. C. (2003). Ovarian hormones and cognition in the aged female rat, I. Long-term, but not short-term, ovariectomy enhances spatial performance. *Behav Neurosci.* 117, 1395-1406.
- Brake, W. G., Alves, S. E., Dunlop, J. C., Lee, S. J., Bulloch, K., Allen, P. B., Greengard, P. & McEwen, B. S. (2001). Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus, an examination of synaptic proteins. *Endocrinology.* 142, 1284-1289.
- 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. *Neurosci Lett.* 438, 346-50.
- Butz, M., Worgotter, F. & van Ooyen, A. (2009). Activity-dependent structural plasticity. *Brain Res. Rev.* 60, 287–305.
- Caballero, B. & Coto-Montes, A. (2012). An insight into the role of autophagy in cell responses in the aging and neurodegenerative brain. *Histol Histopathol.* 27, 263-275.
- Diamond, D. M., Campbell, A. M., Park, C. R., Woodson, J. C., Conrad, C. D., Bachstetter, A. D. & Mervis, R. F. (2006). Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal spinogenesis. *Hippocampus.* 16, 571-576.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Galván, A., Aguilar, T., Kemper, Morgane, P. J. (1991). Effects of prenatal protein deprivation on the posnatal development of granule cell neurons in the fascia dentata. *J. Comp Neur.* 310, 356-364
- Díaz-Cintra, S., García-Ruiz, M., Corkidi, G. & Cintra, L. (1994). Effects of prenatal malnutrition and posnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res.* 662, 117-126.

- Díaz-Cintra, S., González Maciel, A., Aguilar Vázquez, A. R., Morales, M. A., Cintra, L. & Prado-Alcalá, R. A. (2007). Protein malnutrition differentially alters glutamic acid decarboxylase-67-Positive hippocampus interneurons. *Exp Neurol*. 208, 47-53
- Feng, Z. & Zhang, J. T. (2005). Long-term melatonin or 17beta-estradiol supplementation alleviates oxidative stress in ovariectomized adult rats. *Free Radic Biol Med*. 39, 195-204.
- Foy, R. (2010). Ovarian Hormones, Aging and Stress on Hippocampal Synaptic Plasticity Michael R. *Neurobiol Learn Mem*. 95, 134-144.
- Frye, C. A. & Sturgis, J. D. (1995). Neurosteroids affect spatial/reference, working, and long-term memory of female rats. *Neurobiol Learn Mem*. 64, 83-96.
- García-Segura, L. M., Azcoitia, I. & donCarlos, L. L. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*. 63, 29-60.
- González-Burgos, I., Alejandro-Gomez, M. & Cervantes, M. (2005). Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci. Lett*. 379, 52-54.
- Gould, E., Tanapat, P., Rydel, T. & Hastings, N. (2000). Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry*. 48, 715-720.
- Gould, E., Woolley, C., Frankfurt, M. & McEwen, B. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J. Neurosci*. 10, 1286-1291.
- Granados-Rojas, L., Aguilar, A. & Díaz-Cintra, S. (2004). The mossy fiber system of the hippocampal formation is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *Nutr Neurosci*, 7, 301-308.
- Green, P. S. & Simpkins, J. W. (2000). Neuroprotective effects of estrogens. Potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci*. 18, 347-358.
- Hebb, D. O. (1945). The Organization of Behavior, *A Neuropsychological Theory*. John Wiley & Sons.
- Janicki Sarah, C. & Nicole Schupf. (2010). Hormonal Influences on Cognition and Risk for Alzheimer Disease Curr Neurol Neurosci Rep. Author manuscript; available in PMC. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 10, 359-366.
- Koyama, R. & Ikegaya, Y. (2004). Mossy fiber sprouting as a potential therapeutic target for epilepsy. *Curr Neurovasc Res*. 1, 3-10.
- Lee, S. J. & McEwen, B. S. (2001). Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41, 569-591.
- Leuner, B., Falduo, J. & Shors, T. J. (2003). Associative Memory Formation Increases the Observation of Dendritic Spines in the Hippocampus *The Journal of Neuroscience*. 23, 659-665.
- Lin, H., Huang, Y., Wang, Y. & Jia, J. (2011). Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the mossy fiber sprouting and synaptic plasticity following seizures. *Mol Cell Biochem*. 358, 201-205.
- Liu, Z., Gastard, M., Verina, T., Bora, S., Mouton, P. R. & Koliatsos, V. E. (2001). Estrogens modulate experimentally induced apoptosis of granule cells in the adult hippocampus. *J Comp Neurol*. 441, 1-8.
- Maggi, A., Ciana, P., Belcredito, S. & Vegeto, E. (2004). Estrogens in the nervous system, Mechanisms and nonreproductive functions. *Annu. Rev. Physiol*. 66, 291-313.
- Megías, M., Emri, Z., Freund, T. F. & Gulyas, A. I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*. 102, 527-540.
- Mendelson, C. R. & Simpson, E. R. (1987). Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 52, 169-176.
- Moser, M. B., Trommald, M. & Andersen, P. (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, 12673-12675.
- Murakami, G., Tsurugizawa, T., Hatanaka, Y., Komatsuzaki, Y., Tanabe, N., Mukai, H., Hojo, Y., Kominami, S., Yamazaki, T. & Kawato, S. (2006). Comparison between basal and apical dendritic

- spines in estrogen-induced rapid spinogenesis of CA1 principal neurons in the adult hippocampus. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 351, 553-558.
- Nelson, L. R. & Bulun, S. E. (2001). Estrogen production and action Source. *J Am Acad Dermatol.* 45, S116-124.
- Nilsen, J. (2008). Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. *Front Neuroendocrinol.* 29, 463-475.
- Padilla-Gómez, E., Beltrán-Campos, V., Montes, S., Díaz-Ruíz, A., Quirarte, G., Ríos, C. & Diaz-Cintra, S. (2012). Effect of 17 β -estradiol on zinc content of hippocampal mossy fibers in ovariectomized adult rats. *Biometals.* 25, 1129-1139.
- Palmiter, R. D., Cole, T. B., Quaipe, C. J. & Findley, S. D. (1996). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 14934-14939.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, New York.
- Poon, H. F., Calabrese, V., Calvani, M. & Butterfield, D. A. (2006). Proteomics analyses of specific protein oxidation and protein expression in aged rat brain and its modulation by l-acetylcarnitine, insights into the mechanisms of action of this proposed therapeutic agent for cns disorders associated with oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal.* 8, 381-394.
- Prange-Kiel, J., Fester, L., Zhou, L., Lauke, H., Carretero, J. & Rune, G. M. (2006). Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus.* 16, 464-471.
- Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L. & Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J. Neurosci.* 21, 7340-7348.
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M. L., Chao, V. & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus.* 9, 631-636
- Richwine, A. F., Godbout, J. P., Berg, B. M., Chen, J., Escobar, J., Millard, D. K. & Johnson, R. W. (2005). Improved psychomotor performance in aged mice fed diet high in antioxidants is associated with reduced ex vivo brain interleukin-6 production. *Brain Behav Immun.* 19, 512-520.
- Rusakov, D. A., Davies, H. A., Harrison, E., Diana, G., Richter-Levin, G., Bliss, T. V., & Stewart, M. G. (1997). Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience.* 80, 69-77.
- Sarkaki, A., Amani, R., Badavi, M., Safahani, M. & Aligholi, H. (2008). Effect of ovariectomy on reference memory version of Morris water maze in young adult rats. *Iran. Biomed. J.* 12, 123-128.
- Sato, K., Akaishi, T., Matsuki, N., Ohno, Y. & Nakazawa, K. (2007). Beta-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.* 1150, 108-120.
- Sherwin, B. B. (2012). Estrogen and cognitive functioning in women, lessons we have learned. *Behav Neurosci.* 126, 123-127.
- Smejkalova, T. & Woolley, C. S. (2010). Estradiol acutely potentiates hippocampal excitatory synaptic transmission through a presynaptic mechanism. *J Neurosci.* 30, 16137-16148.
- Solomon, P. R., Vander Schaaf, E. R., Thompson, R. F. & Weisz, D. J. (1986). Hippocampus and trace conditioning of the rabbit's classically conditioned nictitating membrane response. *Behav Neurosci.* 100, 729-744.
- Spencer-Segal Joanna, L., Mumeko, C., Tsuda, Larissa Mattei, Waters, Elizabeth M., Romeo, Russell D., Milner, Teresa A., McEwen, Bruce S. & Sonoko Ogawa. (2012). Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. *Neuroscience.* 202, 131-146.
- Srivastava, D. P. (2012). Two-Step Wiring Plasticity - A mechanism for estrogen-induced rewiring of cortical circuits. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 131, 17-23.
- Tanapat, P., Hastings, N. B. & Gould, E. (2005). Adult female rat in a dose- and time- dependent manner. *J Comp Neurol.* 481, 252-265.

- Triggs, W. J. & Willmore, L. J. (1984). In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J. Neurochem.* 42, 976-980.
- Wallace, M., Luine, V., Arellanos, A. & Frankfurt, M. (2006). Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Res.* 1126, 176–182.
- Woolley, C. S. (2007). Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 657–680.
- Woolley, C. S. & McEwen, B. S. (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J. Comp. Neurol.* 336, 293-306.
- Xu, X. & Zhang, Z. (2006). Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sci.* 79, 1553-1560.
- Yao, J., Chen, S., Cadenas, E. & Diaz Brinton, R. (2011). Estrogen Protection Against Mitochondrial Toxin-Induced Cell Death In Hippocampal Neurons, Antagonism by Progesterone. *Brain Res.* 1379, 2–10.
- Zhu, Y., Carvey, P. M. & Ling, Z. (2006). Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Res.* 1090, 35–44.