



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

PAPEL DE LA PROLACTINA EN LA
NEUROPROTECCIÓN CONTRA
EXCITOTOXICIDAD EN EL HIPOCAMPO DORSAL
DE LA RATA HEMBRA

T . E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
PRESENTA:
DIANA IRIS TEJADILLA OROZCO

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de Calificador certificamos que la tesis elaborada por: Diana Iris Tejadilla Orozco, cuyo título es “Papel de la Prolactina en la Neuroprotección contra Excitotoxicidad en el Hipocampo Dorsal de la Rata Hembra” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México. El Jurado Calificador asignado para la evaluación de la presente tesis estuvo conformado del siguiente modo:

Presidente:

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Secretaria:

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Vocal:

Dra. María de la Luz Torner Aguilar

Suplente:

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Suplente:

Dra. Gabriela Morali de la Brena

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Coordinadora del Programa

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, en Juriquilla Querétaro, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Morales Guzmán.

Recibió los invaluable comentarios, críticas y sugerencias constantes del comité tutorial integrado por:

Dra. Sofía Díaz Miranda

Dra. María de la Luz Torner Aguilar

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Además, contó con los recursos otorgados por donativos de PAPIIT-UNAM (IN204709); y CONACyT (No. 51044). La autora contó con beca de CONACyT (226603) y con el apoyo técnico del personal del INB:

Biol. María Eugenia Ramos Aguilar

M. en C. Leonor Casanova Rico

M. en C. Nilda Adela Navarro Padilla

M en C. Alejandra Castilla León

Laboratorista Asucena Ortega Correa

Sria. Yolanda Orduña Cruz

M.V.Z. Martín García Servín

I.S.C. Elsa Nydia Hernández Ríos

Ing. Biom. Ma. De Lourdes Palma Tirado

Lic. Teresa Soledad Medina Malagón

M.V.Z. Román Pacheco Barrita

Lic. Teresita de Jesus Perez Cruz

Lic. Angel Salazar Muro

Lic. Rafael Silva Cruz

Fotógrafa Laura Sánchez Carballo

AGRADECIMIENTOS

A ti mamá, gracias por tu gran amor, por el apoyo incondicional cada día, por caminar junto a mí y abrazarme, por tu confianza y por darme siempre más.

A ti papá, que a tu manera me sigues enseñando el valor de la vida y el amor a la familia. Con tu ayuda y con tus consejos todo ha sido menos escabroso.

A Carito, mi favorita, si alguien se merece un reconocimiento, eres tú. Gracias por mostrarme la sencillez de la vida, por ser mi ejemplo de cómo salir de las adversidades. Gracias por ubicarme y enseñarme que “no pasa nada”.

A mi trébol de buena suerte, mi otra favorita, Michelle, por darme seguridad y ser fuerte siempre, por enseñarme a ver los problemas como oportunidades, por ayudarme con tu cerebro de genio a resolver.

A Luigi, por darme ánimos para seguir superándome, por sostenerme siempre en lo difícil, por ayudarme a calmar mis ansiedades, por el “no chille, recoja piedras”.

A la tía Carmen y a Charly, mis motores y mi porra personal.

A la Toña y al Mau, mi estabilidad emotiva, por darme a Leo.

A la Karla, por enseñarme la riqueza en cada cosa pequeña, por dar siempre el corazón.

A John, por ser mi amigo incondicional, por compartir el amor por lo que uno hace.

A mis amigos y compañeros:

A Edgar por hacer más amigable la tecnología para mí, por siempre estar ahí. A Adybu, por seguir siempre, a sus papás por acogerme y darme de comer. A Ana Luisa, por ayudarme cuando más lo necesité, a sus papás por amorosos. A Lety, por compartir la vida junto a mí, por siempre ser tan linda. A Mary, por tener detalles lindo siempre. A Paco, por la tranquilidad y por ayudarme cuando lo necesitaba. A Benjas, por el optimismo, por siempre tan “light”. A Julián, por ayudarme a estudiar por hacerme reír, por “Grinch”. A Arafat, a Ulises, a Luisa, a Nisyen, a Jimena, a Susa, a Paty de la Rosa, a Lluviana, a Miriam, a Néstor, a Christian, a Luis Miguel; a todos por compartir conmigo este periodo de la vida, cada uno me enseñó algo importante.

A todos mis profesores, por las clases, los consejos y el amor a su trabajo.

A nuestra máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México.

RESUMEN

La neuroprotección se puede definir como un conjunto de mecanismos celulares destinados a prevenir o limitar una lesión o muerte del tejido cerebral para asegurar su supervivencia ante factores de daño, tanto internos como externos. El ácido kaínico (AK), un agonista glutamatérgico, se usa experimentalmente para provocar daño excitotóxico y muerte celular, ya que su acción sobre la célula provoca un efecto sobre-estimulador de los receptores excitatorios. Una estructura cerebral que es blanco de la excitotoxicidad causada por AK dada su abundancia de receptores a glutamato, es el hipocampo. Esta estructura, además de ser susceptible al AK, sufre diversos cambios morfológicos y funcionales durante la reproducción. Estudios previos en nuestro laboratorio muestran que la lactancia protege al hipocampo materno de la rata ante la excitotoxicidad inducida por AK y se ha propuesto que las fluctuaciones en los niveles hormonales de los esteroides ováricos y de la prolactina (PRL) juegan un papel relevante en dicha neuroprotección. Durante la gestación y la lactancia los niveles séricos de PRL aumentan de manera crónica, y aunque ésta hormona estimula principalmente la producción y el mantenimiento de la secreción láctea, también se le ha implicado con la modulación de la excitabilidad neural. En el presente trabajo se investigó si la administración crónica de PRL ovina (1mg/ml; 4 días, vía subcutánea) previene el daño excitotóxico inducido por AK (7.5 mg/kg pc, ip) en el hipocampo de ratas hembra intactas y ovariectomizadas. El daño celular fue evaluado 48 horas después de la inyección con AK por varios métodos de histología: tinción de Nissl, inmunohistoquímica de Neu-N, y tinción con Fluoro-Jade C. Los resultados muestran que la PRL tiene un efecto protector en el hipocampo en ambos grupos ante la lesión con AK, ya que el grupo tratado con PRL mostró menor daño celular en las áreas hipocámpales CA1, CA3 y CA4, en comparación con el grupo control tratado con vehículo. Este efecto protector fue más evidente en los animales ovariectomizados. Además, la cuantificación de las manifestaciones conductuales tipo epilepsia que mostraron las ratas al recibir la lesión con AK, reveló una menor progresión de dichas estereotipias en los grupos que recibieron el tratamiento con PRL previo a la lesión excitotóxica. Estos datos sugieren que la PRL tiene acciones neuroprotectoras en este modelo experimental, y dado que es un modelo de hiperprolactinemia, puede explicar en parte, la neuroprotección observada durante la lactancia de la rata.

SUMMARY

Neuroprotection refers to cellular mechanisms which protect or limit lesions to avoid cellular degeneration or death this protection allows the cellular survivor against external damage. Kainic acid (KA), a glutamatergic agonist, has been used experimentally to induce excitotoxic damage and cellular death, because his effect on overactivation of excitatory receptors. The hippocampus is a structure sensible to KA because his abundance of glutamatergic receptors, as well, this structure suffers morphological and functional changes during reproduction. Previous findings in our laboratory shows that lactation protect the maternal rat hippocampus against excitotoxicity by KA and it has been proposed that fluctuation in hormonal levels as ovarian steroids and prolactin (PRL) plays a relevant role in that neuroprotection. During gestation and lactation plasma levels of PRL increase chronically, stimulating mainly production and secretion of milk but also it has been implicated in modulation of neural excitability. In this work we investigated if chronic administration of ovine PRL (1mg/ml; 4 days via subcutaneous) prevents the excitotoxic damage induced by intraperitoneal injection of KA (7.5mg/kg b. w.) on hippocampus of female intact and ovariectomized rats. The third day of treatment with PRL we inject KA and 48h after it we assessed the cell damage by Nissl staining, Immunostaining for Neu-N and Fluoro-Jade C. The results shows , firstly, that PRL has a neuroprotective role against KA on CA1, CA3 and CA4 hippocampic areas in both, Intact and Ovx rats but this protective effect was higher in Ovx rats. Secondly, PRL-treated rats from both conditions (intact or OVX) presented lesser progression and intensity of behavioral epileptoid manifestations using the scaole of Zhang, compared to saline-treated rats. These data document that PRL can exert a neuroprotective action in this experimental model, and can explain in some way the neuroprotective role of PRL against KA on hippocampus of lactating rats.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Conceptos Teóricos Básicos.....	1
I.1.1 Plasticidad neural... ..	1
I.1.2 Factores de daño neuronal	1
I.1.3 Neuroprotección	2
I.1.4 Excitabilidad y excitotoxicidad	3
I.2 La Formación Hipocámpica.....	7
I.2.1 Perspectiva histórica.....	7
I.2.2 Ventajas del estudio de la FH.....	8
I.2.3 Localización anatómica y regionalizaciones de la FH en la rata.....	9
I.2.4 Principales conexiones de la FH.....	11
I.2.5 Hipocampo y giro dentado.....	12
I.2.6 Papel funcional del hipocampo.....	13
I.2.7 Hipocampo y estrógenos.....	14
I.2.8 Hipocampo y glutamato.....	15
I.3 Modelo Experimental.....	16
I.3.1 Características generales rata <i>Wistar</i>	16
I.3.2 Justificación del uso de nuestro modelo experimental.....	17
II. ANTECEDENTES	18
II.1 Hormonas.....	18
II.1.1 Hormonas y ciclo reproductivo.....	19
II.1.2 Funciones de la prolactina (PRL).....	22
II.1.3 Tejidos productores de prolactina	24
II.1.4 Receptor de prolactina (PRLR).....	25
II.1.5 Acciones centrales de la prolactina.....	27
II.1.6 La acción neuroprotectora de la prolactina.....	28
II.2 Neuroplasticidad en el hipocampo durante la maternidad.....	29
II.2.1 Acido kaínico e hipocampo.....	29
II.2.2 Acido kaínico e hipocampo de la rata lactante.....	30
III JUSTIFICACIÓN	32
IV HIPÓTESIS	32
V OBJETIVOS	32
V.1 General.....	32

V.2 Específicos.....	32
VI MATERIAL Y MÉTODO.....	33
VI.1 Animales.....	33
VI.1.1 Intactas.....	33
VI.1.2 Ovariectomizados.....	35
VI.2. Obtención y procesamiento del tejido.....	37
VI.2.1 Perusión.....	37
VI.2.2 Obtención de cortes.....	38
VI.3 Protocolos de histología.....	39
VI.3.1 Tinción de Nissl.....	39
VI.3.2 Inmunohistoquímica para Neu-N.....	40
VI.3.3 Marcador de muerte celular Fluoro-Jade C	40
VI.4 Evaluación Conductual.....	41
VI.5 Obtención de los Datos.....	41
VI.5.1 Cuantificación celular.....	41
VI.5.2 Cuantificación conductual.....	42
VI.6 Análisis Estadístico.....	43
VII RESULTADOS.....	44
VII.1 Inmunohistoquímica para PRLR.....	44
VII.2 Tinción de Nissl	45
VII.3 Inmunohistoquímica para Neu-N.....	48
VII.4 Marcaje con Fluoro-Jade C.....	51
VII.5Evaluación conductual.....	54
VIII DISCUSIÓN.....	56
IX CONCLUSIONES.....	60
X BIBLIOGRAFÍA.....	61
XI ANEXOS.....	68
XI.1 Ciclo estral.....	68
XI.2 Ovariectomía.....	69

I INTRODUCCIÓN

I.1 Conceptos Teóricos Básicos

I.1.1 Plasticidad neural

El término *plasticidad* se refiere a la capacidad intrínseca del sistema nervioso para que, a través de cambios estructurales, funcionales, moleculares, bioquímicos y celulares, éste pueda adaptarse a variaciones del medio circundante y minimizar los efectos de lesiones y/o del envejecimiento (Pascual-Leone et al., 2005).

Entre los procesos que abarca la plasticidad neural se incluyen el establecimiento de nuevas conexiones, el crecimiento dendrítico, la arborización, los cambios celulares durante el desarrollo y el crecimiento, los cambios en la función de las células gliales, el aprendizaje, las modificaciones en los campos receptivos de las neuronas, la habilidad de generar nuevas células en algunas estructuras, los mecanismos endógenos de la neuroprotección, etc. (Pascual-Leone et al. 2005, Llorens-Martín et al. 2009).

La plasticidad neural se hace más evidente cuando ocurren eventos que provocan lesiones cerebrales durante el periodo perinatal o en etapas tempranas del desarrollo, aunque este proceso puede darse a cualquier edad y puede variar según el ambiente, el género y el estado fisiológico del sujeto, como por ejemplo durante la lactancia (Kinsley et al., 2008; Bakos, et al., 2009). Esta capacidad de las neuronas puede estudiarse a distintos niveles y enfoques experimentales: farmacológico, fisiológico, bioquímico, conductual, inmunológico, molecular y, utilizando diversas técnicas como la imagenología, la histología, la microdiálisis, la microscopía confocal multifotónica, la inmunohistoquímica, la detección de genes, entre otras (Castroviejo 1996, Brailowsky 1998, Llorens-Martín 2009).

I.1.2 Factores de daño neuronal

Los factores que pueden provocar daño al sistema nervioso (SN) son diversos, sólo por nombrar algunos incluimos a las enfermedades neurodegenerativas, los accidentes cerebro-vasculares, los traumatismos cerebrales, las lesiones de la médula espinal, la fiebre y el estrés. También existen factores que dañan al

SN al comprometer el aporte de oxígeno, provocando así la liberación excesiva de glutamato y de especies reactivas a oxígeno y causando muerte tisular debido a la activación de los mecanismos celulares que desencadenan necrosis y apoptosis. Tal es el caso de la hipoxia, una disminución en la concentración de oxígeno en los tejidos que provoca muerte celular, la isquemia que se caracteriza por una merma transitoria o permanente de la irrigación sanguínea y tiene como consecuencia procesos hipóxicos y la excitotoxicidad o muerte neuronal causada por la sobre-activación de los receptores excitatorios. Cuando éstos factores dañinos amenazan la homeostasis del sistema nervioso se producen dos patrones lesivos claros: uno primario, consecuencia temprana del episodio patológico inicial, y uno secundario, un grupo de episodios patológicos que inducen la degeneración tardía en células que no están afectadas por el daño primario o que sólo lo están parcialmente (Guimarães, 2009). A la par del daño, se provoca que las estructuras cerebrales muestren el proceso de la plasticidad, unas veces de forma espontánea y otras como consecuencia de tratamientos de rehabilitación adecuados. Pero se necesita más información sobre mecanismos tanto de plasticidad como de daño, ya que un grupo diverso de desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, la de Huntington y la de Parkinson, así como la esclerosis lateral amiotrófica, las ataxias espinocerebelosas y las encefalopatías espongiiformes transmisibles han sido asociadas a procesos de necrosis. La comprensión de los mecanismos de regulación de la muerte celular durante el desarrollo dentro de la evolución de cuadros patológicos podrá, potencialmente, proveer herramientas para favorecer el mecanismo de la neuroprotección y eventualmente lograr la reparación del sistema nervioso (Rommy von Bernhardt 2004).

1.1.3 Neuroprotección

Uno de los mecanismos de plasticidad que los organismos vivos han desarrollado a lo largo de la evolución y que les confiere protección y adaptabilidad ante los factores dañinos es precisamente la neuroprotección, definido como el conjunto de mecanismos destinados a prevenir o limitar lesiones que puedan desencadenar la aparición de daño o muerte neuronal (Alexi et al., 2000). Como mencionamos previamente, se sabe que la

susceptibilidad del sistema nervioso al daño puede variar dependiendo del ambiente, el género, la edad del organismo, el sistema que afecta, la presencia de patologías y su condición fisiológica (Castro-Viejo, 1996). En particular, en el ciclo reproductivo de los mamíferos, la gestación y la lactancia ofrecen una marcada protección ante factores de daño como la excitotoxicidad, el estrés y el envejecimiento (Lightman et al., 2001; Gatewood et al., 2005; Vanoye-Carlo et al., 2008). Por ejemplo, se sabe que a un mayor número de experiencias reproductivas, menor es la formación de proteína β -amiloide en el cerebro de la rata hembra (Gatewood et al., 2005). Además, se ha encontrado en humanos que, a partir de la menopausia, cuando los niveles de estrógenos disminuyen, la susceptibilidad a padecer Alzheimer incrementa (Pike C., 1999).

I.1.4 Excitabilidad y excitotoxicidad

La excitabilidad de una neurona depende de la capacidad que tiene las células para intercambiar flujos de iones (moléculas cargadas eléctricamente), entre el interior y el exterior de la célula, que se encuentran a diferente concentración. Los iones que participan son el Potasio (K^+), el Sodio (Na^+), el Calcio (Ca^{2+}), el Cloro (Cl^-) y el Magnesio (Mg^{2+}) y pueden entrar o salir por que la célula equilibra la concentración de los mismos gracias a que éstos tienen carga positiva o negativa, éstos cambios de flujo iónico hacen que la célula permanezca en reposo (potencial de membrana) o genere actividad eléctrica espontánea (potencial de acción) para comunicarse con otras células y otros tejidos. Los cambios en la concentración de iones se expresa en milivoltios (mV), durante el reposo una neurona tiene un potencial de acción negativo, entre ~ -70 mV; si el voltaje sobrepasa un umbral (umbral de excitación) entonces la célula se excita, se despolariza y produce una descarga eléctrica que viaja a lo largo de la membrana celular conocida como potencial de acción (en Fernández de Miguel, 1998). (Figura 1).

a

Interior		Exterior	
K ⁺	125	K ⁺	5
Na ⁺	12	Na ⁺	120
Cl ⁻	5	Cl ⁻	125
Ca ²⁺	0.0002	Ca ²⁺	2

Membrana celular

B

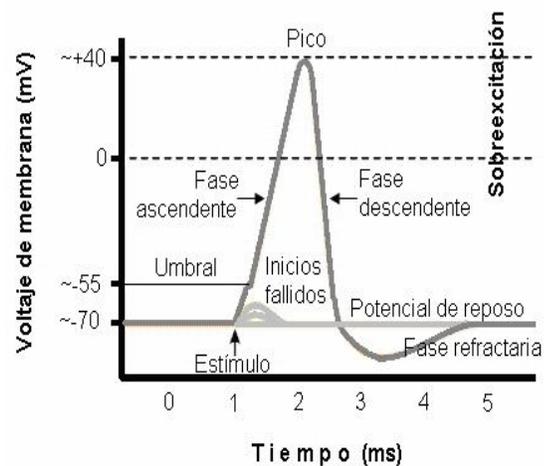


Figura 1. Potenciales de membrana y de acción. La concentración (valores dado en mM= milimolar) estable de iones a ambos lados de la membrana dará lugar al potencial de membrana (a). Si los cambios de voltaje en la célula son pequeños la propagación del voltaje es pasiva y sufre una atenuación en el tiempo (inicios fallidos); si por el contrario, el voltaje sobrepasa el umbral, se produce el potencial de acción (b).

Los mecanismos de generación de los potenciales de acción involucran diferentes tipos de corrientes iónicas, la de K⁺, la de Na⁺ y la de Ca²⁺. Esta última muy importante ya que gran diversidad de señales extracelulares inducen un incremento de los niveles citosólicos de Ca²⁺. En las neuronas el Ca²⁺ provoca la secreción, normalmente la concentración de Ca²⁺ libre en el citosol se mantiene extremadamente baja ($\sim 10^{-7}$ M), mientras que su concentración en fluido extracelular ($\sim 10^{-3}$ M) y en el lumen es alta. Así pues existe un enorme gradiente de Ca²⁺ que tiende a llevar Ca²⁺ hacia el citosol, tanto a través de la membrana plasmática como a través de la membrana del retículo endoplásmico. Cuando una señal abre transitoriamente los canales de Ca²⁺ en alguna de estas dos membranas, el Ca²⁺ fluye precipitadamente el citosol, incrementando su concentración local en 10-20 veces y activando las proteínas sensibles a Ca²⁺ de la célula. La concentración de Ca²⁺ en el citosol se mantiene baja en las células en reposo. Existen bombas de Ca²⁺ en las células que permiten mantener los niveles óptimos de dicho ión ya que si los

niveles de Ca^{2+} incrementan demasiado al interior, más allá de excitar a la neurona para que se comunique, ésta sufrirá disfunción mitocondrial y se desencadenarán mecanismos de muerte celular (Alberts et. Al., 2003).

Como mencioné antes, para que ocurra el potencial de acción, los iones deben pasar a través de canales, existen tres maneras de abrir a estos canales, diferencia de voltaje, ligandos o tensión mecánica. El principal ligando excitador de estos canales en las neuronas es el glutamato, un aminoácido no esencial, que debido a su polaridad no atraviesa la barrera hematoencefálica por lo que no accede al cerebro a través de la circulación, más bien se sintetiza en el SNC a través de diversas reacciones metabólicas y su síntesis y metabolismo dependen de la activación de los dos canales ionotrópicos (AMPA y Kainato) y de uno metabotrópico (receptor metabotrópico de glutamato) en las interacciones entre terminales nerviosas y las células gliales (astrocitos). La liberación de este neurotransmisor es dependiente de Ca^{2+} y su inactivación se produce principalmente por captura dependiente de Na^+ . Así, el glutamato liberado como neurotransmisor se transporta hacia el astrocito donde se forma glutamina que difunde a través de las membranas para llegar a la neurona para generar glutamato por acción de la glutaminasa (Figura 2).

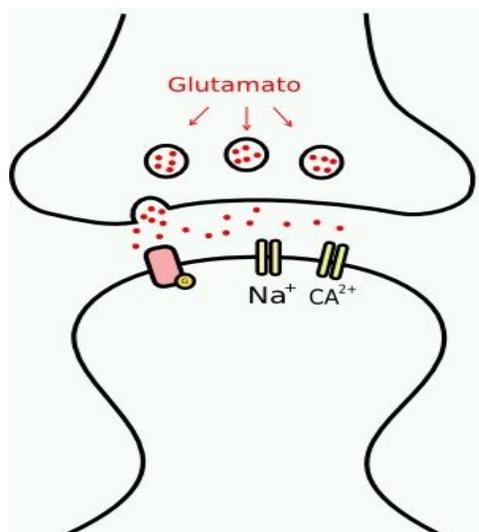


Figura 2. Sinapsis glutamatergica. Se observan tres tipos de canales a glutamato, de izquierda a derecha, receptor metabotrópico y canales ionotrópicos. Al aumentar la concentración de sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) se produce el potencial de acción.

Si los niveles de neurotransmisores excitatorios, como el glutamato, o algún agonistas de este, incrementan demasiado en el espacio inter-sináptico se da en exceso, la célula desencadenaría mecanismos de muerte a causa de la sobreexcitación. Hay evidencia de que la excitotoxicidad, definida como el daño neuronal causado por la sobre-activación de los receptores excitatorios, es mediada por receptores para ácido-amino-3-hidroxi-5-metiloxazolepropriónico (AMPA) y receptores a kainato (Beal, 1992; Ferrer, 2002; Wang et al., 2005), así como la prolongada activación de los receptores NMDA que permiten un excesivo flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula desencadenando proteasas y fosfolipasas dependientes de Ca^{2+} lo que producirá radicales libres, tóxicos para la célula ya que afectan proteínas vitales para la célula, lo que a su vez promoverá disfunción mitocondrial y posterior muerte celular y disfunción mitocondrial (Dugan y Sook, 2006). Los receptores AMPA y kainato son los responsables de mediar la transmisión sináptica rápida convencional, mientras que los receptores NMDA son modulados por el Mg^{2+} , regulan el flujo de Ca^{2+} y de Na^+ al interior de la célula, se les ha visto implicados en la plasticidad sináptica y en la adquisición de la memoria (Kandel, 2000).

Los receptores AMPA y kainato están presentes, con una distribución heterogénea, en las dendritas de las neuronas piramidales del hipocampo. Se conoce que la administración sistémica o intracerebral de ácido kaínico (AK), un agonista glutamatérgico, a ratas causa muerte de las neuronas piramidales de las regiones hipocampales CA1 y CA3 y, la distribución específica de los receptores AMPA/kainato y NMDA en el cerebro y su sensibilidad a la permeabilidad de Ca^{2+} son factores importantes en la susceptibilidad selectiva de estas neuronas a la neurodegeneración (Wang et al., 2005). (Figura 3).

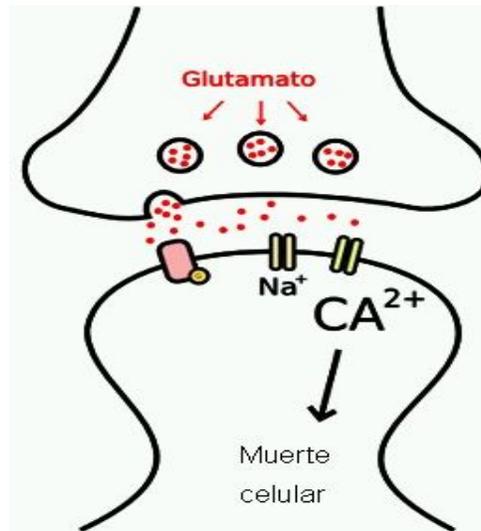


Figura 3. El incremento excesivo de calcio (CA^{2+}) al interior de la célula provocará la activación de los mecanismos de muerte celular.

I.2 La Formación Hipocámpica (FH)

I.2.1 Perspectiva histórica

A nivel anatómico, Camilo Golgi (1886) hizo las primeras observaciones de la formación hipocámpica (FH) para reforzar su argumento de la *teoría reticular* que proponía que las conexiones entre células formaban una gran red. Por otro lado, Ramón y Cajal apoyando la *doctrina celular*, postulaba que las células eran entidades separadas que se contactaban pero no se unían con las demás neuronas. A principios del siglo XX, utilizando el método de Golgi, Cajal describió la estratificación de varios sistemas aferentes y distinguió entre células de axón largo y axón corto, y describió la organización celular hipocámpica y sus conexiones. Simultáneamente, Karl Schaffer (1892), quien describió fibras que van de CA3 a CA1, encontró que los axones pueden tener una gran extensión para conectarse con neuronas vecinas en campos corticales. Muchos años después (1933-34), Lorente de Nó contribuyó también al ampliar el análisis de los diferentes tipos celulares en el hipocampo y sus patrones axonales y dendríticos. Para 1950, con el desarrollo del método de neurodegeneración, Nauta logró trazar vías intrínsecas y extrínsecas, y Theodor Blackstad contribuyó con estudios sobre la organización regional del hipocampo y su conectividad externa e interna usando tinciones y microscopía

electrónica. Por su lado y con el mismo método, en 1963, Lionel Hamlyn realizó la primera descripción comprehensiva de las sinapsis entre células piramidales de CA1 y CA3. En 1969, Raisman y otros investigadores realizaron estudios sobre plasticidad, transplantes, crecimiento de células, sinapsis, ritmicidad, patologías, electrofisiología, etc. Durante los últimos 30 años las células piramidales del hipocampo han sido las neuronas más ampliamente estudiadas; como resultado, tenemos gran información acerca de su desarrollo, sinaptogénesis, receptores, neurotransmisores y canales iónicos, microcircuitos y maquinaria biológica, además de los estudios sobre aprendizaje hechos por Endre Grastyan y los de epilepsia hechos por Richard Jung. Estos y otros hallazgos hacen de ésta estructura una área de gran interés y un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de la plasticidad (Andersen et al., 2007). Recientemente, el hipocampo ha sido estudiado también en relación con la reproducción y se ha encontrado que le ocurren varias adaptaciones morfológicas y fisiológicas durante esas etapas (Kinsley et al., 2006), adaptaciones principalmente relacionadas con la neurogénesis, la neurotransmisión, y el aprendizaje y la memoria. Este aspecto se revisa más adelante.

1.2.2 Ventajas del estudio de la FH

Las ventajas del estudio de la FH en la rata se han evidenciado con los años, ya que es una estructura ampliamente estudiada (Paxinos, 1995). Actualmente se cuenta con importantes hallazgos sobre sus características; se conoce su organización anatómica, su electrofisiología y participación en la formación de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés), se sabe de sus interconexiones precisas, de su participación en los procesos de memoria y aprendizaje espacial, de que contiene las “células de lugar”¹, también se conoce ampliamente que muestra plasticidad neuronal (neurogénesis) y sináptica (axogénesis y espinogénesis), así como que puede sufrir cambios estructurales a causa de alteraciones endocrinas y también se conoce que

¹ El hipocampo desempeña un papel fundamental en la ejecución de tareas espaciales; en 1971, John O'Keefe y Jonathan Dostrovsky descubrieron que existen neuronas del hipocampo que se activan específicamente cuando el animal está en una localización determinada del ambiente. Por ello, se les llamó “células de lugar”; anatómicamente, estas neuronas son células piramidales de las regiones CA1 y CA3. Se ha propuesto que las “células de lugar” forman * parte de un mapa cognitivo en el hipocampo y se las ha considerado como elementos de una representación cartesiana del ambiente (Nadel y Eichenbaum, 1999).

sufre degeneración neural debida a la edad y al estrés (Díaz-Cintra, en revisión).

Este amplio conocimiento sobre la FH nos permite abordar el estudio de esta estructura desde diferentes perspectivas y niveles de integración (Figura 4).

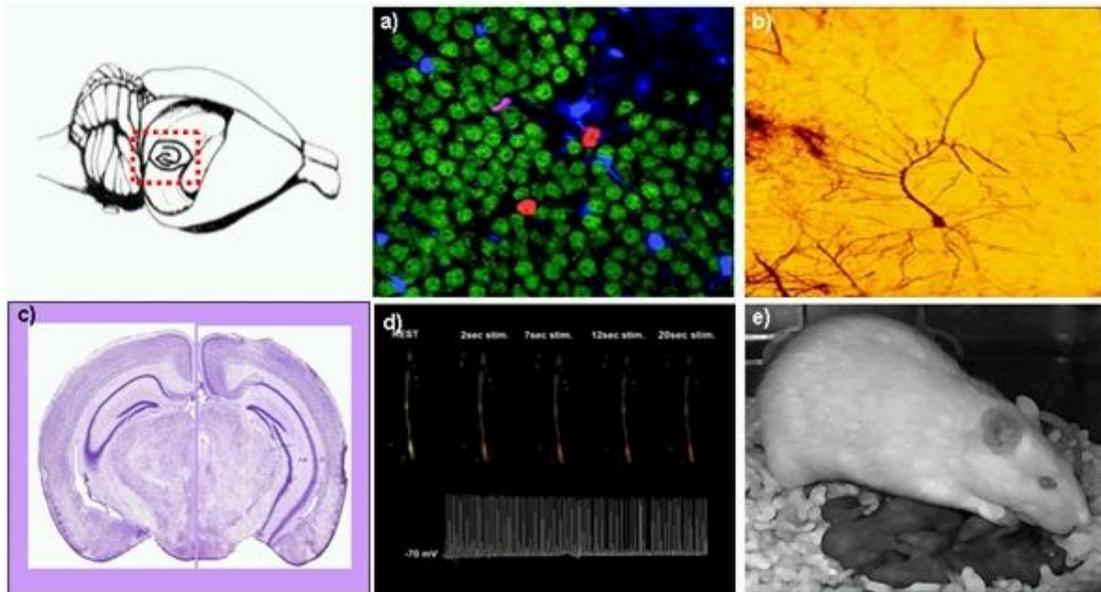


Figura 4. Estudio de la FH. Fotografías de diversas técnicas utilizadas para el estudio de la FH. a) Inmunohistoquímica de fluorescencia, b) Técnica de Golgi, c) Tinción de Nissl, d) Registro electrofisiológico y e) Registro conductual.

1.2.3 Localización anatómica y regionalización de la FH en la rata

La FH de la rata es una estructura elongada, bilateral y prominente que mide aproximadamente 1.2 cm^2 y se localiza en el lóbulo temporal. Su ubicación obedece a dos ejes, el longitudinal en forma de “C” limitándose rostro-dorsalmente con el septum y pasando por detrás y a lo largo del diencéfalo, éste gran eje corre en dirección septo-temporal. En el eje transversal es donde se encuentra el giro dentado en su extremo proximal y el surco rinal en el extremo distal. El hipocampo se pliega hacia arriba y hacia adentro en la porción interna de la corteza temporal para formar la superficie ventral del asta anterior del ventrículo lateral. Un extremo limita con los núcleos amigdalinos y uno de sus bordes se fusiona con la circunvolución parahipocámpica, que forma la corteza de la superficie ventromedial del lóbulo temporal. Según la profundidad, a las regiones más cercanas a la pía se les denomina

superficiales y a las más cercanas al ventrículo, profundas (Paxinos, 1995), (Figura 5).

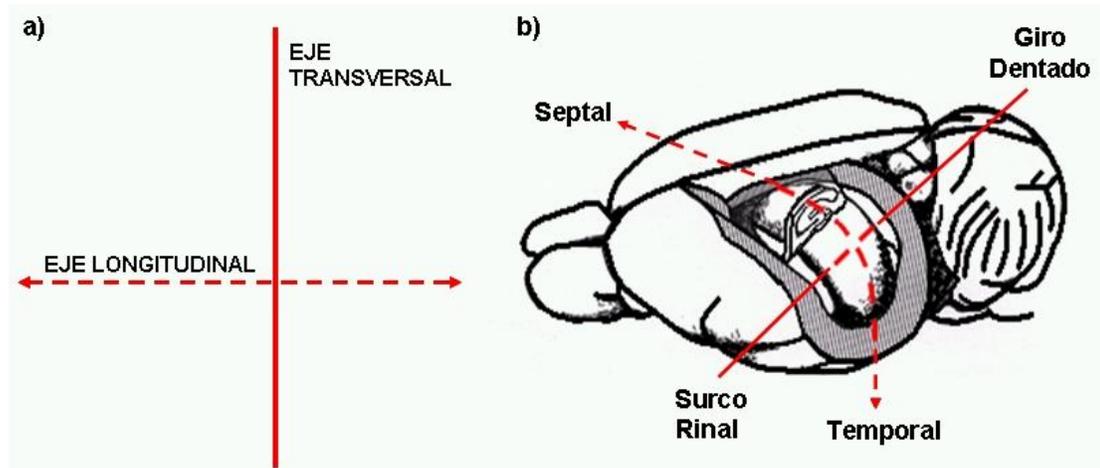


Figura 5. Ubicación de la formación hipocámpica. Se muestran los ejes, longitudinal y transversal (a) y los límites septal, giro dentado, surco rinal y lóbulo temporal (b) de la FH en la rata.

La FH tiene un conjunto de regiones relacionadas entre sí que comprenden un complejo sistema constituido por 6 áreas citoarquitectónicamente distintas: 1) **giro dentado** (GD), 2) **hipocampo** (CA1, CA2, CA3 y CA4), 3) **subículo**, 4) **presubículo**, 5) **parasubículo** y 6) **corteza entorrinal** (Figura 6). El criterio para incluirlas dentro de la FH es que todas estas regiones están ligadas una a la otra por una larga proyección unidireccional (Paxinos, 1995). Las diferentes regiones contienen una capa de neuronas principales (piramidales o granulares) denominadas *neuronas* de proyección o Golgi tipo I y las *interneuronas* locales o Golgi tipo II que son muy numerosas. La distribución celular y organización de las interconexiones hipocámpicas es laminar (estratos) y unidireccional teniendo como origen a la corteza entorrinal.

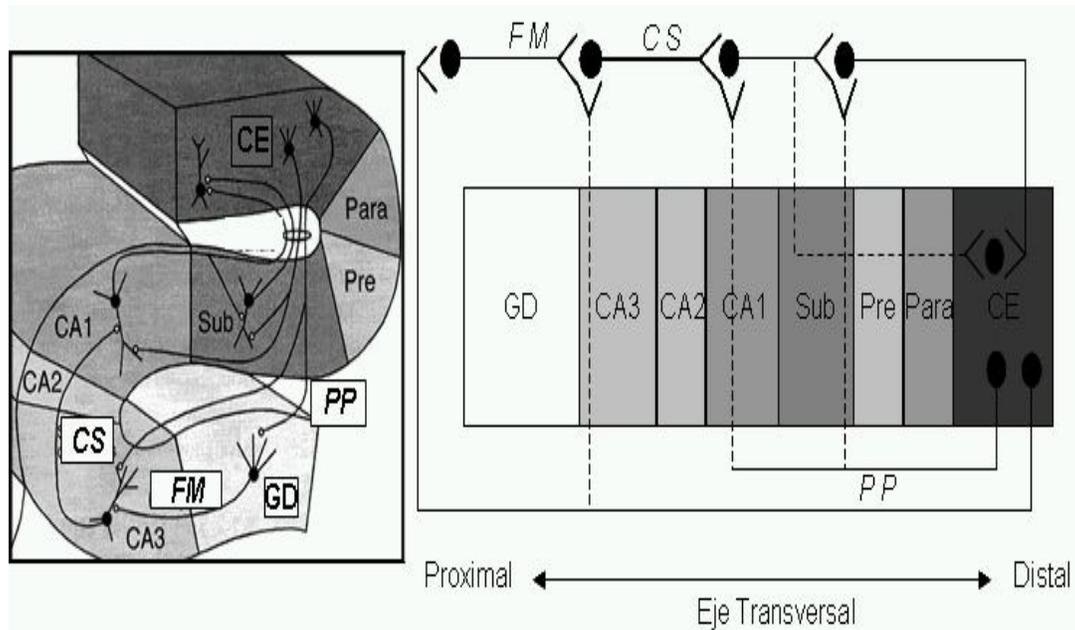


Figura 6. Regionalización de la FH de rata (CE= Corteza Entorrinal, Para= Parasubículo, Pre= Presubículo, Sub= Subículo, CA= Cornu Amonis o Hipocampo -CA1, CA2 y CA3- y GD= Giro Dentado) y así como sus conexiones (FM= fibras musgosas, CS= Colaterales de Schaffer y PP= patrón perforante) (Esquema modificado de Andersen et al; 2007).

I.2.4 Principales conexiones de la FH

La entrada principal es por la vía del patrón perforante medial (PPM) cuyos axones provienen de las capas II / IV de la corteza entorrinal (CE) y hacen conexiones con el giro dentado GD y las células piramidales del área CA3, mismas que también reciben entrada proveniente de las fibras musgosas (MF) cuyo origen son las células granulares del GD. Las células piramidales de CA3 envían axones vía colaterales de Schaffer hacia el área CA1, la cual también recibe axones del patrón perforante lateral (PPL) mismos que provienen de la corteza entorrinal pero en éste caso de la capa III. Los axones de las células de ésta capa se dirigen hacia el subículum (Sub), el cuál envía axones de regreso hacia la corteza entorrinal lateral (LEC) y medial (MEC) (Kandel et al., 2000) (Figura 7).

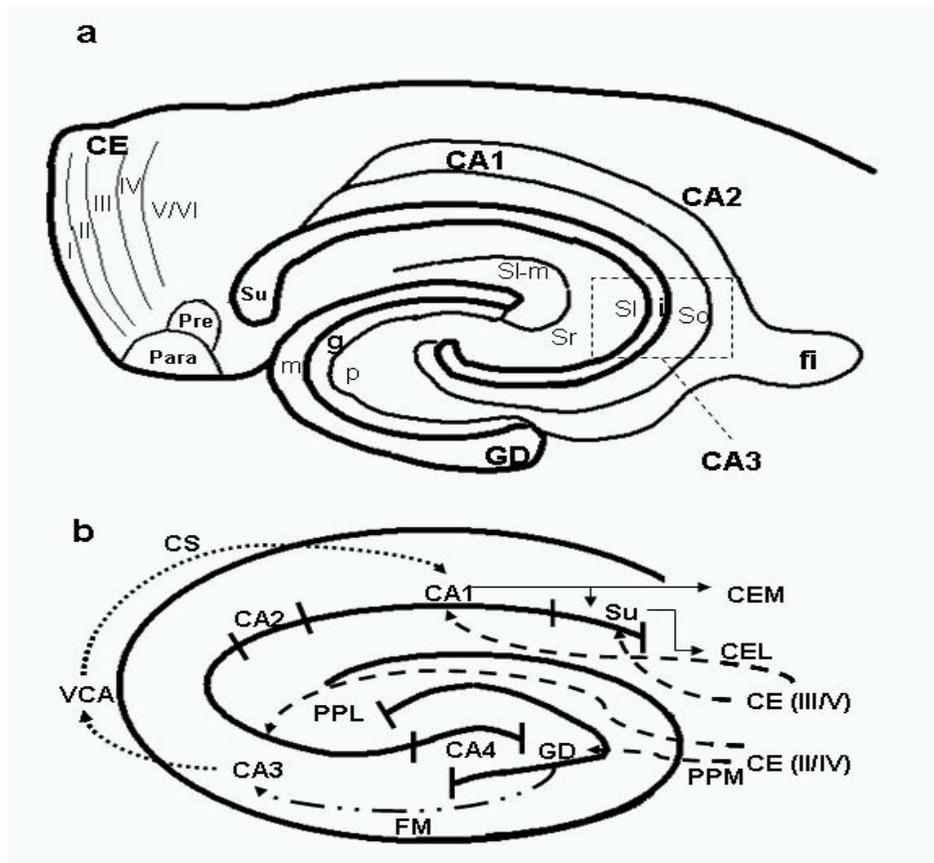


Figura 7. Estratos, áreas (a) y conexiones (b) de la FH en la rata. CE= corteza entorrinal (capas II, III, IV y V), Pre= presubículo, Para= parasubículo, Su= subículo, CA= Cornu Ammonis (CA1, CA2, CA3 y CA4), GD= giro dentado, m= capa molecular, g= capa granular, p= capa polimórfica, SI-m= estratum lacunosum moleculare, Sr= estratum radiatum, SI-i= estratum lacunosum, i= capa piramidal, So= estratum orines, fi= fimbria, VCA= vía comisural asociativa, CS= colaterales de Schaffer (.....), FM= fibras musgosas (- - - -), PP= vía del patrón perforante (- - - -), PPL= PP lateral, PPM= PP medial, CEM= CE medial, CEL= EC lateral.

1.2.5 Hipocampo y giro dentado

Anteriormente se llamaba hipocampo a toda la FH por su parecido con el caballito de mar, ahora se conoce como hipocampo, Asta de Ammon o Cornu Ammonis (CA), a una subdivisión de la FH que se divide a su vez en cuatro áreas o campos que contienen **células piramidales**, a saber son, **CA1**, **CA2** y **CA3**. Por su parte el giro dentado (GD) comprende tres capas celulares que son: **granular**, **polimórficas**, donde se incluye a CA4 y **molecular** (Figura 8).

Las capas principales y las regiones anatómicas neuronales se definen por sus conexiones específicas y se distribuyen en las regiones desde CA1 hasta GD. En especial CA1 y GD se les emplea como sistema de estudio del desarrollo neurobiológico (Andersen et al. 2007).

Al hipocampo se le divide comúnmente en dorsal y ventral, diversos estudios han demostrado que la porción dorsal, no así el ventral, es crítica para la memoria espacial; la existencia de conexiones relativamente directas entre el ventral y el hipotálamo sugiere que esta parte del hipocampo podría estar involucrado en la adquisición de información relacionada más bien con pistas internas, por ejemplo, el hambre (Hock , BJ y Bunsey MD, 1998).

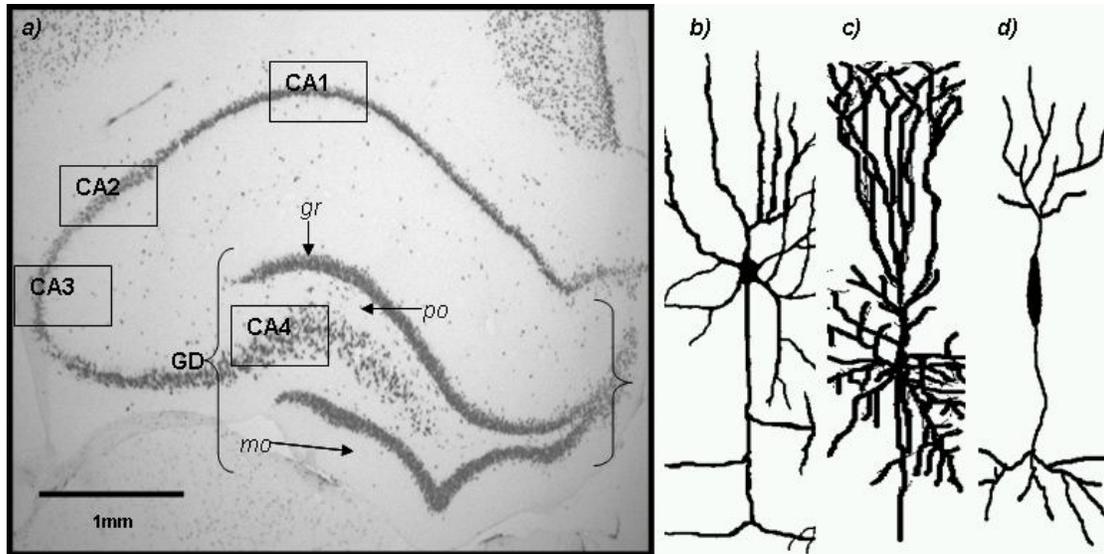


Figura 8. Microfotografía que muestra las principales regiones hipocampales. CA = Cuerno de Amonis (CA1, CA2, CA3 y CA4) formada principalmente por células piramidales (c) y GD= dentado. Diferentes tipos celulares contenidos en el hipocampo: gr = capa de células granulares (b), po = capa de células polimórficas, que incluye células piramidales (c) y, mo = capa molecular que incluye células fusiformes (d).

1.2.6 Papel funcional del hipocampo

El caso de Henry Gustav Molaison (1926-2008), mejor conocido como el paciente HM, fue importante en el descubrimiento de las funciones del hipocampo, ya que con el fin de evitar las crisis epilépticas recurrentes que presentaba como resultado de un accidente en bicicleta a los 9 años de edad, se le extirpó bilateralmente la amígdala y las regiones de asociación multimodal de la corteza temporal. Se observó que al remover estas regiones, se alteraban los procesos mnémicos, el paciente solamente era capaz de formar memorias a corto plazo, es decir, memorias con duración de entre segundos y horas (Scoville y Milner 1957). Su capacidad de consolidación era nula, por tanto no podía formar memorias a largo plazo, aunque podía recordar lo aprendido

antes de la cirugía. A esta afección se le conoce como amnesia anterógrada. Desde entonces se han hecho muchos estudios sobre el hipocampo en donde se ha demostrado que esta estructura está involucrada en el sistema de activación ascendente, que tiene también un papel importante en funciones críticas de consolidación y establecimiento de la memoria declarativa, siendo el soporte para el aprendizaje asociativo (Kandel et al., 2000). También se ha visto que participa en tareas emocionales, el control atencional, la memoria y la modulación de la respuesta al estrés (Andersen et al., 2007). En la rata, se ha visto que el hipocampo codifica la información espacial del ambiente donde se encuentra el animal al crear un mapa cognitivo de dicho ambiente, ese mapa provee al animal de información acerca de su localización en el entorno (Rosenzweig y Barnes 2003).

1.2.7 Hipocampo y estrógenos

Las hormonas esteroides tiene en común que su precursor metabólico es el colesterol, que son hormonas lipófilas que atraviesan libremente la membrana plasmática y se unen a un receptor citoplasmático, y, que el lugar de acción de este complejo receptor-hormona es el ADN, lo que provoca la activación de genes o la modulación de la transcripción del ADN. Existen cinco categorías de hormonas esteroides: 1) Progestinas, 2) Glucocorticoides (cortisol y corticosterona), 3) Mineralocorticoides (aldosterona), 4) Andrógenos (testosterona, di-hidrotestosterona, androsterona, etc) y 5) Estrógenos (estradiol, estriol, estrona). Los principales estrógenos son el 17 β -estradiol y el estriol, se sintetizan a partir de los andrógenos y son secretados por los ovarios, se producen en los folículos en crecimiento aunque también se sintetizan en SNC.

El laboratorio del Dr. McEwen ha documentando la presencia de receptores a estrógenos (ERs) alfa y beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$) en el hipocampo, tanto en axones como en terminales axónicas y espinas dendríticas (McEwen y Alves, 1999; McEwen y Milner, 2007). Se sabe que hay una vinculación entre el aumento de los ERs en dicha estructura, los niveles de estrógenos en plasma y la espinogénesis en diversas etapas del ciclo estral. Se sabe también que aumenta la densidad de espinas dendríticas y la sinápsis axoespinosa durante la fase tardía del pro-estro cuando el nivel circulante de esta hormona es mayor

(Gonzalez-Burgos et al., 2005 y McEwen, 2009). A la par del incremento de los ERs, los receptores glutamatérgicos NMDA también se ven incrementados lo cual influye en la excitabilidad neuronal del hipocampo (Adams y Morrison, 2003). Se sugiere que las acciones del estradiol sobre los receptores NMDA están asociadas con el cambio en la transmisión sináptica de las neuronas del área CA1 en ratas ovariectomizadas, ya que al incrementar la corriente dependiente de Ca^{2+} ocurre una facilitación de algunos procesos fisiológicos como el LTP, el aprendizaje y la memoria (Osterlund et al., 1998).

Por otra parte, se ha encontrado que la memoria espacial se ve afectada en animales con deficiencia estrogénica experimental (McEwen y Alves, 1999). En mujeres post-menopáusicas bajo tratamiento de sustitución hormonal con estrógenos, se observa una mejoría en funciones cognitivas como la memoria verbal de corto y largo plazo (Frye et al., 2005). Además, el estradiol mitiga las deficiencias en aprendizaje y memoria relacionadas con el envejecimiento (Gatewood, 2005). Se ha atribuido a los estrógenos otros efectos protectores como la disminución de los radicales libres, la remielinización, la anti-inflamación, como agentes tróficos durante la maduración del SNC, como reguladores de síntesis de proteínas protectoras contra agentes apoptóticos, en el control de la microglía reactiva y la función vascular, mecanismos que pueden inducir proliferación celular para reemplazar las neuronas apoptóticas, además de su efecto como inductores de la espinogénesis (McEwen y Alves, 1999).

1.2.8 Hipocampo y glutamato

Como mencioné antes, la excitotoxicidad es la muerte celular causada por la sobre-activación de receptores excitatorios. El ácido kaínico, al ser un agonista glutamatérgico puede unirse a los receptores AMPA, kainato y NMDA ampliamente distribuidos en el cerebro, causando daños electrofisiológicos y conductuales (Vincent y Mulle, 2009). Diversos estudios han reportado que el hipocampo es una estructura altamente susceptible a AK dada la abundante distribución de receptores a glutamato, en particular las áreas CA1, CA3 y GD (Collins et al., 1980; Dinkel et al., 2003; Ben-Ari y Cossart, 2000; Tomita 2007). Los receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA y kainato tienen una distribución

diferencial dependiendo del nivel rostro-caudal y del área del hipocampo (Wisden 1993) (Figura 9).

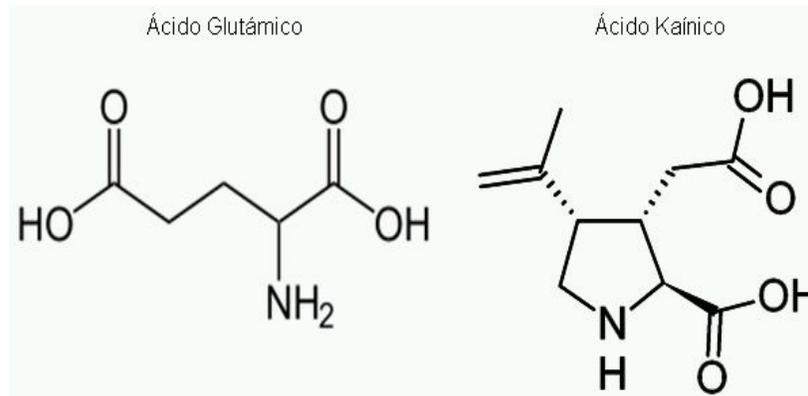


Figura 9. Moléculas de glutamato y AK. Similitud entre el ácido glutámico o glutamato y el ácido kaínico.

I.3 Modelo experimental.

I.3.1 Características generales de la rata *Wistar*.

La rata de *Wistar* ha sido utilizada para experimentación desde que a principios del siglo XX, el investigador HH Donaldson en el Instituto *Wistar* de Estados Unidos la seleccionó y le asignó el nombre científico (“*Ico: WI (IOPS AF/Han)*”). Es una rata albina, de tamaño medio, muy resistente, dócil y fácil de manipular. Se le considera un animal polivalente desde el punto de vista experimental, con una vida media larga que la hace especialmente útil en estudios de supervivencia de patología tumoral y de técnicas estereotáxicas cerebrales así como de cirugías en general, por ejemplo los trasplantes, la perfusión, la cateterización, la hipofisectomía, la adrenalectomía, la tiroidectomía, la pinealectomía, la orquidectomía y la ovariectomización, entre muchas otras (Figura 10).

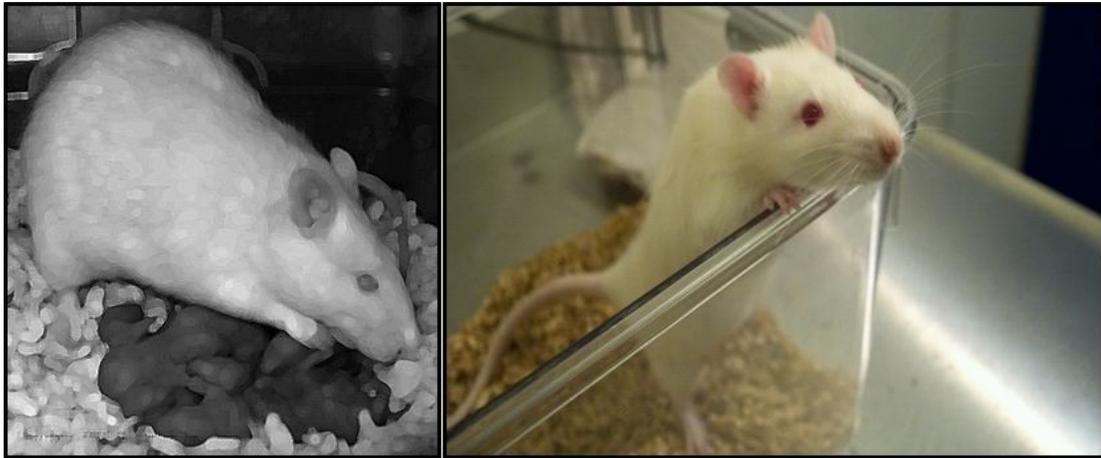


Figura 10. Rata Wistar mantenidas en condiciones estándar en el Bioterio del INB, UNAM. Bajo las normas de la Guía para el Cuidado y Uso de Mamíferos en la Investigación en Neurociencias y Conducta y, del Comité de Bioética del INB. (Foto proporcionada por Edgar Morales, publicada en nekrum.net).

1.3.2 Justificación del uso de nuestro modelo experimental

En nuestro laboratorio se han investigado diversos mecanismos neuroendócrinos y fisiológicos de la rata en condiciones de maternidad. Durante esta etapa, la rata madre presenta ciertas particularidades, por ejemplo, durante el embarazo y la lactancia incrementa su ingesta de alimento y agua para cubrir las necesidades energéticas y metabólicas que su condición demanda, se dan ajustes en la conducta, principalmente en la conducta materna, y se modifica la respuesta emocional. En parte, estas adaptaciones se deben a la fluctuación en los niveles hormonales, como de las hormonas esteroides (estradiol, progesterona y corticosterona), y en hormonas peptídicas (oxitocina y prolactina). También, la succión provee una importante estimulación aferente que regula varias de estas funciones. Estudios previos de nuestro grupo han documentado que durante la lactancia, el hipocampo de la rata madre es resistente al daño excitotóxico inducido por ácido kaínico (Vanoye-Carlo et al., 2008; Cabrera et al., 2009). Por lo que la lactancia es un modelo fisiológico para el estudio de la plasticidad cerebral relacionada con mecanismos de neuroprotección.

II. ANTECEDENTES

II.1 Hormonas

II.1.1 Hormonas y ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo de la rata hembra tiene varias etapas, la primera de ellas inicia con la pubertad que ocurre entre los 21 y 30 días de edad (Mann y Bridges, 2001), cuando ésta se desencadena, la rata comienza a desplegar ciclicidad en la capacidad de reproducirse, es decir, inicia el **ciclo estral** cuya duración es de entre 4 y 5 días, se divide a su vez en cuatro fases que se identifican por la morfología de las células vaginales típicas de cada fase, éstas fases son *Diestro*, en donde observamos escasas células nucleadas y algunos leucocitos; *Proestro*, con células nucleadas y ausencia de leucocitos; *Estro*, que muestra células cornificadas (escamosas, sin núcleo) y presencia de mucus, la ovulación ocurre aproximadamente 10 horas después del comienzo de esta fase, la receptividad dura alrededor de 13 horas y entre 10 y 20 óvulos son liberados cada vez; y *Metaestro*, con células cornificadas y abundancia de leucocitos. Durante el ciclo estral de la rata, los niveles hormonales también fluctúan. Existen hormonas que determinan los cambios a lo largo del ciclo estral; por ejemplo, en el Estro, los niveles séricos de progesterona (P) oscilan entre 5ng y 50ng/ml y los de estradiol (E) entre 10 y 40pg/ml (Freeman 1994). Además de las hormonas esteroides (estrógenos y progesterona) la hormona luteinizante (LH), la hormona liberadora del folículo (FSH) y la prolactina (PRL) son susceptibles a cambios (*Figura 11*).

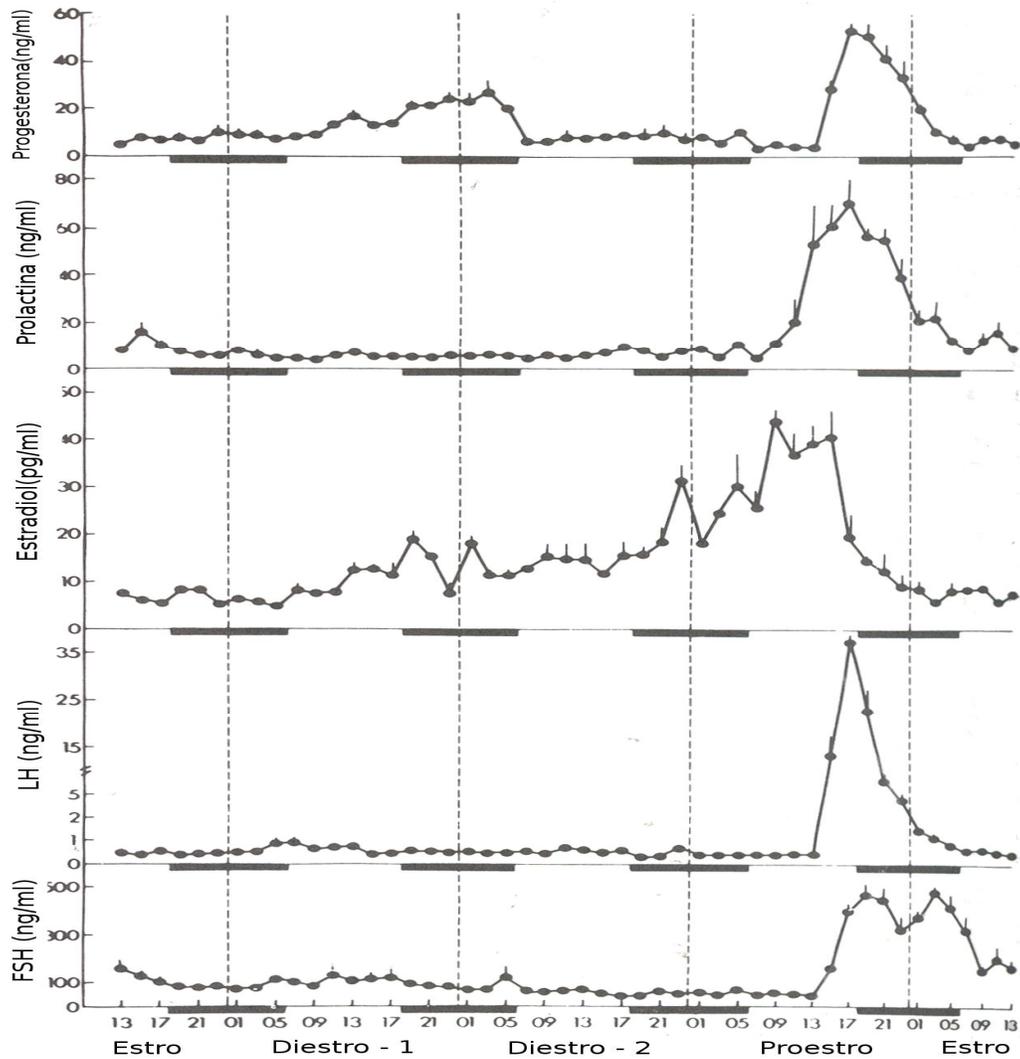


Figura 11. Niveles hormonales en ciclo estral. Concentraciones de progesterona, prolactina, estradiol, hormona luteinizante, y hormona folículo estimulante en niveles plasmáticos periféricos obtenidos a intervalos de dos horas a través de los cuatro días del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la concentración promedio hormonal de cinco o seis ratas. Las barras negras representan la fase oscura del día para el animal (0600-1800) y los números debajo representan el tiempo del día en un ciclo de 24 horas.

Otra de las etapas de ciclo reproductivo es el **apareamiento**, alrededor de esta etapa se despliegan diversas modificaciones que tienen como objetivo la cópula y la fecundación que darán lugar a un nuevo individuo. Los cambios celulares en las distintas fases del ciclo estral indican que los estrógenos tienen un marcado efecto sobre la mucosa vaginal contribuyendo con la proliferación y diferenciación celular. Durante el estro y el proestro es cuando los niveles de estrógenos y progesterona presentan su pico más alto (40pg/ml de sangre), el estradiol parece estar asociado

a la receptividad (reflejo de lordosis), y la progesterona (50ng/ml) a las conductas preceptivas (movimiento de orejas, desplazamiento en zig-zag, brincoteos y vocalizaciones ultrasónicas). Todo esto mediado por las hormonas y que tiene como objetivo la cópula y la fecundación que darán lugar a otra de las etapas reproductivas, **la gestación**. Las principales fuentes de secreción hormonal en la rata durante la etapa de gestación son la hipófisis anterior, los ovarios y la unidad feto-placentaria (Hilliard et al., 1973). La gestación, que en la rata tiene una duración de alrededor de un mes, en esta etapa, tanto las hormonas esteroides, como las lactogénicas (prolactina y lactógeno placentario) incrementan en esta etapa. Ya que están involucradas en el despliegue de la conducta materna. Después de la concepción el ovario de la rata es la principal fuente de estradiol y progesterona. La concentración de estradiol incrementa uniformemente durante el embarazo, alcanzando su pico más alto justo antes del parto (Rosenblatt et al., 1987). En cambio, la progesterona incrementa rápidamente luego de la cópula y se mantiene en una meseta en la gestación temprana (día 7-10), volviendo a incrementar a otra meseta para el día 15 (15-20) y declinando dramáticamente poco antes de llegar término el embarazo (Figura 12).

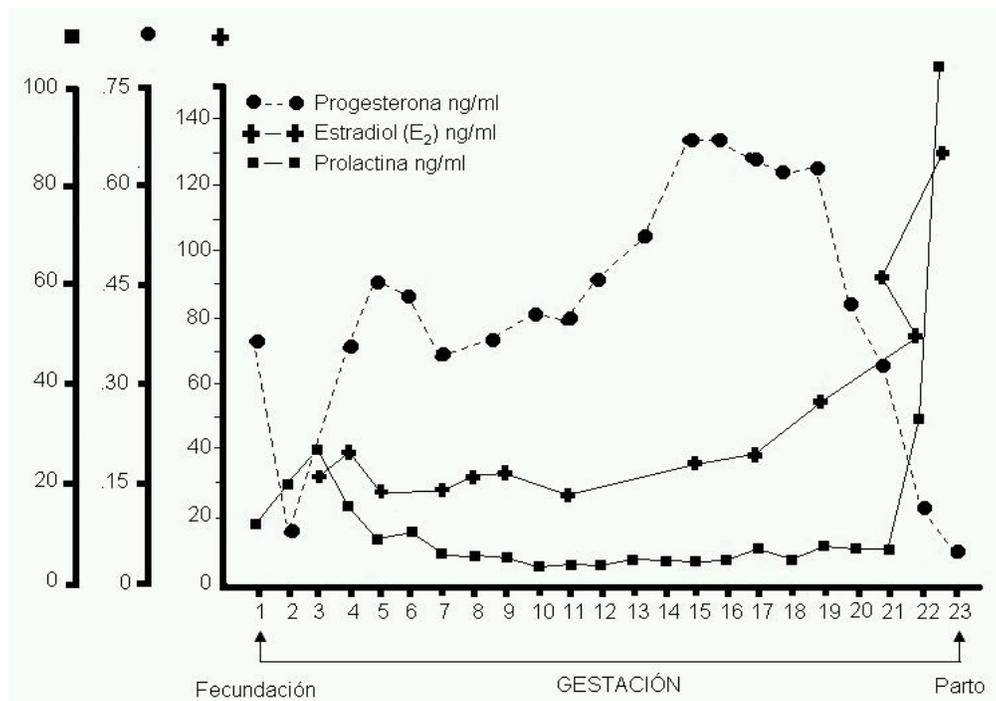


Figura 12. Niveles hormonales en gestación. Se observan las fluctuaciones en las hormonas Progesterona, Estradiol (E₂) y Prolactina (PRL), durante la gestación de la rata.

Otra hormona que fluctúa en el embarazo es la prolactina (PRL), en la primera mitad del embarazo muestra una secreción rítmica con dos picos, uno diurno y otro nocturno; a la mitad del embarazo, cuando se comienza secretar lactógeno placentario I y II, la secreción de PRL se suprime y permanece baja hasta un día antes del parto (Mann y Bridges, 2001). Cuando la gestación se acerca a su final, la distensión cervical estimula la liberación de oxitocina proveniente de la adenohipófisis. Esta hormona induce contracciones de la musculatura uterina, proceso crítico para el parto. Después del parto los niveles de progesterona disminuyen lo que hace que se active la maquinaria sintetizadora de leche, permitiendo el inicio de la siguiente etapa, la **lactancia**. La producción de leche está mediada por PRL, que en esta etapa, alcanza su nivel de secreción más alto (250-300 ng/ml), hormona de crecimiento (GH) y glucocorticoides y la eyección de leche está regulada por la oxitocina y por la vasopresina. El reflejo de succión promueve que se liberen tanto la oxitocina como la PRL, a través de un asa de retroalimentación en donde la misma PRL va a actuar como neuromoduladora de su propia expresión (Svennersten-Sjaunja y Olsson, 2005). (Figura 13).

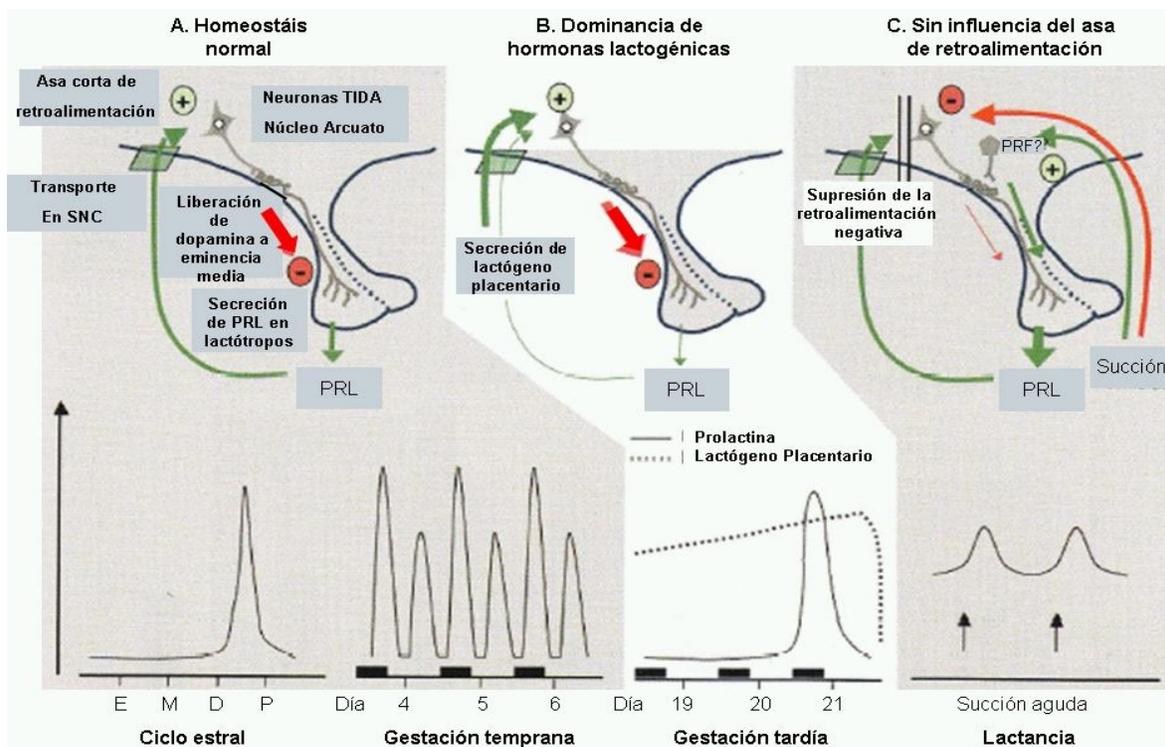


Figura 13. Secreción de prolactina. Patrones de secreción de prolactina (PRL) en ratas ciclantes (A), gestantes (A y B) y lactantes (C).

Las hormonas involucradas en la coordinación de los cambios propios de la maternidad pueden agruparse en tres categorías: las hormonas *reproductivas* (estrógenos, progesterona, lactógeno placentario, prolactina y oxitocina), las hormonas *metabólicas* (hormona de crecimiento, corticoesteroides, hormonas tiroideas e insulina), y las hormonas *mamarias* (hormona de crecimiento, prolactina, péptido relacionado con la hormona paratiroides y leptina). Todo este complejo hormonal influye en los cambios cerebrales a varios niveles. Conductualmente, el animal incrementa la ingesta de alimento y agua, así como la agresión hacia depredadores o amenazas ambientales, asimismo incrementa el cuidado maternal hacia las crías y, disminuye la conducta tipo ansiedad. Por otra parte, a nivel neuroendócrino y fisiológico se suprime la fertilidad, disminuye la respuesta neuroendócrina al estrés y, aumenta la concentración en los niveles de prolactina y oxitocina lo que a su vez provoca la producción y evacuación de leche (Neville et al., 2002). Para el propósito de este trabajo de tesis, revisaré con mayor detalle aspectos varios sobre la prolactina.

II.1.2 Funciones de la prolactina (PRL)

Aunque existe una familia de prolactinas provenientes del mismo gen, la forma molecular más estudiada y la más predominante es una proteína de 23,000 daltones (PRL-23K), que consiste en una cadena polipeptídica de 197-199 aminoácidos (aa), según la especie. La PRL inicia sus efectos al inducir la dimerización de sus receptores en la membrana de sus células blanco, lo cual activa la vía JAK/STAT (Jannus Kinases / Signal Transduction and Activator of Transcription). Las JAK son una familia de tirosinas cinasas capaces de fosforilar a los factores de transcripción STAT. La fosforilación de STAT permite su translocación al núcleo y su unión subsecuente a secuencias consenso en el ADN, llamadas GAS (Gamma Activation Site) lo que permite la transcripción de diversos genes (Bole-Feysot et al., 1998) (*Figura 14-b*). Esta PRL se ha visto implicada, dependiendo de su concentración, en un gran número de funciones, forma parte del complejo que determina la lactancia, actúa en conjunto con los estrógenos, la

progesterona y la hormona de crecimiento (GH) estimulando la diferenciación y el crecimiento glandular mamario así como secreción de leche en dicha glándula (Clapp et al., 1987). También se ha visto que la PRL a bajas dosis estimula el funcionamiento gonadal tanto en machos como en hembras, en machos incrementa y mantiene el número de receptores a la hormona luteinizante (LH) en las células de Leydig, que sostienen la secreción de testosterona en el testículo (Aragona et al., 1977); en la hembra, contribuye a la proliferación del cuerpo lúteo y regula la densidad de receptores a LH lo que favorece la secreción de progesterona (Richards et al., 1976). Conductualmente, influye sobre el proceso reproductivo, siendo el final de la gestación y la lactancia las etapas en donde los niveles de ésta hormona presentan su pico más alto (~250-300ng/ml), lo que provoca que se inhiba la conducta sexual y se despliegue la conducta maternal (Drago, 1984; Bridges 1995). Además es osmorreguladora ya que mantiene las diferencias entre la composición iónica de la leche y la del plasma sanguíneo a través de la regulación del transporte activo de iones en la membrana basal del epitelio mamario (Shiu et al., 1980); esta acción osmorreguladora ocurre en el epitelio renal y también resulta esencial para la vida de algunos vertebrados acuáticos por que ayuda a mantener el balance hídrico y electrolítico estimulando la retención de sodio en los fluidos y evitando la disolución del medio interno cuando los peces pasan de agua salada a dulce (Nicoll, 1980). También se ha sugerido que la PRL regula la composición del líquido amniótico fetal (Hernández-Andrade 2005), la absorción de fluidos en el intestino delgado (Dusanter-Fourt et al., 1992; Takayanagi et al., 2009), el ciclo sueño-vigilia, la conducta de acicalamiento, la actividad motora, la analgesia y la temperatura corporal. Se ha observado en neuronas de diversas regiones cerebrales síntesis de esta hormona (RNA_m), así como inmunorreactividad y existencia de sitios de unión a la PRL. Se sabe que puede actuar como citocina mediando la comunicación funcional entre células del sistema inmune, como coactivador al interactuar con otras citocinas (Clevenger et al., 1991) o como potenciadora de la proliferación de células NK (natural killer) (Miller, 2001). La PRL se secreta ante ejercicio, sueño, estrés,

aunque la succión es el estímulo que la incrementa de manera exacerbada (Figura 14-a).

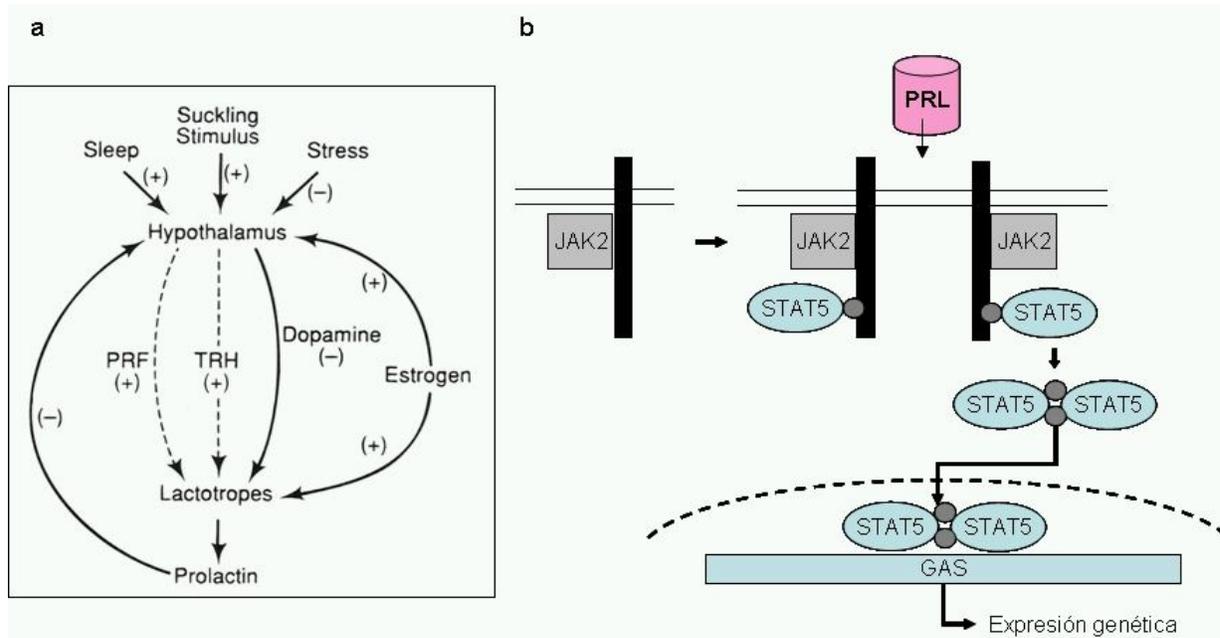


Figura 14. Activación de prolactina. Muestra algunos estímulos desencadenadores de secreción de PRL y el asa de retroalimentación de esta hormona (a), así como la cascada de señalización de la PRL (b).

II.1.3 Tejidos productores de prolactina

La PRL es producida principalmente en la adenohipófisis o glándula pituitaria anterior, por unas células conocidas como lactótrofos en la (Frawley, 1998). La producción de esta hormona fue considerada por mucho tiempo exclusiva de esta glándula. Sin embargo, su síntesis se ha demostrado en una gran variedad de tejidos no pituitarios que incluyen al sistema nervioso central, al sistema inmune, a la placenta, a la glándula mamaria, a la glándula lacrimal, al timo, a los nódulos linfáticos, a las glándulas sudoríparas, al bazo, a los fibroblastos, al miometrio, a la decidua uterina, al hueso y al endotelio vascular, entre otros (Ben-Jonathan et al., 1996; Grattan, 2001). En particular, a nivel SNC, se ha observado que los antígenos tipo PRL se localizan en neuronas del hipotálamo (área preóptica medial, núcleo supraóptico, núcleo arqueado, núcleo paraventricular y núcleo ventromedial), además de en estructuras límbicas (lecho del núcleo de la estría terminalis, núcleo medial de la amígdala, en la habénula, plexos coroideos,

corteza cerebral e hipocampo) donde también se ha localizado a su receptor (Bakowska y Morrell, 1997; Pi y Grattan, 1998 y Nogami et al., 2007). El hecho de que la PRL se sintetice en el SNC abre la posibilidad de que, además de la PRL periférica, también la PRL central tenga efectos a ese nivel (Figura 15).

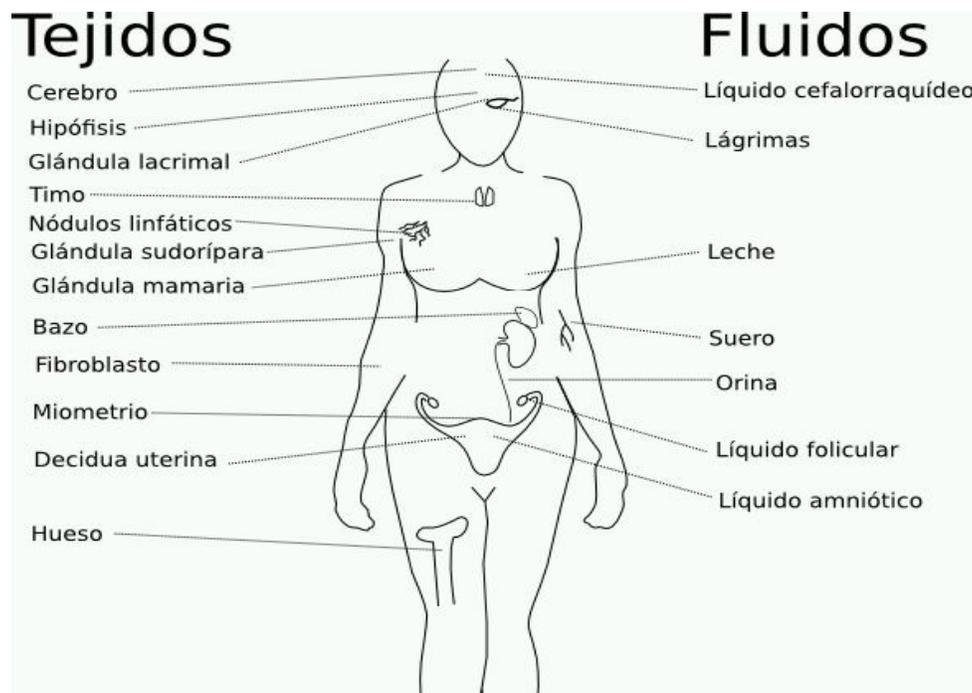


Figura 15. Esquema que muestra los tejidos y fluidos en donde se produce prolactina (PRL).

II.1.4 Receptor de prolactina (PRLR)

Siendo una hormona polipeptídica relativamente larga (cadena de 197-199 aminoácidos) se podría esperar que la PRL no tuviera acceso al SNC en áreas que tienen la barrera hematoencefálica, pero existe evidencia de que la PRL sistémica tiene acceso al líquido cefalorraquídeo (LCR) desde donde puede difundir a diversas regiones del cerebro. Los niveles de PRL en el LCR fluctúan en paralelo con los niveles de PRL en plasma. Al parecer, el paso de la PRL al LCR involucra un proceso mediado por un transportador que contiene receptores localizados principalmente en los plexos coroideos (Posner et al., 1983; Mangurian et al., 1992). Se ha propuesto que el sitio de unión es en las células epiteliales del plexo coroideo, ya que contiene capilares fenestrados que podrían permitir el acceso a dichas células, mismas que poseen los receptores a PRL. Esto fue probado al inyectar PRL marcada con yodo radioactivo por vía endovenosa y

observando los sitios de unión de la hormona radioactiva en los plexos (Walsh, 1987; Nogami, 2007). Sin embargo, como mencioné previamente, se sabe que esta hormona también se puede producir localmente en diferentes áreas cerebrales.

En ratas y ratones, existen tres isoformas del receptor de PRL (PRLR), la larga, la intermedia y la corta. El primero de ellos fue clonado del ovario de rata y se sabe que codifica para una proteína de 591 aa. (Kelly et al., 1991) provenientes de un mismo gen y con porciones extracelulares idénticas pero capaces de activar dos diferentes vías de señalización, siendo la forma larga del receptor, la responsable para la producción de leche (Grattan, 2001). Se ha observado la expresión del PRLR a nivel central, además de en la adenohipófisis, en las células epiteliales de los plexos coroideos, en hipotálamo, en la corteza y en el hipocampo (Nogami et al., 2007). La distribución en la expresión del PRLR varía según el ciclo estral, la gestación y la lactancia; se ha visto que su expresión se incrementa al final de la gestación y durante la lactancia, en el área preóptica medial, en el núcleo arqueado y en otros núcleos hipotalámicos (PVN, SO y VM) (Bakowska y Morrell, 1997; Edery, 2001; Grattan, 2001; Torner y Neuman, 2002) (Figura 16).

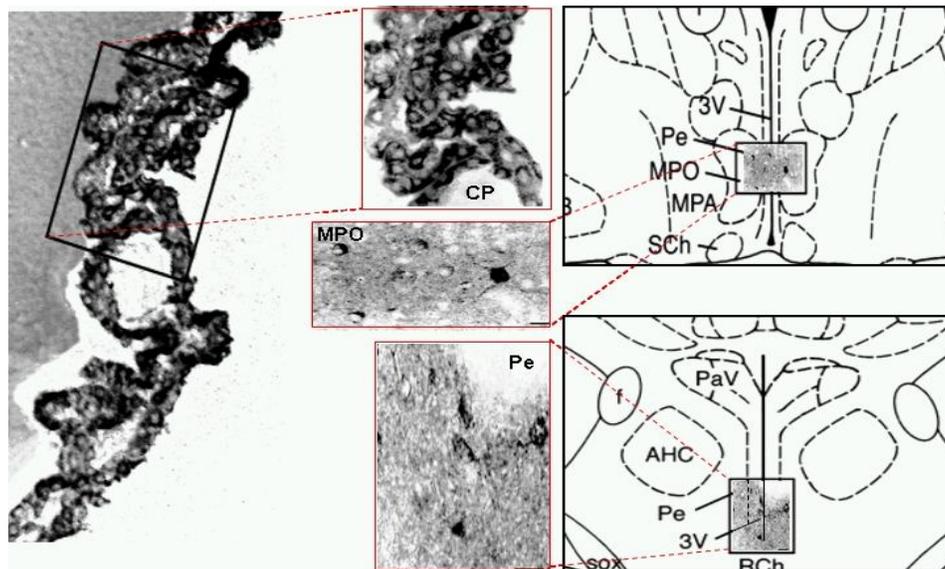


Figura 16. Receptor de prolactina (PRLR). Algunas estructuras cerebrales inmunorreactivas al PRLR: CP= plexos coroideos, MPO= n. preóptico medial y Pe= n. periventricular hipotalámico; 3V= tercer ventrículo, MPA= área preóptica medial, SCh= n. supraquiasmático, PaV= n. paraventricular hipotalámico, AHC= área hipotalámica central anterior, RCh= área retroquiasmática y f= fornix. (Esquema modificado de Pi y Grattan, 1998).

II.1.5 Acciones centrales de la prolactina

Además de todas estas acciones, la PRL tiene acciones centrales relacionadas con la conducta maternal (Neville et al., 2002); se secreta centralmente en respuesta a la succión y al estrés y su expresión hipotalámica está aumentada durante la gestación y la lactancia (Torner y Neumann, 2002). La PRL actúa sobre el núcleo paraventricular hipotalámico incrementando la ingesta de agua y alimento y regulando a la baja la magnitud de la respuesta al estrés a través del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (eje HPA), también se ha reportado que la PRL incrementa la secreción de oxitocina en respuesta al estrés, que inhibe la secreción de gonadotropinas y que también actúa sobre las neuronas dopaminérgicas del hipotálamo que son cruciales para el mantenimiento de la lactancia dado que la dopamina es el principal inhibidor de la síntesis y secreción de esta hormona; además incrementa las conductas agresivas que tienen como objetivo proteger a las crías de amenazas externas (Grattan, 2001).

Como mencionamos antes, existen múltiples acciones biológicas de la PRL, se han descrito más de 100 distribuidas en varios niveles como metabólico, reproductivo, osmótico, inmune, etc. Recientemente se le ha atribuido una más, la de ejercer una acción neuroprotectora en el SNC al favorecer la supervivencia celular en ratones expuestos a estrés crónico (Torner et al., 2009).

II.1.6 La acción neuroprotectora de la prolactina

Una de las acciones centrales de la PRL, a la que se ha dado mucha atención recientemente, es la que se ha visto en respuesta al estrés. Por una parte, se ha visto que la administración crónica intracerebral de PRL bloquea la activación neuronal inducida por estrés por inmovilización, en las áreas CA3 y GD, en este trabajo se sugiere que la expresión reducida de c-Fos en el hipocampo ventral en condiciones basales puede deberse a que la PRL modula la entrada de información aferente al hipocampo (Donner et al., 2007). Por otra parte, también, Torner y colaboradores han encontrado que la PRL previene los efectos nocivos del estrés crónico sobre el hipocampo, esto lo descubrió trabajando con ratones estresados crónicamente por inmovilización, sabiendo que los ratones bajo este

tipo de estrés muestran pérdida de peso corporal, incremento del tamaño de las glándulas adrenales, reducción del peso del timo, aumento en los niveles de corticosterona y decremento de células de formación reciente en el GD; decidió aplicales dosis diarias de PRL y encontró que se previenen los efectos dañinos del estrés, lo que se reflejó en una menor pérdida de células del GD (Torner et al., 2009).

Además de estos dos antecedentes, en nuestro laboratorio se encontró que la rata lactante, que presenta niveles de PRL muy altos, muestra neuroprotección ya que si se le administra sistémicamente una dosis de AK, la pérdida de neuronas en las áreas CA1, CA3, CA4 y GD del hipocampo dorsal, será en comparación con ratas en fase de diestro en las que se observó una importante pérdida de neuronas, principalmente de células piramidales en CA1. Dado que la lactancia es un estado fisiológico hiperprolactinéxico, es un modelo natural de neuroprotección y se puede plantear que la PRL tiene acciones importantes en este fenómeno (Grattan, 2001; Vannoye-Carlo et al., 2009).

II.2 Neuroplasticidad en el hipocampo durante la maternidad

El hipocampo forma parte del sistema límbico, y entre sus funciones están la integración de procesos afectivos y cognitivos. Los cambios morfológicos del cerebro materno en áreas relacionadas con la fisiología de la lactancia, como el hipotálamo, incluyen cambios en el volumen celular del área preóptica medial (Keyser-Marcus et al., 2001), y una reorganización de las neuronas oxitocinérgicas de los núcleos supraóptico y paraventricular durante el embarazo y la lactancia. En el hipocampo se han reportado cambios asociados con la maternidad como la disminución de la tasa de neurogénesis (Furuta y Bridges, 2005; Leuner et al., 2007), y el aumento en la densidad de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo (Kinsley et al., 2006; Pawluski y Galea, 2006). Paralelamente a esta reorganización hipocampal, se observa la potenciación de las funciones cognitivas de aprendizaje espacial y de memoria y una disminución de marcadores de envejecimiento neuronal (Gatewood et al., 2005).

II.2.1 Acido kaínico e hipocampo

Se conoce ampliamente que el glutamato es un neurotransmisor excitatorio que participa en fenómenos de plasticidad cerebral en el SNC y que tiene un papel muy importante en procesos de aprendizaje y memoria (Lerma et al., 1997; Arundine y Tymianski, 2003). Este neurotransmisor también está involucrado en el desarrollo de desórdenes neurológicos como el Alzheimer y la enfermedad de Huntington, la epilepsia, la esclerosis amiotrófica lateral y se ha visto implicado igualmente en la muerte celular inducida por hipoxia e isquemia (Anborgh et al., 2005; Hynd et al., 2004).

Como ya se mencionó previamente, el agonista cíclico del glutamato, el ácido kaínico (AK), puede despolarizar tanto a neuronas pre-sinápticas como post-sinápticas a través de su interacción con receptores ionotrópicos de tipo kainato y AMPA. La administración sistémica de AK a roedores le produce un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno, afecta la función mitocondrial e induce muerte celular por vía necrótica y apoptótica. El efecto del AK sobre el SNC se ha estudiado particularmente en la región hipocampal tanto *in vivo* como *in Vitro*; estos estudios han reportado que las regiones hipocampales CA1 y CA3 así como el giro dentado (GD) son particularmente sensibles a la excitotoxicidad inducida por AK (Lee y Choi, 1992; Ben-Ari y Cossart, 2000; Frerking y Nicoll, 2000; Palomero-Gallagher et al., 2003).

Las hormonas esteroides son importantes en la inducción y prevención del daño por excitotoxicidad. Se sabe que las hormonas esteroides ováricas generan un amplio espectro de respuesta celular en SNC; estas hormonas ováricas actúan a través de un mecanismo genómico por vía de su interacción con receptores nucleares y a través de un mecanismo no genómico por su acción directa sobre sistemas membranales de transducción (Mellon y Griffin, 2002; Hoffman et al., 2006). Por otra parte, los glucocorticoides como la corticosterona pueden exacerbar la muerte celular inducida por glutamato en neuronas del hipocampo (Goodman et al., 1996; Roy y Sapolsky, 2002), ya que niveles altos crónicos de corticosterona aceleran y exacerban la neurotoxicidad inducida por AK en el área hipocampal CA3 (Dinkel et al., 2003).

II.2.1 Acido kaínico e hipocampo de la rata lactante

Los aminoácidos excitatorios han sido usados como herramientas en el estudio de la actividad del SNC durante la lactancia y se ha detectado un déficit de la expresión de c-Fos que ocurre en respuesta al ácido N-metil D,L-aspartico (NMDA), pero no para AK (Abbud et al., 1994) en la corteza y el hipocampo de la rata. Como se mencionó previamente, la administración sistémica o intracerebral de AK se ha usado ampliamente como un modelo de epilepsia experimental, ya que este agonista glutamatérgico induce daño en áreas cerebrales implicadas en el control de las crisis convulsivas.

La frecuencia y severidad de las crisis convulsivas pueden ser afectadas por las oscilaciones hormonales. Estudios clínicos en mujeres han mostrado que los cambios en el nivel circulante de hormonas ováricas durante el ciclo menstrual, el embarazo o la lactancia pueden alterar la frecuencia de las convulsiones (Morrel, 1999). Estudios en ratas han mostrado que el embarazo reduce la frecuencia de crisis espontáneas recurrentes tipo-epilepsia en ratas con lesiones hipocampales inducidas por AK (Berzaghi Mda et al., 1987; Standley, 1999). Esto puede explicarse por se sabe que en el embarazo, disminuye la unión del glutamato al receptor de kainato (Standley, 1999). Dada esta atenuación en la respuesta funcional de los receptores de glutamato durante el embarazo y la lactancia, dichas condiciones representan modelos fisiológicos interesantes para el estudio de la participación hormonal en la prevención de la neurotoxicidad a nivel cerebral. Reportes previos de nuestro grupo han mostrado que la lactancia previene la muerte neuronal inducida por AK en el hipocampo en comparación con otra condición, como es durante la fase de diestro en el ciclo estral (Vanoye et al., 2008). Los mecanismos por los que este fenómeno se observa durante la lactancia no se conocen, pero sin duda las hormonas ováricas y la PRL tienen un papel importante en este proceso. Se conoce ampliamente al papel del estrógeno y la progesterona (Azcoitia et al., 2006; Hofman, 2003) en la neuroprotección de las neuronas del hipocampo. Por ejemplo, gracias a diversos estudios se sabe que el estradiol es capaz de modificar la excitabilidad neuronal en diversas regiones

cerebrales como el cerebelo, la corteza cerebral y las células piramidales de CA1 en el hipocampo (McEwn y Alves, 1999).

Por otro lado, estudios en ratas sobre la expresión de convulsiones en los que se ha utilizado el modelo de la pilocarpina o de crisis audiogénicas, han encontrado que hay un aumento en el nivel circulante de la PRL post ictus y han propuesto que la PRL modula la actividad convulsiva durante la lactancia (Doretto et al., 2003).

III JUSTIFICACIÓN

La maternidad ocasiona varios cambios o adaptaciones en el cerebro de la madre, mismos que son necesarios para satisfacer la demanda de la reproducción. Se ha documentado que existe neuroprotección contra daño excitotóxico inducido por AK durante la lactancia. En este fenómeno son importantes las hormonas ováricas y la regulación de los receptores glutamatérgicos, como se ha revisado previamente. Otra hormona cuya secreción está aumentada durante esta fase, es la PRL, y se sabe que, además de su acción sobre la glándula mamaria, tiene varias acciones centrales que afectan la conducta materna, la respuesta emocional, y se ha reportado que tiene efectos neuroprotectores al mantener la tasa de supervivencia de las neuronas en giro dentado y en hipocampo, además de su efecto en la regulación de la expresión de crisis convulsivas. Incluso se le ha propuesto como un agente potencial terapéutico para la remielinización. Por tanto, es importante determinar la participación de esta hormona en el proceso de neuroprotección por lo que, en este trabajo, se investigó el papel que dicha hormona pudiera tener en la neuroprotección del hipocampo contra daño excitotóxico inducido por AK.

IV. HIPÓTESIS

La presencia de PRL atenuará la neurodegeneración inducida por AK en el hipocampo dorsal de la rata.

V. OBJETIVOS

V.1 General

Determinar si la PRL tiene un efecto neuroprotector ante un daño inducido por AK en el hipocampo dorsal de la rata hembra.

V.2 Específicos

1. Determinar si la PRL tiene un efecto neuroprotector contra el daño excitotóxico inducido por AK en las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4 de ratas hembra intactas.
2. Determinar si la PRL tiene un efecto neuroprotector contra el daño excitotóxico inducido por AK en las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4 de ratas hembra ovariectomizadas.
3. Determinar si la PRL disminuye las manifestaciones conductuales tipo epilepsia causadas por un daño excitotóxico inducido con AK en ratas hembra intactas y ovariectomizadas.

VI. MATERIALES Y MÉTODO

VI.1 Animales

Los animales empleados en el presente estudio fueron 32 ratas hembra adultas vírgenes de la cepa *Wistar (Ico: WI (IOPS AF/Han))*, de entre 200-250gr de peso corporal, mantenidas bajo ciclo L:O (12:12), encendido de luces a las 06:00 AM, temperatura ambiental controlada (24 ± 2 °C), extractor de aire las 24 horas y acceso a agua y a alimento *ad-libitum (Rat Chow, Purina)*. Durante todo el experimento, las ratas fueron alojadas en cajas de acrílico transparente de 47cm x 25.5cm x 20cm (altura). La fase del ciclo estral de las ratas intactas se determinó por medio de frotis vaginal y su tratamiento con vehículo ó PRL ovina (*Prolactin, sheep pituitary gland, Sigma*) fue iniciado en la fase de diestro. La cirugía de extirpación de ovarios se detalla en el Anexo I. La distribución de las cuatro condiciones experimentales se esquematiza en la siguiente figura (Figura 17). Todas las manipulaciones a las que fueron sometidos los animales se hicieron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Mamíferos en Investigación en Neurociencias y Conducta del *National Research Council*.

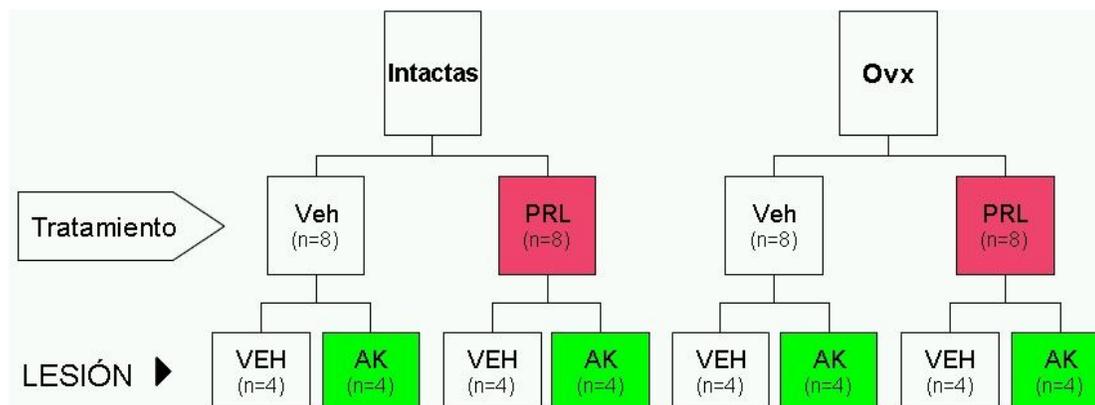


Figura 17. Condiciones experimentales. Se observa la distribución de las cuatro condiciones experimentales: 1) Veh-VEH, 2) Veh-AK, 3) PRL-VEH y 4) PRL-AK, que surgen a partir de los dos grupos experimentales, Intactas u Ovariectomizadas (Ovx); el tipo de tratamiento que recibieron, Vehículo (Veh) o Prolactina (PRL), así como el tipo de lesión que se indujo, VEHÍCULO (VEH) o ACIDO KAÍNICO (AK).

VI.1.1 Intactas (n=16)

Grupo Control:

8 ratas hembra, vírgenes, adultas de 200-250g. El experimento comenzó el día en que éstos animales se encontraban en fase diestro (D1), la fase del ciclo estral se determinó a través de frotis vaginales.

Del día uno al día cuatro experimentales (D1-D4) los 8 animales recibieron una dosis-tratamiento subcutánea (Tx) de 100µl de solución salina isotónica al 0.9%.

- Condición experimental *Veh-VEH*

El día tres experimental (D3), luego de su dosis-tratamiento, a cuatro de las 8 ratas control intactas se les sometió a una inyección-lesión (LX) con solución salina (*VEH, 7.5 mg/kg de peso corporal*).

- Condición experimental *Veh-AK*

El día tres experimental (D3), luego de su dosis-tratamiento, a cuatro de las 8 ratas control intactas se les sometió a una inyección-lesión (LX) con ácido kaínico (*AK, 7.5 mg/kg de peso corporal*). Luego de la lesión con AK éstos animales fueron registrados en video durante cuatro horas posteriores a dicha lesión.

El día 5 experimental (D5) las 8 ratas fueron perfundidas.

Grupo Experimental:

8 ratas hembra, vírgenes, adultas de 200-250g. El experimento comenzó el día en que éstos animales se encontraban en fase diestro (D1), la fase del ciclo estral se determinó a través de frotis vaginales.

Del día uno al día cuatro experimentales (D1-D4) los 8 animales recibieron una dosis-tratamiento subcutánea (Tx) de 100µl de PRL ovina a una concentración de 1mg/ml.

- Condición experimental *PRL-VEH*

El día tres experimental (D3), luego de su dosis-tratamiento, a cuatro de las 8 ratas control se les sometió a una inyección-lesión (LX) con solución salina (*VEH, 7.5 mg/kg de peso corporal, n=4*)

- Condición experimental *PRL-AK*

El día tres experimental (D3), luego de su dosis-tratamiento, a cuatro de las 8 ratas experimentales se les sometió a una inyección-lesión (LX) con ácido kaínico (*AK, 7.5 mg/kg de peso corporal, n=4*). Luego de la lesión con AK éstos

animales fueron registrados en video durante cuatro horas posteriores a dicha lesión.

El día 5 experimental (D5) las 8 ratas fueron perfundidas.

VI.1.2 Ovariectomizadas (n=16)

La cirugía para extirpar los ovarios se detalla en el Anexo 1. Un mes después de dicha cirugía se condieró el día uno experimental (D1) y se procedió como sigue:

Grupo Control:

8 ratas hembra, ovariectomizadas, adultas de 200-250g. El experimento comenzó un mes después de la ovariectomización (D1).

Del día uno al día cuatro experimentales (D1-D4) los 8 animales recibieron una dosis-tratamiento subcutánea (Tx) de 100µl de solución salina isotónica al 0.9%.

- Condición experimental *Veh-VEH*

El día tres experimental (D3), luego de su dosis-tratamiento, a cuatro de las 8 ratas control ovariectomizadas se les sometió a una inyección-lesión (LX) con solución salina (*VEH, 7.5 mg/kg de peso corporal*).

- Condición experimental *Veh-AK*

El día tres experimental (D3), luego de su dosis-tratamiento, a cuatro de las 8 ratas control ovariectomizadas se les sometió a una inyección-lesión (LX) con ácido kaínico (*AK, 7.5 mg/kg de peso corporal*). Luego de la lesión con AK éstos animales fueron registrados en video durante cuatro horas posteriores a dicha lesión.

El día 5 experimental (D5) las 8 ratas fueron perfundidas.

Grupo Experimental:

8 ratas hembra, ovariectomizadas, adultas de 200-250g. El experimento comenzó un mes después de la ovariectomización (D1).

Del día uno al día cuatro experimentales (D1-D4) los 8 animales recibieron una dosis-tratamiento subcutánea (Tx) de 100µl de PRL ovina a una concentración de 1mg/ml.

- Condición experimental *PRL-VEH*

El día tres experimental (D3), luego de su dosis-tratamiento, a cuatro de las 8 ratas control se les sometió a una inyección-lesión (LX) con solución salina (VEH, 7.5 mg/kg de peso corporal, n=4)

- Condición experimental PRL-AK

El día tres experimental (D3), luego de su dosis-tratamiento, a cuatro de las 8 ratas experimentales se les sometió a una inyección-lesión (LX) con ácido kaínico (AK, 7.5 mg/kg de peso corporal, n=4). Luego de la lesión con AK éstos animales fueron registrados en video durante cuatro horas posteriores a dicha lesión.

El día 5 experimental (D5) las 8 ratas fueron perfundidas.

El diseño experimental que se siguió para ambos grupos se esquematiza en la siguiente figura (Figura 18).

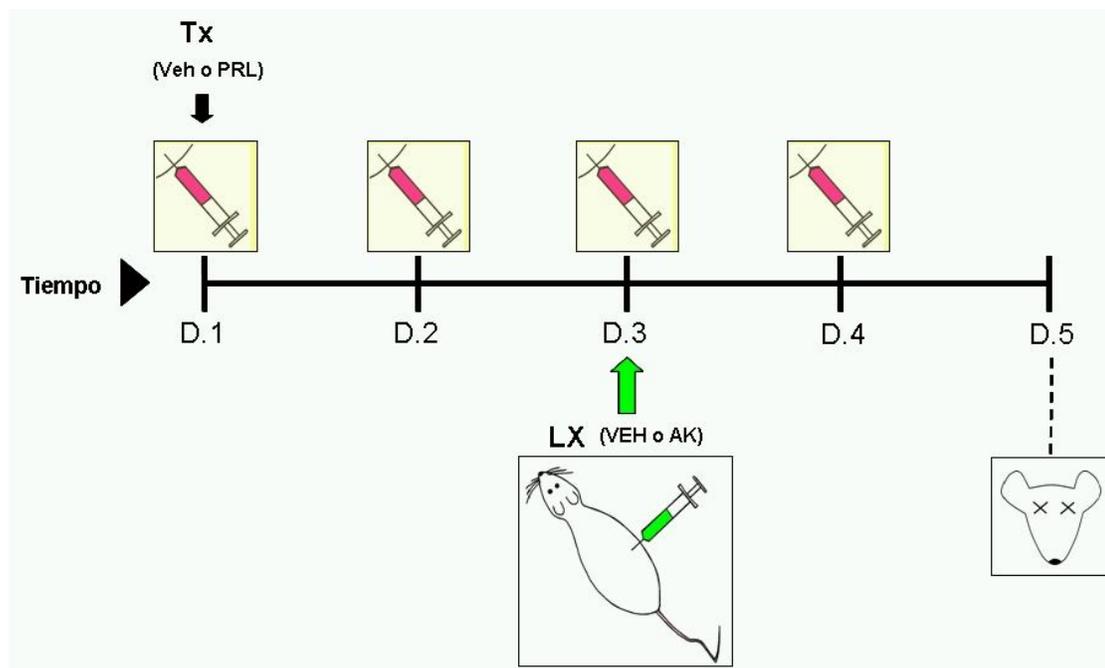


Figura 18. Diseño experimental. Esquema de aplicación del tratamiento y lesión (Tratamiento-LESIÓN) en las cuatro condiciones experimentales: a) Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), b) Vehículo-ÁCIDO KAÍNICO (Veh-AK), c) Prolactina-VEHÍCULO (PRL-VEH) y d) Prolactina-ÁCIDO KAÍNICO (PRL-AK), a lo largo del tiempo (D1-D4), así como la duración del experimento (D1-D5) y el día en que se perfundió a los animales (D.5).

VI.2 Obtención y Procesamiento del Tejido

VI.2.1 Perfusión

Cuarenta y ocho horas después de la inyección con AK o VEHÍCULO, se perfundió a los animales con 250 ml de solución salina isotónica (0.9%) seguido de 250 ml de PBS (buffer fosfatos, *Sigma*) con PAF (paraformaldehído, *Sigma*) al 4% (pH 9.5, 10°C). Posteriormente los cerebros se removieron y se fijaron en PAF 4% durante toda la noche, al día siguiente, para su crioprotección, se suspendieron en PBS con un gradiente de sacarosa al 10% el primer día, al 20% el segundo día y al 30% el tercero, manteniendo siempre el tejido en refrigeración a (4°C). Este último día ya no se precipitó el tejido, lo que indicaba que se podían obtener los cortes y comenzar con los siguientes protocolos de histología: Inmunohistoquímica para PRLR, Tinción de Nissl, Inmunohistoquímica para Neu-N y Fluoro Jade C (*Figura 19*).

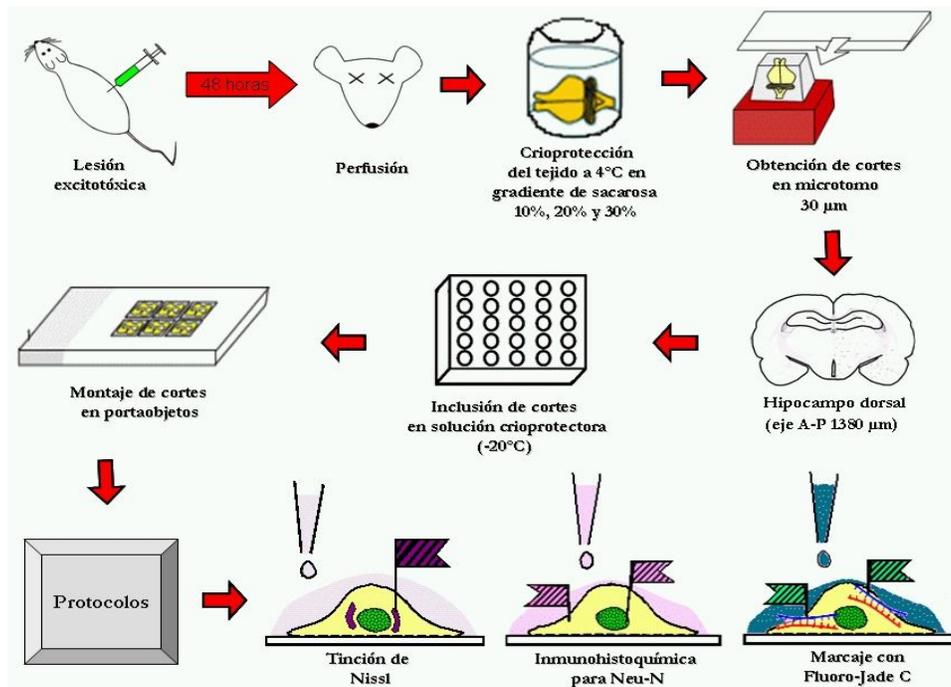


Figura 19. Procesamiento del tejido. Sucesión de pasos a los que se sometió el tejido a partir de la inducción de la lesión excitotóxica para obtener los parámetros de cuantificación de células y de píxeles.

VI.2.2 Obtención de Cortes

Se hicieron cortes coronales de 30 µm de espesor del hipocampo dorsal con un microtomo de congelación. Los cortes de todo el hipocampo dorsal (1380µm)

se colectaron en 5 series, en una caja estéril para cultivo (*Costar*) (6x5 pozos) a modo de tener una serie representativa del hipocampo dorsal en cada hilera de la caja. De esta manera, cada serie contiene un corte cada 150 μm y la serie de tejido siguiente corresponde a secciones consecutivas. Los cortes fueron almacenados en una solución crioprotectora (600 ml de etilenglicol, *Fisher Scientific*, 300 g de sacarosa *Sigma*, 500 ml PBS y 500 ml de H₂O desionizada) (*Figura 20*). El tejido se mantuvo en estas condiciones en un congelador vertical a -20°C hasta el momento de su utilización para las técnicas de histología.

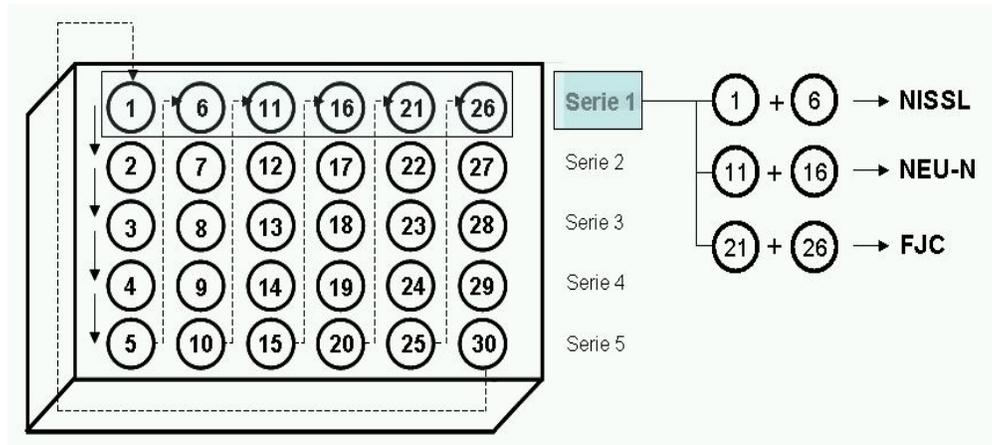


Figura 20. Almacenamiento del tejido. Orden de colocación de los cortes del hipocampo dorsal en caja de cultivo, luego de colectar los cortes se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento para los diferentes protocolos experimentales: Tinción de Nissl (NISSL), Inmunohistoquímica para Neu-N (NEU-N) y receptor de prolactina (PRLR) y Fluoro-Jade C (FJC).

VI.3 Protocolos de histología

VI.3.1 Tinción de Nissl

Dado que ésta técnica tiñe el RNA ribosomal del retículo endoplásmico rugoso lugar de intensa síntesis de proteínas de las células, esta técnica nos permitió teñir células del hipocampo, lo que nos dio un indicador de la morfología gruesa del hipocampo. El protocolo hace uso de un tren de tinción para someter al tejido a los siguientes pasos: 1) lavado con H₂OD, 2) montaje sobre portaobjetos, 3) secado a temperatura ambiente, 4) lavado con H₂OD, 5) deshidratación paulatina en gradiente de concentración creciente de etanol (50%, 70%, 95% y 100%), 6) aclarado con xileno, 7) rehidratación paulatina en gradiente de concentración decreciente de etanol (100%, 95%, 70% y 50%), 8)

teñido en una solución de tionina (0.25%) durante 10 minutos, 9) lavado con H₂O, 10) deshidratación paulatina en gradiente de concentración creciente de etanol (50%, 70%, 95% y 100%), 11) aclarado con xileno 12) inclusión con resina (DPX, *Electron Microscopy Sciences-BDH, mountant for microscopy*) y cubreobjetos, 13) secado de laminillas, 14) observación en microscopio de campo claro y 15) captura de imágenes digitales.

VI.3.2 Inmunohistoquímica para Neu-N

Se realizó una inmunohistoquímica para Neu-N (*Mouse Anti-Neuronal Nuclei*) (*Chemicon International, Biotin Conjugated Monoclonal Antibody*), una proteína que se encuentra en núcleo neuronal. Se pretendió, con ésta técnica, marcar neuronas con el objeto de obtener la sobrevivencia neuronal en las diferentes condiciones experimentales dentro de las áreas hipocampales analizadas. Para este protocolo se utilizó un método estándar inmunohistoquímico de detección usando un *kit* avidina-biotina, peroxidasa y diaminobenzidina (DAB). El tejido fue pre-tratado con H₂O₂, para eliminar peroxidasas, y con borohidruro de sodio para eliminar aldehídos. Estos pre-tratamientos se utilizaron con la finalidad de disminuir el fondo de la preparación. Posteriormente se perneó las membranas con un detergente (KPBS + 0.3% tritón), se bloqueó a los sitios de unión con suero normal de cabra, se incubó el tejido con el anticuerpo *Mouse Anti-Neuronal Nuclei Biotin Conjugated Monoclonal Antibody (Chemicon International)* durante 48 horas a una concentración de 1:5000, luego de lo cual se lavó el tejido (KPBS) para eliminar el primer anticuerpo, se le agregó suero normal de cabra para evitar la especificidad, se incubó con el anticuerpo, se enjuaga éste último y se procedió a correr la reacción oxidante con DAB y glucosa oxidasa para revelar el segundo anticuerpo o observar la marca en el tejido. Después se montó el tejido en portaobjetos, se dejó secar por un periodo de 24 horas, se deshidrató con etanol, se aclaró con xileno y finalmente se cubrió con resina (DPX, *Electron Microscopy Sciences-BDH, mountant for microscopy*).

Utilizando el mismo procedimiento se realizó una inmunohistoquímica para el receptor de PRL (PRLR), usando un anticuerpo monoclonal para detectar dicho receptor (*Mouse monoclonal Anti-PRLR, Affinity Bioreagents*).

VI.3.3 Marcador de muerte celular Fluoro-Jade C

El Fluoro Jade-C (*Chemicon International*) es un colorante derivado de la fluoresceína, permite identificar células en degeneración en tejido nervioso independientemente de que la vía de muerte celular sea apoptosis o necrosis. El protocolo consistió en someter al tejido a los siguientes pasos: 1) se con PBS para eliminar la solución crioprotectora, 2) se montó en portaobjetos, 3) se dejó secar por un periodo de 1 semana / 10 días, 4) posteriormente se pasó por un tren de soluciones para: hidratarlo (NaOH al 1%/ EtOH al 80% por 5 minutos, EtOH al 70% por 2 minutos y ddH₂O por 2 minutos), fijarlo (solución de KMnO₄ al 0.06% en agitación por 10 minutos y lavarlo con ddH₂O por 2 minutos); incubarlo (solución de Fluoro-jade C al 0.00024% + ácido acético al 0.1% durante 20 minutos), y lavarlo (con ddH₂O tres veces, por 5 minutos cada vez). Finalmente se dejó secando en horno a 50° C durante 5 a 10 minutos y se pasó por xileno para luego cubrirlo con resina (DPX, *Electron Microscopy Sciences-BDH, mountant for microscopy*).

VI.4 Evaluación Conductual

V.4.1 Marcadores tipo epilepsia

Para observar la progresión de los marcadores tipo epilepsia a través de una sucesión conductual establecida que tiene como reflejo un daño a nivel sistema nervioso, se utilizó la Escala de Zhang (Zhang, 1997). Además se contabilizó según la misma escala la frecuencia e intensidad de dichos marcadores conductuales luego de la lesión excitotóxica. Se esperaba observar una progresión mínima de convulsiones en los sujetos, dado que, según Collins, la dosis de AK administrada a los sujetos fue una dosis sub-convulsiva (7.5 mg/Kg, vía intraperitoneal) (Collins et al 1980).

VI.5 Obtención de los Datos

VI.5.1 Cuantificación Celular

Se obtuvieron imágenes en microscopio de campo claro de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4 del tejido sometido a Tinción de Nissl e Inmunohistoquímica para Neu-N. Se digitalizaron las imágenes y se analizaron

con el programa *Image-J* para contabilizar el número de células teñidas bajo los protocolos mencionados. Por cada área hipocámpal se estableció una región representativa (región de interés=ROI) en donde se cuantificó el número de células teñidas. Por cada sujeto se cuantificaron entre 5 y 10 imágenes mismas que corresponden a un corte coronal cada una.

En el caso del Fluoro-Jade C, se obtuvieron imágenes en microscopio de fluorescencia de las áreas hipocámpales CA1, CA3 y CA4. Se digitalizaron las imágenes y se analizaron con el programa *Image-J* para contabilizar, en la tinción fluorescente obtenida para este protocolo, el número de píxeles por ROI (Figura 21).

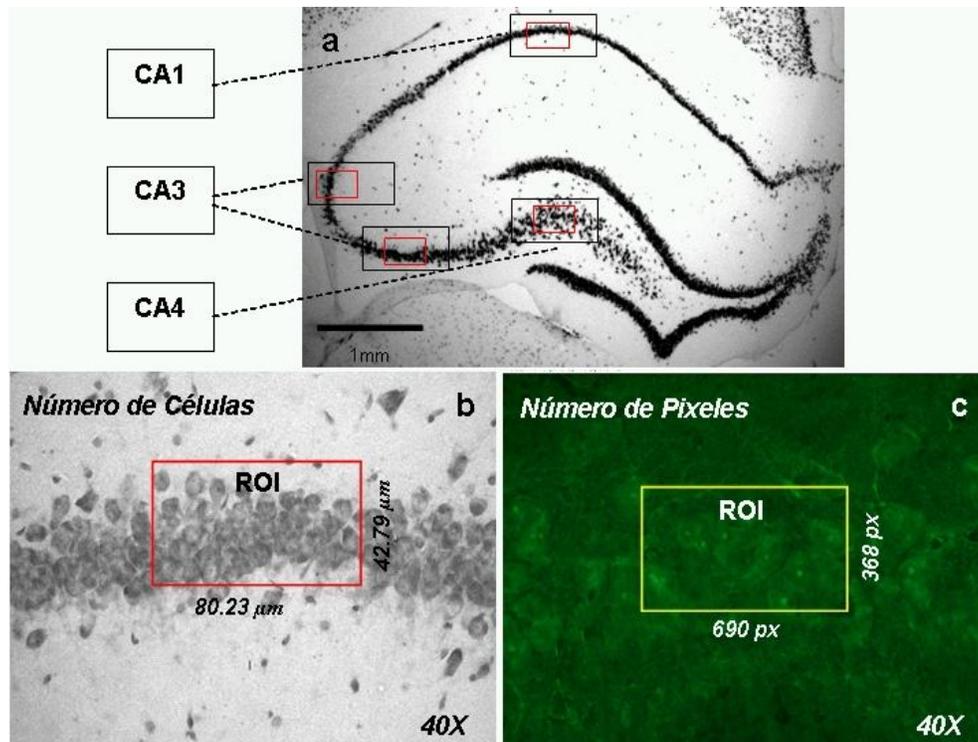


Figura 21. Áreas hipocámpales bajo estudio. Corte coronal del hipocampo dorsal que muestra las tres regiones estudiadas (CA1, CA3 y CA4) (a); así como los dos tipos de imagen analizadas, campo claro (b) y Fluorescencia (c), en las que se observan las dimensiones de la región de interés (ROI), dentro de la cuál se cuantificó el número de células (b) y el número de píxeles (c). Dichas imágenes se procesaron con el programa *Image-J*.

VI.5.2 Cuantificación Conductual

El día 3 experimental (D3), luego de inducir la lesión excitotóxica con AK, se registró en video durante cuatro horas a los animales de las condiciones

experimentales *Veh-AK* y *PRL-AK*, de ambos grupos. Posteriormente se analizaron los videos con el objeto de cuantificar las alteraciones conductuales causadas por el daño excitotóxico traducidas como la frecuencia de marcadores tipo epilepsia para cada fase de la escala de Zhang (Zhang, 1997) (Figura 22). Se cuantificó el número de veces que los sujetos mostraron alguna de las estereotipias propias de cada fase de la escala conductual, los datos se promediaron para cada una de las fases. También se hizo un cociente de progresión e intensidad de los marcadores a través de las fases. Se registró solamente a los sujetos que recibieron la lesión con AK, no así a los sujetos que recibieron vehículo en lugar de AK.

	FASE	MANIFESTACIONES
A	Staring	Arresto conductual Inactivo Postura de congelamiento
B	Wet dog	Clonus facial Sacudidas de cabeza Sacudidas de miembros anteriores
C	Hyperactivity	Olfateo incrementado Desplazamiento constante
D	Rearing	Tambaleo Levantamiento sobre miembros posteriores
E	Rearing and Falling	Tambaleo Levantamiento sobre miembros posteriores Caída
F	Jumping	Espasmos generalizados

Figura 22. Marcadores conductuales tipo epilepsia. Cuantificación de estereotipias por fase a lo largo del tiempo según la escala de Zhang. Fases: A= Staring, B= wet-dog, C= Hiperactivity, D= Rearing, E= Rearing and falling y F= Jumping.

VI.6 Análisis Estadístico

Utilizando el programa estadístico *Graph Pad PRISM* se aplicó una ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparación múltiple *Bonferroni*, para cada una de las condiciones experimentales (*Veh-VEH*, *Veh-AK*, *PRL-VEH* y *PRL AK*). Las gráficas representan el promedio \pm error estándar, una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

VII. RESULTADOS

VII.1 Inmunohistoquímica para PRLR

Aunque ya se había detectado la presencia del receptor de prolactina en el hipocampo (Grattan, 2001, Nogami, 2007), no se reportó las regiones específicas de su expresión. Nosotros nos cercioramos de la presencia del PRLR en el hipocampo y, a través de un protocolo de Inmunohistoquímica de fluorescencia contra dicho receptor, pudimos ver que el PRLR se expresa en las áreas hipocampales CA3 y GD (zona interna de la capa granular y capa polimórfica), al parecer dichos tipos celulares son de naturaleza gabaérgica (Paxinos, 1995), aunque está por confirmarse éste dato, (Figura 23).

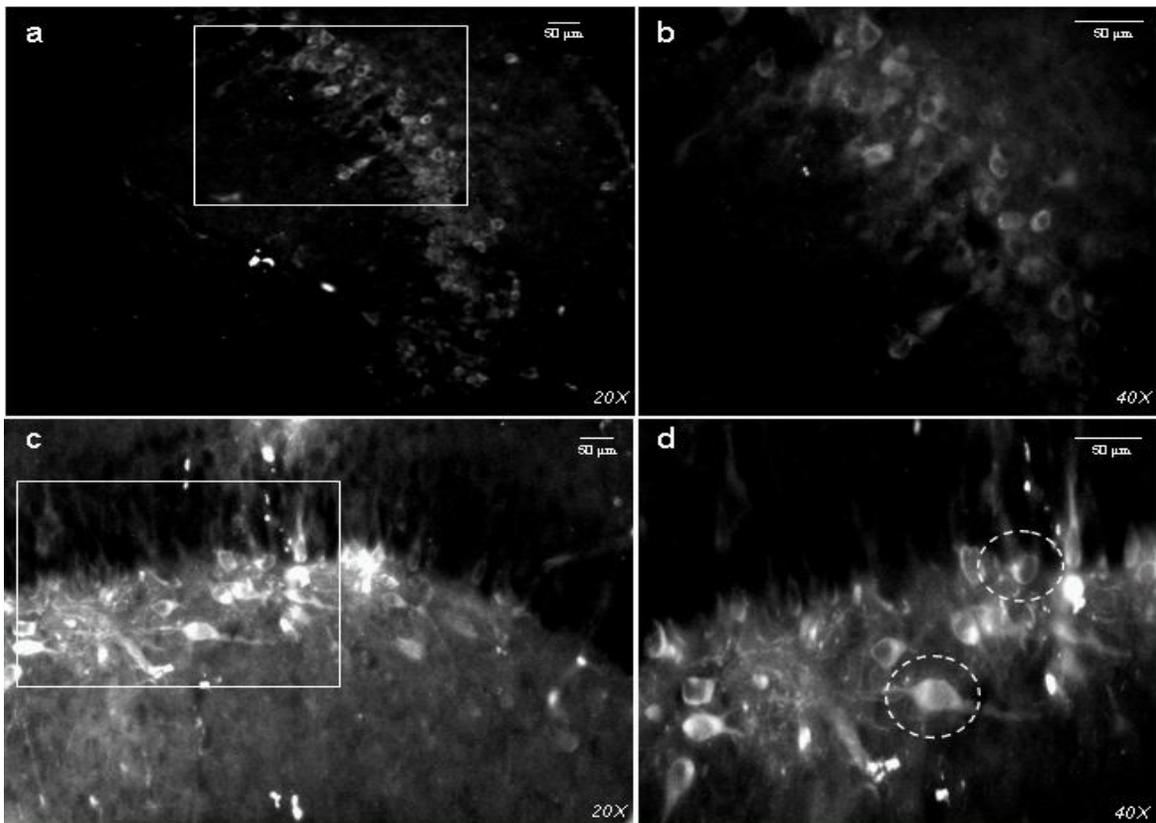


Figura 23. Receptor de prolactina (PRLR). Fotografías capturadas en microscopio de fluorescencia que muestran células inmunorreactivas al PRLR en CA3 (a y b) y GD (c y d) de ratas hembra vírgenes adultas. En d, se observan células en la zona interna de la capa granular (círculo superior derecho) y células en la capa polimórfica (círculo inferior izquierdo). Amplificación: 20X (a y c) y 40X (b y d).

VII.2 Tinción de Nissl

El conteo celular para la tinción de Nissl en el grupo de ratas "Intactas" nos revela, que el AK efectivamente ejerció su efecto excitotóxico sobre el hipocampo, ya que se observa una disminución en el número de células al comparar las condiciones experimentales control que recibieron la lesión con AK, con las que no lo recibieron (Veh-VEH vs Veh-AK). Además se puede ver claramente que la PRL por si misma no tiene ningún efecto sobre el número de células por ROI (Veh-VEH vs PRL-VEH). Por otra parte, si bien, no observamos diferencias significativas según el tratamiento (PRL o Veh) entre los sujetos lesionados excitotóxicamente, si hay una tendencia a la alta en el número de neuronas cuantificadas en la ROI (Veh-AK vs PRL-AK), en los sujetos tratados con prolactina, en las tres áreas hipocampales (CA1, CA3 y CA4) de éste grupo de ratas ("Intactas").

En cuanto el grupo "Ovx", si encontramos diferencias significativas según el tratamiento (Veh-AK vs PRL-AK) en las tres áreas hipocampales bajo estudio ($*=P<0.05$ y $***=P<0.001$ y $p<0.001$). Estas diferencias en la cuantificación celular entre ambos grupos ("Intactas" vs "Ovx") nos sugieren que, dado que no se extirparon las gónadas en las "Intactas", las hormonas ováricas podrían estar ejerciendo su efecto protector en el hipocampo amortiguando el efecto excitotóxico del AK (Figura 24). Las diferencias entre ambos grupos se observan también a través de las imágenes digitales capturadas con microscopio de campo claro (Figuras 25 y 26).

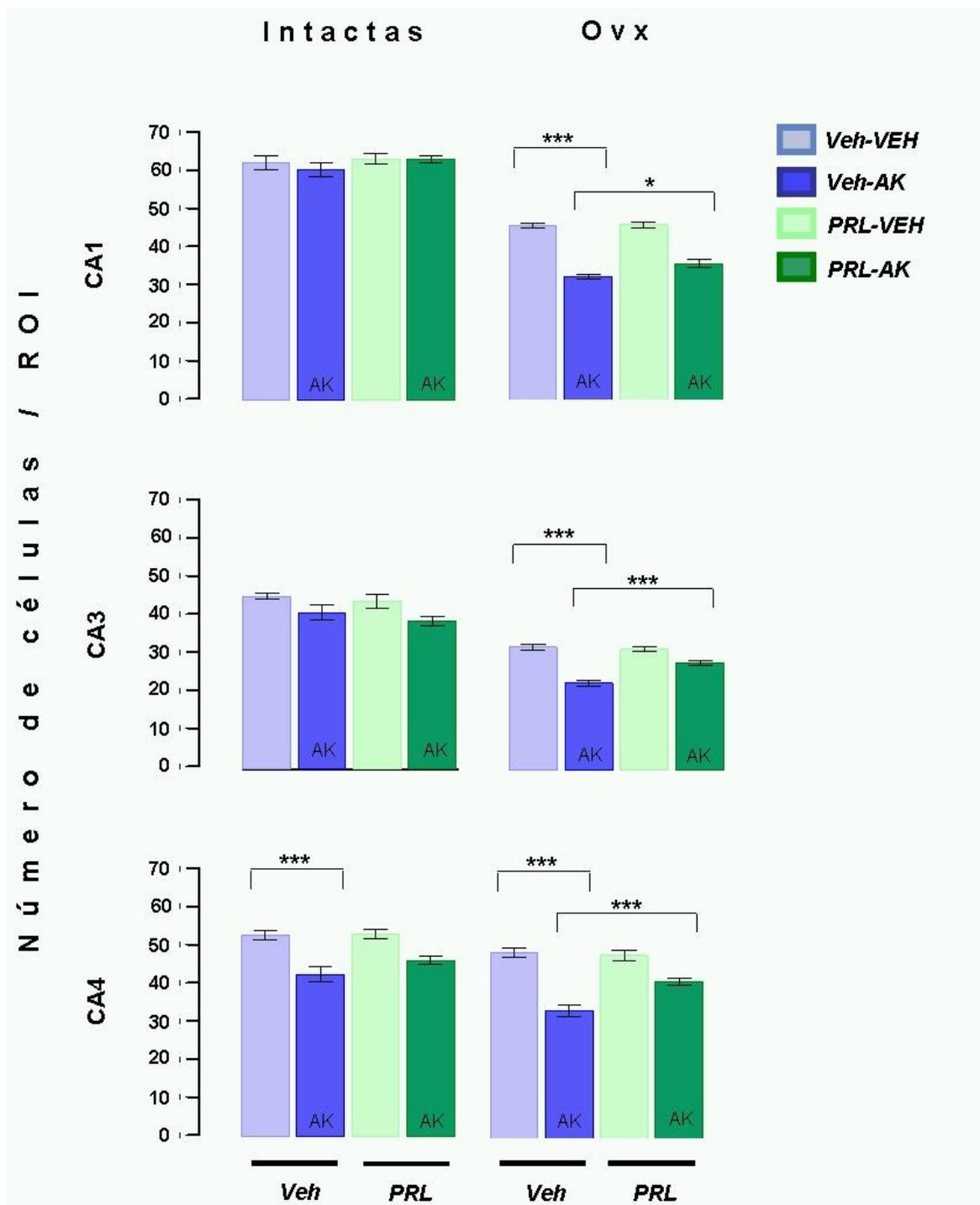


Figura 24. Tinción de Nissl. Cuantificación del número de células por región de interés (ROI) en las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4, de las cuatro condiciones experimentales (Tratamiento-LESIÓN): Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), Vehículo-ACIDO KAINICO (Veh-AK), Prolactina-VEHÍCULO (PrI-VEH) y Prolactina-ACIDO KAINICO (PrI-AK), en ambos grupos ("Intactas" y "Ovx"). Nivel de significancia: $*$ = $P<0.05$ y $***$ = $P<0.001$).

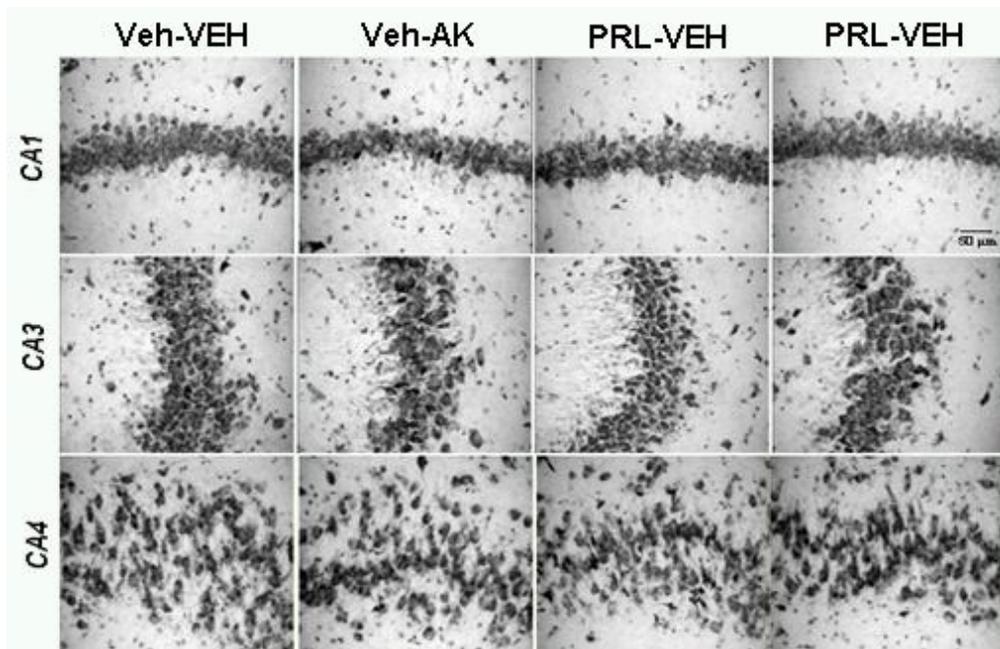


Figura 25. Tinción de Nissl "Intactas". Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4, que muestran la histología gruesa de las cuatro condiciones de experimentales (Tratamiento-LESIÓN): Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), Vehículo-ACIDO KAÍNICO (Veh-AK), Prolactina-VEHÍCULO (PrI-VEH) y Prolactina-ACIDO KAÍNICO (PrI-AK). Amplificación: 40X.

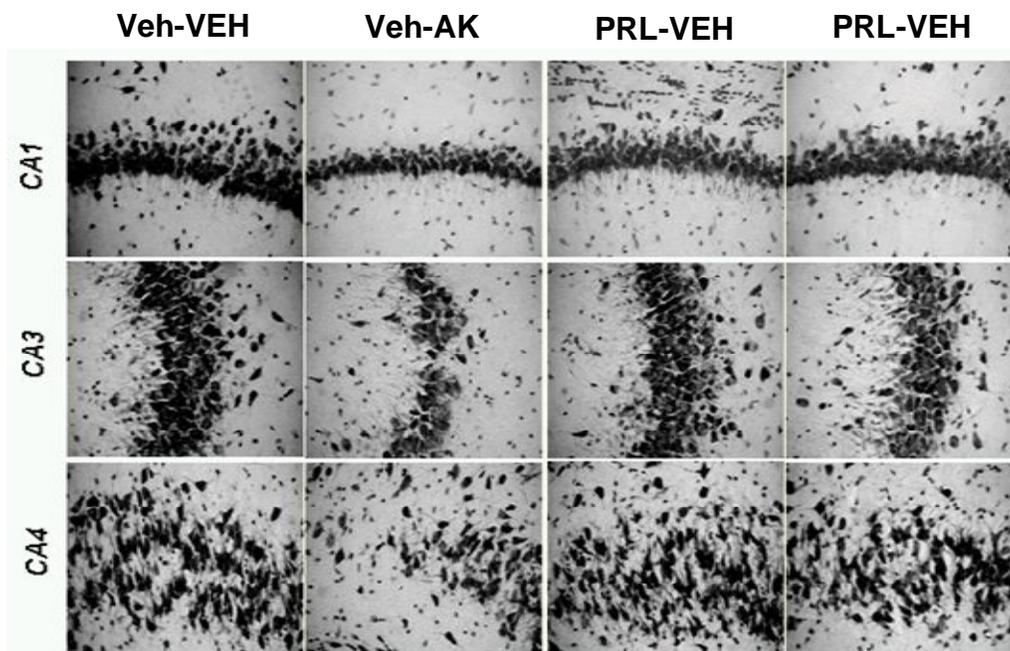


Figura 26. Tinción de Nissl "Ovx". Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4, que muestran la histología gruesa de las cuatro condiciones de experimentales (Tratamiento-LESIÓN): Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), Vehículo-ACIDO KAÍNICO (Veh-AK), Prolactina-VEHÍCULO (PrI-VEH) y Prolactina-ACIDO KAÍNICO (PrI-AK). Amplificación: 40X.

VII.3 Inmunohistoquímica para Neu-N

El conteo celular con ésta técnica, tanto para el grupo “Intactas” como para el grupo “Ovx” permitió detectar diferencias significativas respecto al tipo de lesión, es decir, los animales con tratamiento control (Veh) que recibieron la lesión excitotóxica (AK) presentan un menor número de células en las tres regiones bajo estudio. Respecto a las diferencias según el tratamiento (Veh vs PRL) en las ratas “Intactas” observamos diferencia significativa ($P < 0.05$) en CA3 y CA4, a pesar de que para CA1 ésta diferencia no es significativa, si observamos la misma tendencia que para CA3 y CA4. En el grupo “Ovx”, observamos que según el tratamiento, si hay diferencias significativas entre los animales que recibieron el tratamiento con PRL *versus* los que no, éste efecto protector del tratamiento con PRL ante la lesión excitotóxica (AK) se observó en las tres regiones hipocampales (CA1, CA3 y CA4). El tratamiento con PRL previno el daño celular inducido por AK, ya que las ratas que fueron tratadas previamente con PRL la lesión fue menor o nula ($p < 0.01-001$), (Figuras 27,28 y 29).

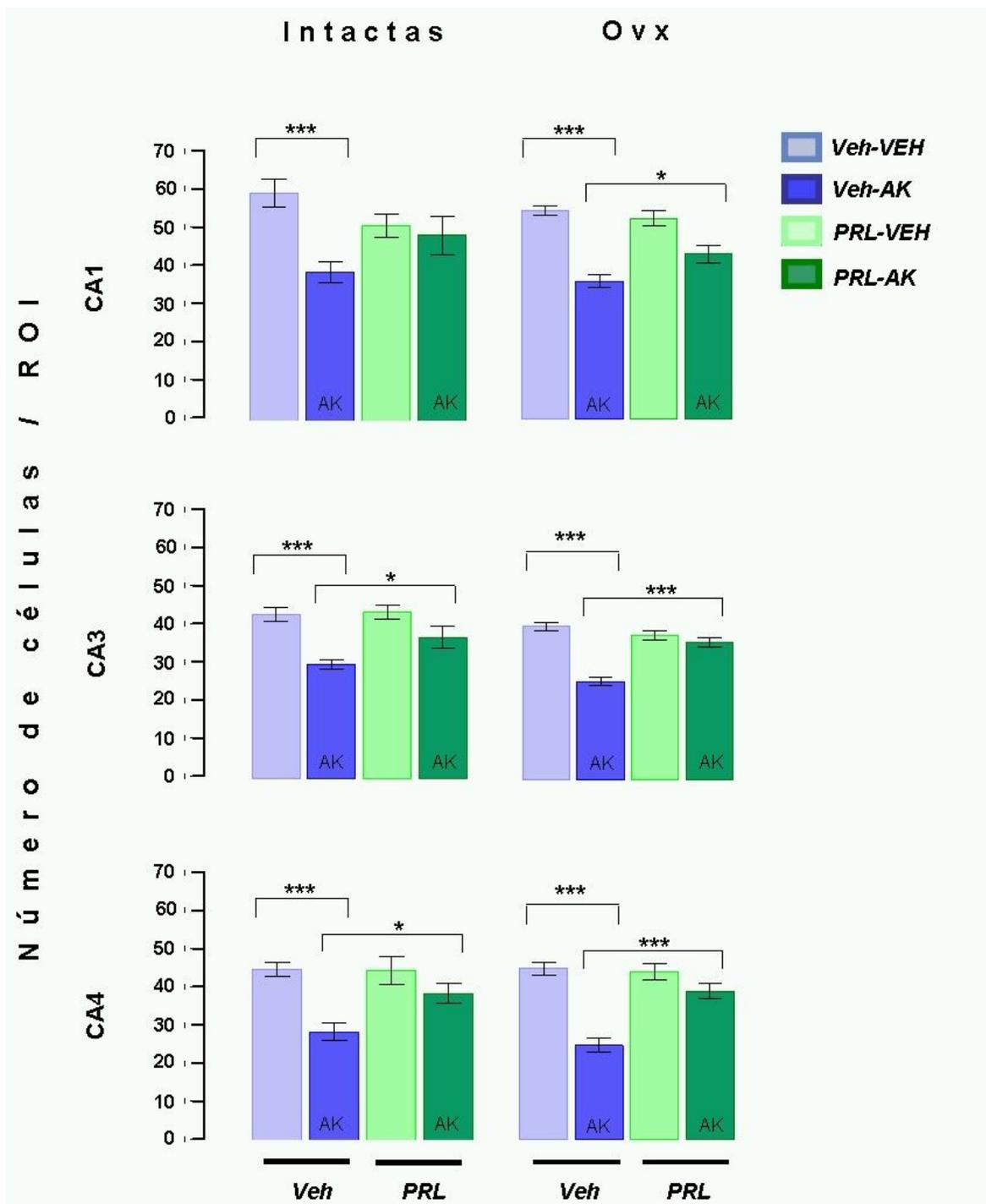


Figura 27. Inmunohistoquímica para Neu-N. Cuantificación del número de células por región de interés (ROI) en las áreas hipocámpales CA1, CA3 y CA4, de las cuatro condiciones experimentales (Tratamiento-LESIÓN): Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), Vehículo-ACIDO KAÍNICO (Veh-AK), Prolactina-VEHÍCULO (Prl-VEH) y Prolactina-ACIDO KAÍNICO (Prl-AK), en ambos grupos ("Intactas" y "Ovx"). Nivel de significancia: *= $P < 0.05$ y ***= $P < 0.001$.

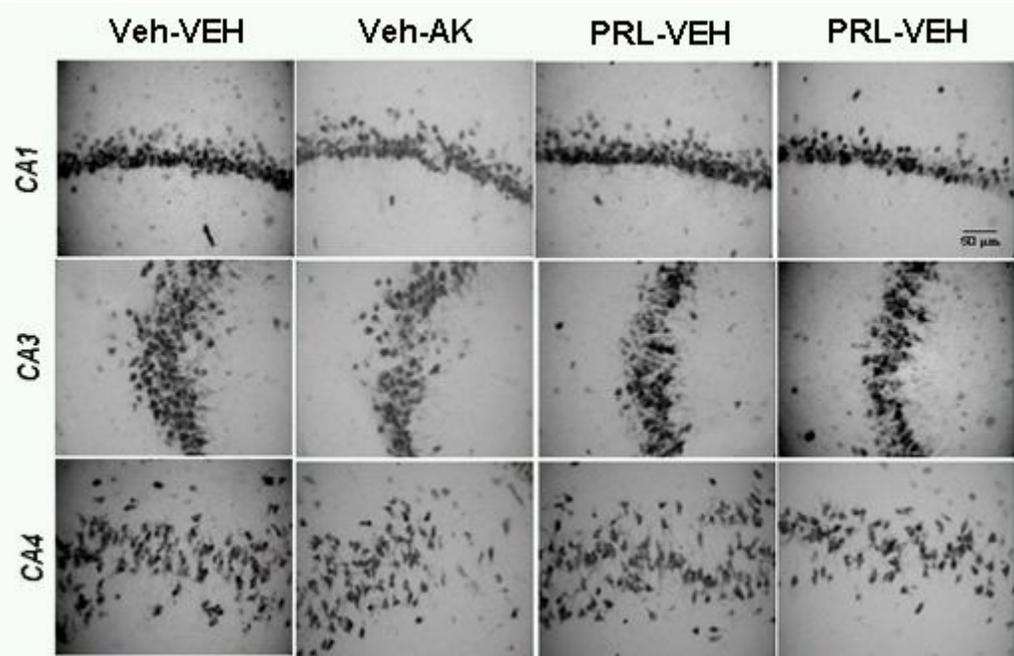


Figura 28. Inmunohistoquímica para Neu-N "Intactas". Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4, que muestran neuronas reactivas de las cuatro condiciones de experimentales (Tratamiento-LESIÓN): Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), Vehículo-ACIDO KAÍNICO (Veh-AK), Prolactina-VEHÍCULO (PrI-VEH) y Prolactina-ACIDO KAÍNICO (PrI-AK). Amplificación: 40X.

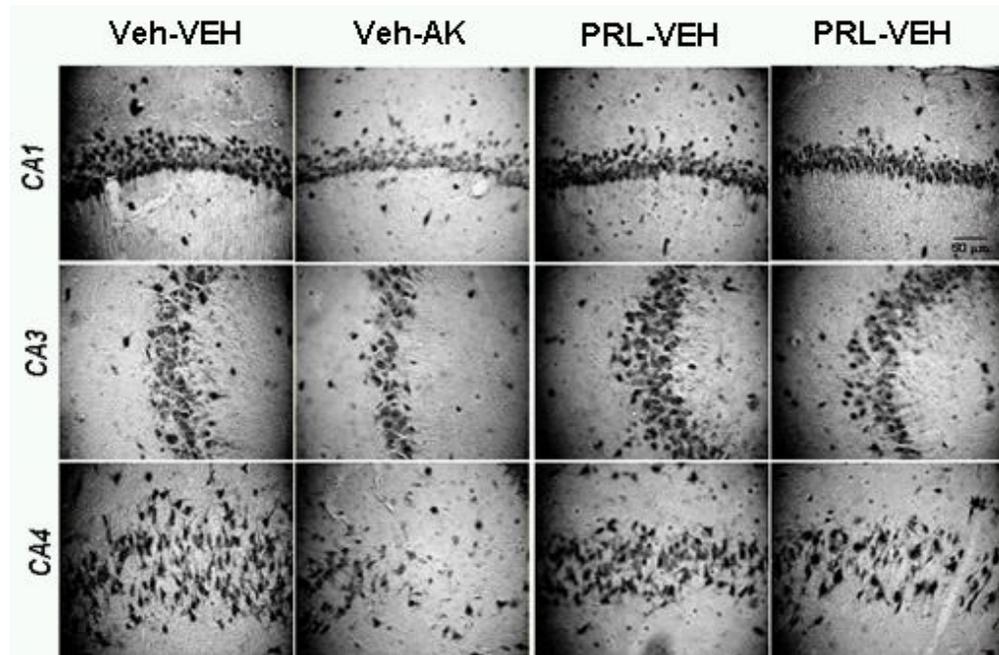


Figura 29. Inmunohistoquímica para Neu-N "Ovx". Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4, que muestran neuronas reactivas de las cuatro condiciones de experimentales (Tratamiento-LESIÓN): Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), Vehículo-ACIDO KAÍNICO (Veh-AK), Prolactina-VEHÍCULO (PrI-VEH) y Prolactina-ACIDO KAÍNICO (PrI-AK). Amplificación: 40X.

VII.4 Marcaje con Fluoro-Jade C

Los resultados de éste protocolo mostraron que el AK fue efectivo al inducir neurodegeneración en el hipocampo de ambos grupos (Intactas y Ovx) ya que el simple hecho de inducir la lesión hizo que el marcador de degeneración incrementara su presencia (*Veh-VEH vs Veh-AK*). También observamos que la PRL por sí misma no tiene ningún efecto sobre las áreas bajo estudio (*Veh-VEH vs PRL-VEH*), es decir, no se observan diferencias entre la condición control (*Veh-VEH*) y la condición (*PRL-VEH*). En donde si observamos evidencia significativa de que la PRL está protegiendo y previniendo el daño en el hipocampo dorsal de la rata fue en las condiciones experimentales en las que se indujo la lesión excitotóxica (*Veh.AK vs PRL-AK*). Al parecer este efecto de prevención en el daño celular, es más evidente en el grupo "Ovx", probablemente, al ser animales sin ovarios, no tienen el efecto benéfico de las hormonas ováricas, lo que hace que la neuroprotección de la PRL sea más evidente, aunque también podemos decir que la PRL previno la neurodegeneración en el grupo de ratas Intactas (*Figuras 30,31 y 32*).

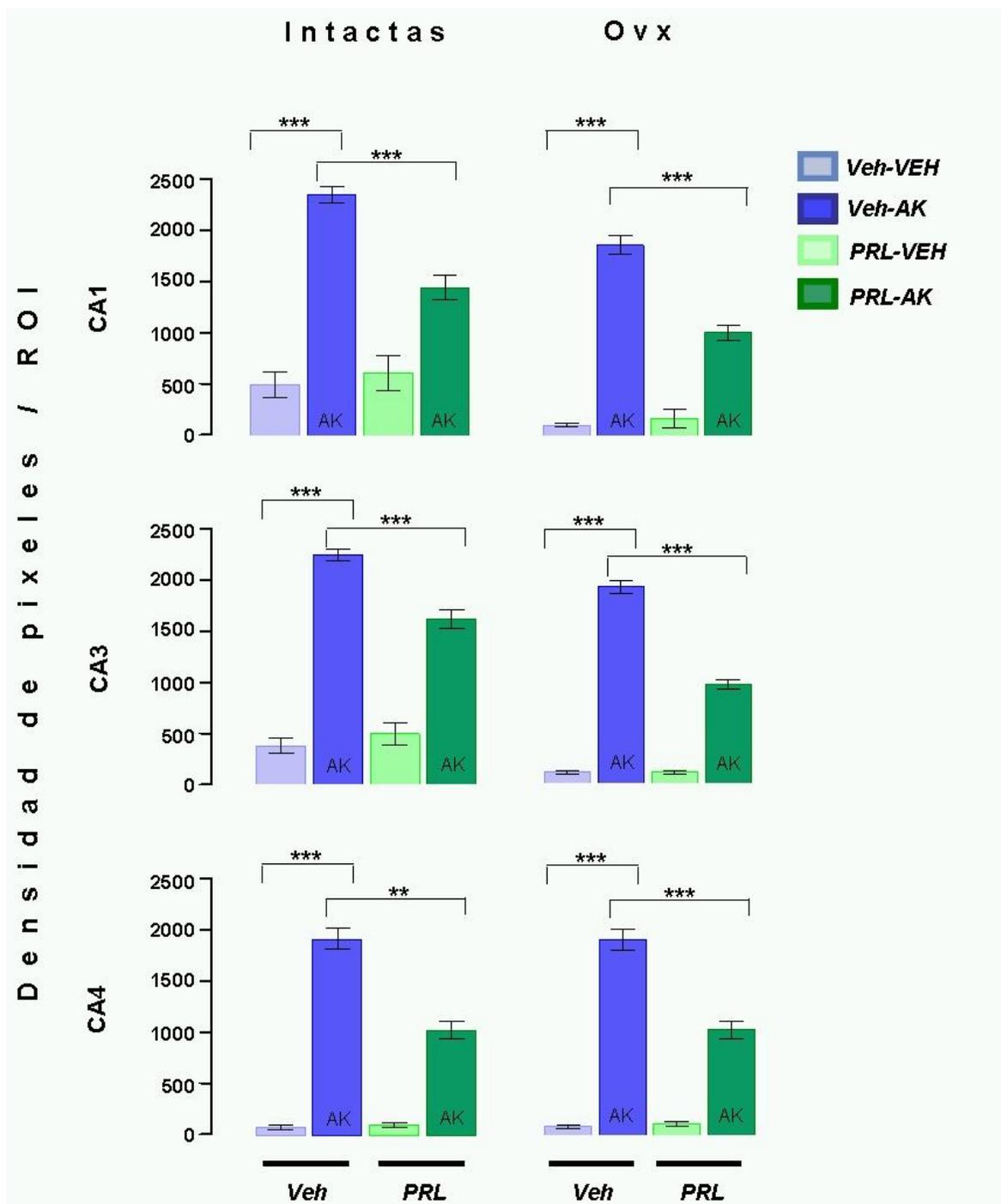


Figura 30. Marcaje con Fluoro-Jade C. Cuantificación del número de pixeles por región de interés (ROI) en las áreas hipocámpales CA1, CA3 y CA4, de las cuatro condiciones experimentales (Tratamiento-LESIÓN): Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), Vehículo-ACIDO KAÍNICO (Veh-AK), Prolactina-VEHÍCULO (PrI-VEH) y Prolactina-ACIDO KAÍNICO (PrI-AK), en ambos grupos ("Intactas" y "Ovx"). Nivel de significancia: $*=P<0.05$, $**=P<0.01$ y $***=P<0.001$).

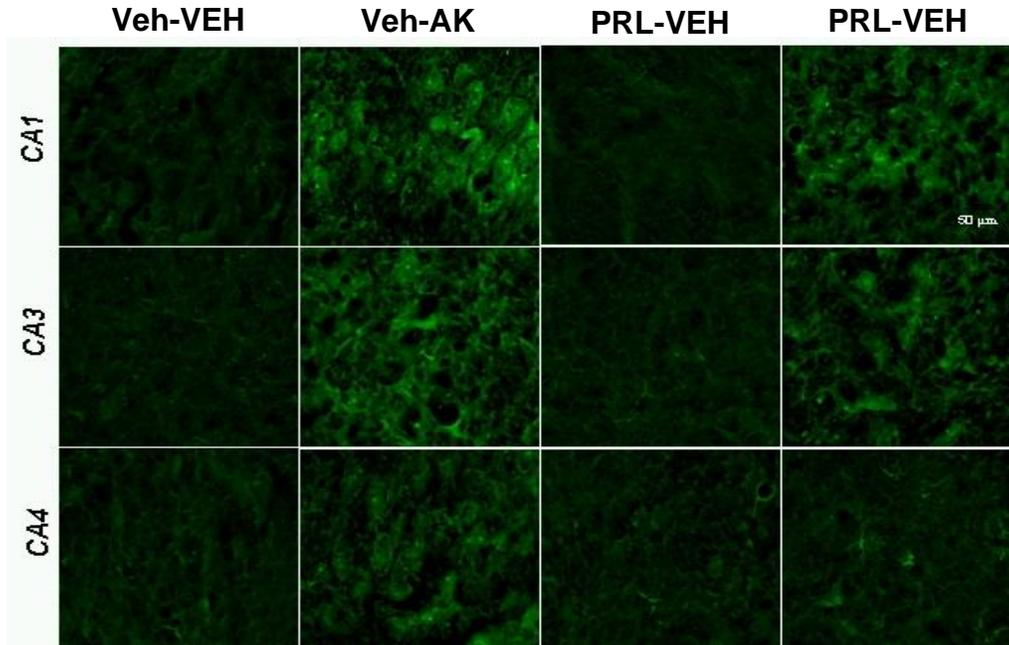


Figura 31. Marcaje con Fluoro-Jade C "Intactas". Fotografías digitales capturadas en microscopio de fluorescencia de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4, que muestran células en proceso degenerativo de las cuatro condiciones de experimentales (Tratamiento-LESIÓN): Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), Vehículo-ACIDO KAÍNICO (Veh-AK), Prolactina-VEHÍCULO (PrI-VEH) y Prolactina-ACIDO KAÍNICO (PrI-AK). Amplificación: 40X.

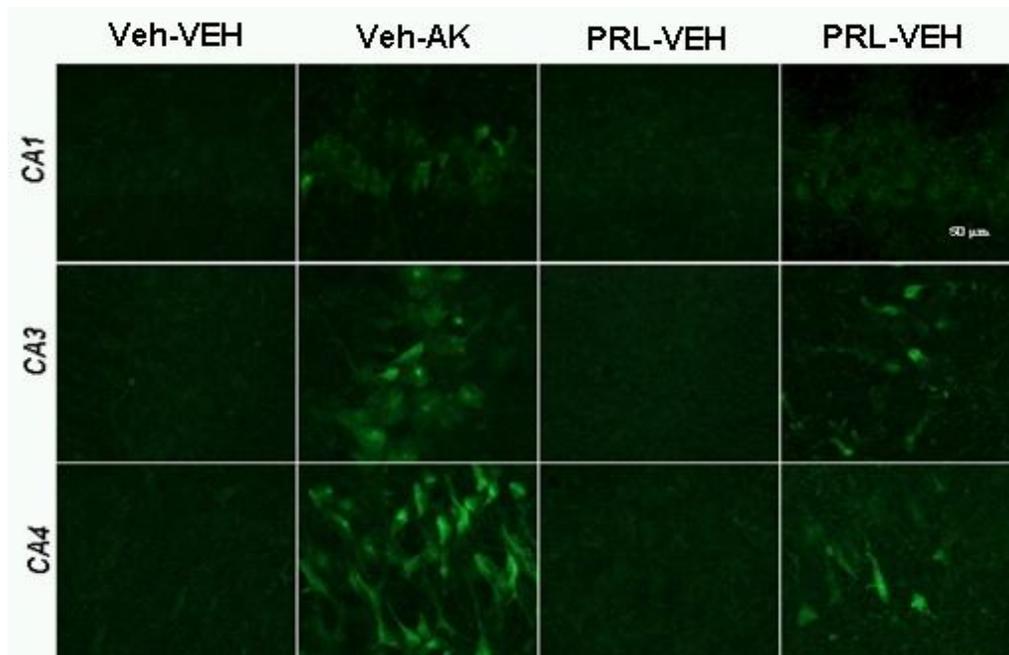


Figura 32. Marcaje con Fluoro-Jade C "Ovx". Fotografías digitales capturadas en microscopio de fluorescencia de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4, que muestran células en proceso degenerativo de las cuatro condiciones de experimentales (Tratamiento-LESIÓN): Vehículo-VEHÍCULO (Veh-VEH), Vehículo-ACIDO KAÍNICO (Veh-AK), Prolactina-VEHÍCULO (PrI-VEH) y Prolactina-ACIDO KAÍNICO (PrI-AK). Amplificación: 40X.

VII.5 Evaluación conductual

De acuerdo con la cuantificación de manifestaciones conductuales tipo epilepsia inducidas por AK que reporta la escala de Zhang, se observó una menor progresión e intensidad de dichas manifestaciones en la condición experimental que recibió el tratamiento con PRL (*PRL-AK*) en comparación con la condición que no recibió dicho tratamiento (*Veh-AK*), éstos efecto protector de la PRL se presentó tanto en el grupo de “Intactas” como en el grupo “Ovx” y se podría decir que la diferencia es dramática en el video (*Figura 33*).

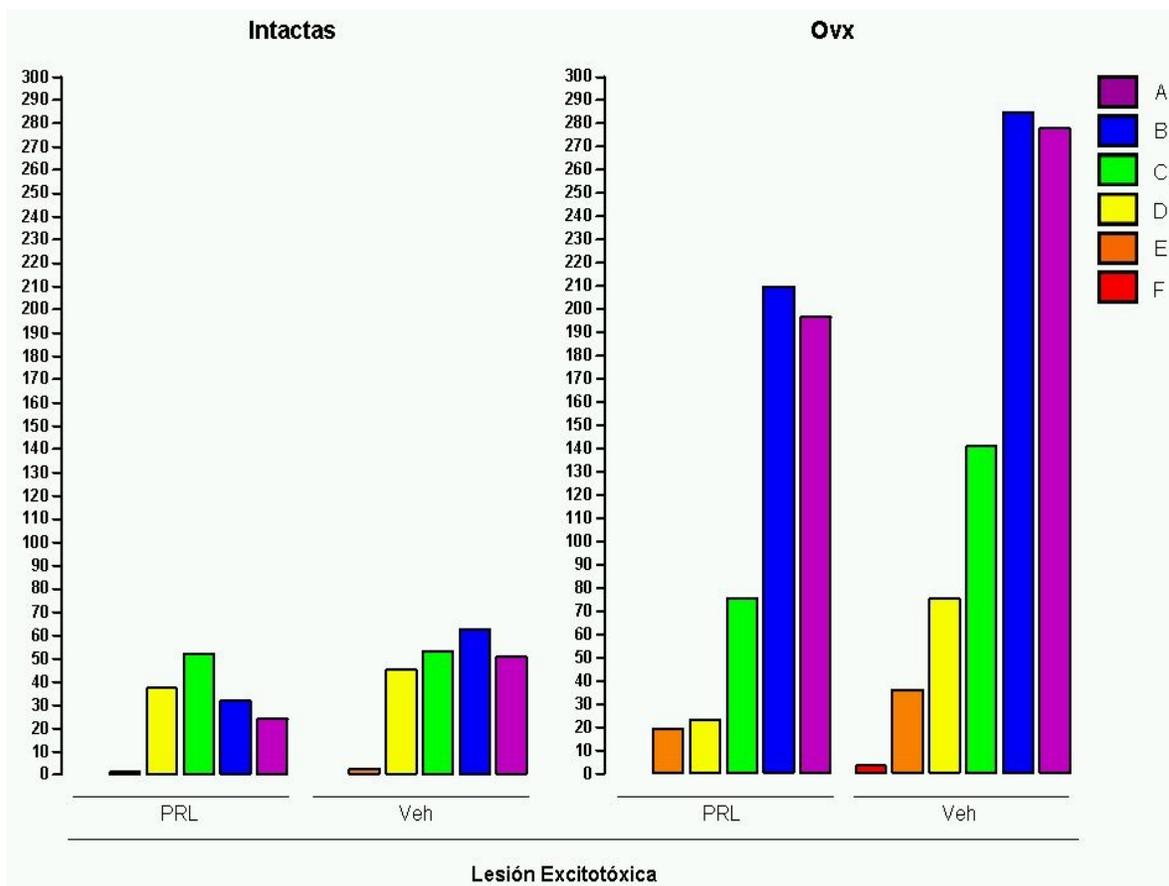


Figura 33. Marcadores conductuales tipo epilepsia. Cuantificación de estereotipias por fase a lo largo del tiempo según la escala de Zhang. Para ambos grupos (Intactas y Ovx) se observa que los sujetos que recibieron el tratamiento con prolactina (PRL) muestran una menor frecuencia de aparición de estereotipias que los sujetos control (Veh). Este efecto más evidente en el grupo de ratas Ovx. Fases: A= Staring, B= wet-dog, C= Hiperactividad, D= Rearing, E= Rearing and falling y F= Jumping.

Además de la cuantificación de estereotipias, se hizo un cociente de progresión e intensidad de las fases para dichos marcadores conductuales y se encontró que las ratas tratadas con PRL tuvieron una menor progresión e intensidad que la condición control (*Figura 34*).

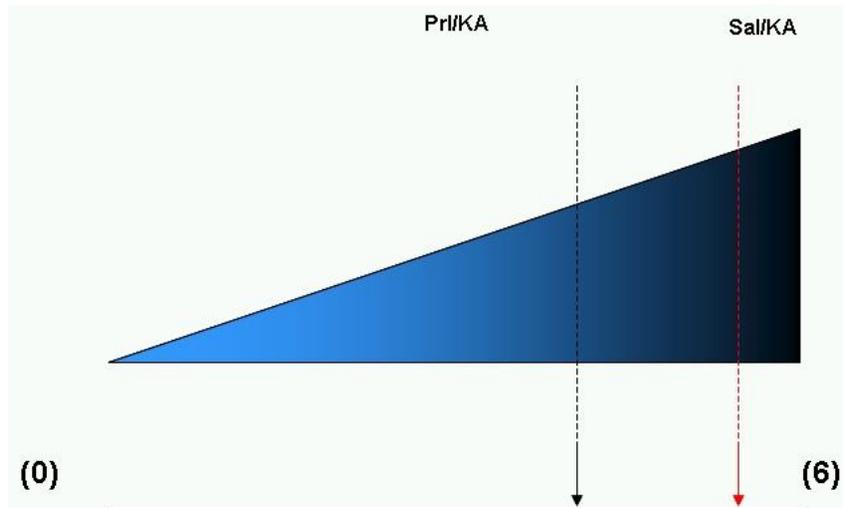


Figura 34. Cociente de progresión de estereotipias. El esquema ilustra la progresión e intensidad de las estereotipias, este parámetro muestra la gravedad de los marcadores que va de mínima (0=A) a máxima (6=F). Se observa que las ratas tratadas con prolactina (PRL-KA), muestran una menor progresión e intensidad de daño que su control (Veh-KA), ante la excitotoxicidad (AK).

VIII. DISCUSIÓN

La neuroprotección es un proceso biológico complejo que en el que intervienen diversos factores y de diferente índole. El hecho de poder estudiar este proceso desde una perspectiva sistémica aporta las bases para comenzar a desmenuzarlo. Se sabe que las hormonas ováricas juegan un papel importante en este mecanismo de plasticidad en ciertas condiciones fisiológicas del ciclo reproductivo, pero restan muchas incógnitas por resolver acerca de otras condiciones fisiológicas, como la lactancia, que involucran a otros factores como la fluctuación de diversas hormonas. La aportación del presente trabajo radica en documentar que la PRL juega un papel importante en la neuroprotección en el modelo experimental de daño celular al hipocampo dorsal inducido por excitotoxicidad. Basados en la literatura y trabajo previo de nuestro laboratorio, esperábamos que el tratamiento crónico con prolactina (PRL) indujera un estado hiperprolactinéxico en nuestros sujetos y que gracias a este estado, el hipocampo dorsal presentara neuroprotección contra la lesión excitotóxica inducida por el AK.

Esta acción neuroprotectora de la PRL se determinó por varios métodos de histología, a saber, tinción de Nissl, Inmunohistoquímica para Neu-N y marcaje neurodegeneración con Fluorujade-C, además, se evaluó la conducta tipo epilepsia.

A pesar de que la tinción de Nissl no mostró resultados significativos para el grupo Intactas, si lo hizo para el caso de las Ovx, fenómeno que podría explicar la influencia protectora de las hormonas ováricas, que está presente en el grupo Intactas. Sin embargo, a través de la Inmunohistoquímica, un protocolo más específico, observamos que la PRL previene el daño excitotóxico inducido por AK, en el grupo Intactas vemos diferencias significativas en CA3 y CA4, no así en CA1, esto se puede explicar, como en el caso de la tinción de Nissl, por efecto de las hormonas ováricas, aunque también podría deberse al número de receptores a glutamato, que es menor en CA1 que en CA3, además de la propia circuitería y la cercanía entre CA3 y CA4, mientras que CA1 muestra un acceso un poco más alejado. Ahora, Este efecto se replicó de alguna manera en el grupo de ratas Ovx,

aunque las diferencias, según el tratamiento (Veh-AK vs PRL-AK), son significativas para las tres estructuras bajo estudio, observamos un nivel de significancia mayor en CA3 y CA4. Esto podría tener una explicación de naturaleza anatómica, es decir, a nivel de conexiones y circuitería interna del hipocampo.

Un efecto más claro del papel neuroprotector de la PRL lo observamos a través del marcaje de neurodegeneración (FJC), en donde los datos arrojaron diferencias significativas para las tres estructuras hipocampales en ambos grupos.

Esta disminución en el daño neuronal y en el marcaje neurodegenerativo se correlacionó con la reducción en la progresión e intensidad de los marcadores tipo epilepsia inducidos por el AK y como en los dos protocolos anteriores éste efecto fue más evidente en el grupo Ovx. En cierto grado, este resultado fue esperado ya que la ovariectomía se realizó con el objetivo de eliminar la influencia de los cambios en los niveles circulantes de las hormonas ováricas, de las cuales se conoce ampliamente su acción neuroprotectora en las células del hipocampo así como su acción sobre la incidencia de crisis epileptoides (Hoffman y col., 2003). En el grupo Ovx hubo menor variación entre los sujetos y esto permitió detectar diferencias significativas entre los grupos tratados con AK, con y sin PRL (Ovx: Veh-AK vs PRL-AK); además de que se ha propuesto que algunas acciones centrales de la PRL pueden estar mediadas por progesterona, lo cual quedaría descartado en para este grupo.

Además de los resultados morfológicos, la observación conductual mostró claramente que la intensidad y progresión en la conducta epileptoide inducida por AK fue menor en los sujetos tratados previamente con PRL. Este resultado concuerda con reportes que han propuesto que la PRL puede modular la actividad convulsiva cuando está presente de manera crónica (Doretto et al., 2003) por ejemplo, en el embarazo y la lactancia, cuando la PRL alcanza su nivel máximo.

Una de las perspectivas que este trabajo ha planteado es conocer el mecanismo de acción de la PRL para su efecto protector. Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, la PRL esta presente en el hipocampo murino, así como la forma larga y la corta de su receptor (Torner et al., 2009). La presencia de

los receptores de PRL en el hipocampo sugiere una acción directa de la hormona sobre las neuronas hipocampales. Sin embargo, en nuestros estudios aunque si reconfirmamos la presencia del PRLR, desconocemos la cantidad de esa hormona que haya alcanzado al cerebro. Lo que sí conocemos es la localización de los PRLR en células propias del hipocampo dorsal, específicamente en células de las áreas CA3 y del GD, las cuales estarían recibiendo la acción directa de la PRL. Este sería uno de los sitios en que posiblemente se estén modulando los efectos adversos de la lesión excitotóxica, regulando la movilización de sodio entre el interior y el exterior de la célula a modo de buscar niveles homeostáticos. Acciones de la PRL relativas a nuestros hallazgos incluyen que ésta hormona puede tener un efecto modulador de la entrada de información al hipocampo ya que se ha documentado que la hormona aplicada intracerebroventricularmente al hipocampo disminuye la expresión de Fos inducida por un estímulo estresante (Donner et al., 2007). De igual forma, la PRL está implicada en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en la respuesta al estrés de ratas lactantes y nulíparas (Torner et al., 2002), ya que se ha visto que atenúa la expresión de la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y la liberación de corticosterona en respuesta a un estímulo estresante agudo.

Otra de las acciones reportadas para esta hormona, es el aumento en la proliferación celular en la zona subventricular (Shingo et al., 2003), y en ciertas circunstancias en el giro dentado; dado que nuestro estudio fue a corto posiblemente no estemos incidiendo en la tasa de neurogénesis pero sería interesante explorar ese fenómeno. También se ha visto que la PRL promueve mecanismos antiapoptóticos en el hipocampo del ratón estresado crónicamente. Los efectos anti-apoptóticos de la PRL han sido documentados por estudios en varios tipos celulares, como linfocitos tratados con glucocorticoides (Krishnan et al., 2003) o en células Nb2 de linfoma (Leff et al., 1996), mediados en parte por el aumento en la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la disminución de la expresión de la pro-apoptótica Bax. Además, utilizando el modelo hipoxia/isquemia en ratas, Mödersheim y colaboradores (2007) mostraron que este procedimiento induce una activación robusta del eje de PRL en regiones de la corteza cerebral

afectadas por la lesión. Estos autores proponen que la PRL no tiene efectos neuroprotectores directos en esa zona, pero que está relacionada con la respuesta glial que se observa después de una lesión cerebral. En nuestros estudios no se determinó si la PRL central aumenta por la lesión y si los efectos de la hormona se deben a la PRL central o sistémica pero sería otro punto a considerar a futuro. Otro posible mecanismo de acción de la PRL en la neuroprotección sería a través del sistema inmune. Se sabe que la PRL tiene acciones estimulantes sobre dicho sistema y, al promover la secreción de interleucinas pro- ó anti- inflamatorias, puede facilitar o disminuir la inflamación (Kelley et al., 2007). Una acción neuroprotectora más de nuestra hormona es en la esclerosis múltiple donde se ha mostrado que mejora la remielinización (Yong, 2009).

En síntesis, los resultados presentados en esta tesis muestran claramente el papel neuroprotector de la PRL en el hipocampo dorsal de la rata hembra. Las dosis diarias de PRL fueron efectivas en prevenir el daño celular del hipocampo causado por el AK. En alguna de las áreas casi en un 100%. Estos datos sugieren que la PRL juega un papel importante en los procesos neuronales que estén ocurriendo después de la lesión y probablemente esto sea una aproximación a lo que ocurre de manera natural durante la lactancia (Vanoye-Carlo et al., 2008). Estos estudios han abierto una línea interesante que puede ser abordada desde diferentes perspectivas.

IX. CONCLUSIONES

El AK mostró el efecto excitotóxico esperado, efecto que se tradujo en una disminución en el número de células en las zonas hipocampales estudiadas. Observamos que la PRL tiene un efecto neuroprotector a nivel celular en dichas zonas en nuestro modelo experimental; ya que la neurodegeneración disminuyó en los animales tratados con PRL. Además, corroboramos este efecto protector a nivel conductual ya que obtuvimos una menor progresión en intensidad de los marcadores tipo epilepsia. En conclusión, los resultados de este estudio muestran que la PRL previene el daño por excitotoxicidad inducido por la aplicación de AK.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbud, R., Hoffman, G.E. y Smith, M.S. 1994. Lactation-induced deficits in NMDA receptor-mediated cortical and hippocampal activation: changes in NMDA receptor gene expression and brainstem activation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 25, 323-32.
2. Adams, M.M. y Morrison, J.H. 2003. Estrogen and the aging hippocampal synapse. *Cereb. Cortex* 13(12):1271-5.
3. Alberts, B. Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter P. 2003. Comunicación celular. En Alberts, B. Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter P (Eds). *Biología molecular de la célula*. 4ª edición. Ediciones Omega, España.
4. Alexi, T., Borlongan, C.V., Faull, R.L.M., Williams, C.E., Clark, R.G., Gluckman, P.D. y Hughes, P.E. 2000. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington diseases. *Prog. Neurobiol.* 60(5): 409-70.
5. Anborgh, P.H., Godin, C., Pampillo, M., Dhami G.K., Dale, L.B., Cregan, S.P., Truant, R. y Ferguson, S.S. 2005. Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the hungtington-binding protein optineurin. *J. Biol. Chem.* 280(41):34840-8.
6. Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O'keefe, J. 2007. Historical perspective: proposed functions, Biological characteristics, and neurobiological models of the hippocampus. En Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O'keefe, J. (Eds.), *The hippocampus book*. (pp 09-36). USA: Oxford University Press.
7. Aragona, C., Bohnet, H.G. y Friesen, H.G. 1977. Localization of prolactin binding in prostate and testis: the role of serum prolactin concentration on the testicular LH receptor. *Acta Endocrinol.* 84(2):402-9.
8. Arundine, M., Tymianski, M., 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34(4-5): 325-37.
9. Azcoitia, I., Moreno, A., Carrero, P., Palacios, S., Garcia-Segura, L.M. 2006. Neuroprotective effects of soy phytoestrogens in the rat brain. *Gynecol. Endocrinol.* 22(2):63-9.
10. Bakos, J., Hlavacova, N., Rajman, M., Ondicova, K., Koros, C., Kitraki, E., Steinbusch, H.W., y Jezova, D. 2009. Enriched environment influences hormonal status and hippocampal brain derived neurotrophic factor in a sex dependent manner. *Neuroscience* 164(2):788-97.
11. Bakowska, J.C. y Morrell, J.I. 1997. Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *J. Comp. Neurol.* 386(2):161-77.
12. Beal, F.M. 1992. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* 6(15):3338-44.
13. Ben-Ari, Y. y Cossart, R., 2000. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci.* 23(11), 580-7.

14. Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L., Steinmetz, R.W. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, function, and clinical aspect. *Endocr. Rev.* 17(6):639-69.
15. Berzaghi Mda, P., Amado, D., Cavalheiro, E.A., 1987. Pregnancy decreases the frequency of spontaneous recurrent seizures in rats with kainic acid lesions of the hippocampus. *Epilepsy Res.* 1(2), 142-4.
16. Brailowsky, S. 1998. Las sustancias de los sueños. La Ciencia Para Todos. SEP/Fondo de Cultura Económica/CONACYT, México.
17. Bridges, R., 1985. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science* 227(4688):782-4.
18. Bortolotto, Z.A., Lauri, S., Isaac, J.T.R. y Collingridge, G.L. 2003. Kainate receptors and the induction of mossy fibers long term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 358(1432):657-66.
19. Cabrera, V., Cantú, D., Ramos, E. Vanoye-Carlo, A., Cerbón, M. y Morales, T. 2009. Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity. *Neurosci. Lett.* 461(2): 136-9.
20. Castroviejo, P. 1996. Plasticidad Cerebral. *Rev. Neurol;* 24:1361-6.
21. Clapp, C., Martínez de la Escalera, G., Aguayo, D. y Mena, F. 1987. Regulación integrativa de la lactancia. *Biol. Estud. Med. Biol.* 35(1-2): 63-107.
22. Cleavenger, C.V., Altman, S.W. y Prystowsky, M.B. 1991. Requirement of nuclear prolactin for interleukin-2 stimulated proliferation of T lymphocytes. *Science* 253(5015): 77-9.
23. Collins, R., McLean, M. y Olney, J. 1980. Cerebral Metabolic to systemic kainic acid: 14-C deoxyglucose studies. *Life Sci.* 27(10):855-62.
24. Díaz-Cintra S. (en revisión).
25. Dinkel, K., MacPherson, A. y Sapolsky, R.M. 2003. Novel glucocorticoid on acute inflammation in the CNS. *J. Neurochem.* 84(4), 705-16.
26. Donner, N., Bredewold, R., Maloumby, R., Neumann, I.D., 2007. Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur. J. Neurosci.* 25(6), 1804-14.
27. Doretto, M.C., Oliveira-e-Silva, M., Ferreira-Alves, D.L., Pires, S.G., Garcia-Caraisco, N. y Reis, A.M. 2003. Effect of lactation on the expression of audiogenic seizures: association with plasma prolactin profiles. *Epilepsy Res.* 54(2-3):109-21.
28. Drago, F. 1984. Prolactin and sexual behavior: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8(4):433-9.
29. Dugan, L. y Sook Kim-Han, J. 2006. Hypoxic-Ischemic brain injury and oxidative stress. En Siegel GJ, Albers RW, Brady ST y Price DL. (Eds.), *Basic neurochemistry. Molecular cellular and medical aspects.* 7th edition. USA Elsevier Academic Press.
30. Dusanter-Fourt, I., Belair, L., Gespach, C. y Djiane, J. 1992. Expression of prolactin (PRL) receptor gene and PRL-binding sites in rabbit intestinal epithelial cells. *Endocrinology* 130(5): 2877-82.

31. Edery, M., Binart, N., Bouchard, B., Goffin, V. y Kelly, P.A. 2001. Prolactin receptors. En Nelson D. Horseman (Ed), Prolactin. USA Kluwer Academic Publishers.
32. Fernández de Miguel, F. 1998. Excitabilidad. En María Luisa Fanjul, Marcia Hiriart y Francisco Fernández de Miguel (Eds), Biología funcional de los animales. México Siglo Veintiuno Editores.
33. Ferrer, I. 2002. Señalización celular en el hipocampo epiléptico. *Rev. Neurol.* 34(6):544-50.
34. Frerking, M. y Nicoll, R.A. 2000. Synaptic kainate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10(3): 342-51.
35. Frawley, S.L. 1989. Mammosomatotropes: current status and possible functions. *Trends Endocrinol. Metab.* 1:31.
36. Frye, C.A., Rhodes, M.E. y Dudek, B. 2005. Estradiol to aged female or male mice improves learning in inhibitory avoidance and water maze tasks. *Brain Res.* 2:1036 (1-2):101-8.
37. Furuta, M., Bridges, R.S., 2005. Gestation-induced cell proliferation in the rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 156(1): 61-6.
38. Gatewood, J.D., Morgan, M.D., Eaton, M., McNamara, I.M., Stevens, L.F., Macbeth, A.H., Meyer, E.A., Lomas, L.M., Kozub, F.J., Lambert, K.G. y Kinsley, C.H. 2005. Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. *Brain Res. Bull.* 66(2): 91-8.
39. Gonzalez-Burgos, I., Alejandre-Gomez, M. y Cervantes, M. 2005. Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci. Lett.* 379(1): 52-4.
40. Goodman, Y., Bruce, A.J., Cheng, B. y Mattson, M.P. 1996. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 66(5): 1836-44.
41. Grattan, D.R. 2001. The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog. Brain Res.* 133:153-71.
42. Gregg, C. 2009. Pregnancy, prolactin and white matter regeneration. *J. Neurol. Sci.* 285(1-2):22-7.
43. Guimarães, J.S., Freire, M.A.M., Lima, R.R., Souza-Rodríguez, R.D., Costa, A.M.R., dos Santos, C.D., Picanço-Diniz, C.W. y Gomes-Leal, W. 2009. Mecanismos de degeneración secundaria en el sistema nervioso central durante trastornos neuronales agudos y el daño en la sustancia Blanca. *Rev. Neurol.* 48(6):304-10.
44. Hernández-Andrade, E., Villanueva-Díaz, C. y Ahued-Ahued, J.R. 2005. Growth hormone and prolactin in maternal plasma and amniotic fluid during normal gestation. *Rev. Invest. Clin.* 57(5): 671-5.
45. Hilliard, J., Scaramuzzi, R.J., Penardi, R. y Sawyer, C.H. 1973. Progesterone, estradiol and testosterone levels in ovarian venous blood of pregnant rabbits. *Endocrinology* 93:1235-1238.
46. Hock, B.J. y Bunsey, M.D. 1998. Differential effects of dorsal and ventral hippocampus lesions. *J. of Neuroscience* 18(17):7027-7032.
47. Hoffman, G.E., Merchenthaler, I., Zup, S.L., 2006. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine* 29(2): 217-31.

48. Hoffman, S.W. y Stein, D.G. 2003. Concepts of CNS plasticity in the context of brain damage and repair. *J. Head Trauma Rehabil.* 18(4): 317-41.
49. Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R., 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 45(5), 583-95.
50. Kandel, E.R., Schwartz, J.M. y Jessell, T.M. 2000. Principles of neural science. Eds. Kandel ER, Schwartz JM y Jessell TM. Cuarta Edición, McGraw-Hill.
51. Kelley, K.W., Weigent, D.A. y Kooijman, R. 2007. Protein hormones and immunity. *Brain Behav. Immun.* 21(4): 384-92.
52. Kelly, P.A., Djiane, J., Postel-Vinay, M.C. y Ederj, M. 1991. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine Rev.* 12:235-51
53. Keyser-Marcus, L., Stafisso-Sandoz, G., Gerecke, K., Jasnow, A., Nightingale, L., Lambert, K.G., Gatewood, J. y Kinsley, C.H. 2001. Alterations of medial preoptic area in neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. *Brain Res. Bull.* 55(6): 737-45.
54. Kinsley, C.H. y Lambert, K.G. 2008. Reproduction-induced neuroplasticity: natural behavioural and neuronal alterations associated with the production and care of offspring. *J. Endocrinol.* 20(4):515-25.
55. Kinsley, C.H., Trainer, R., Stafisso-Sandoz, G., Quadros, P., Marcus, L.K., Hearon, C., Meyer, E.A., Hester, N., Morgan, M., Kozub, F.J. y Lambert, K.G. 2006. Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm. Behav.* 49, 131-42.
56. Krishnan, N., Thellin, O., Buckley, D.J., Horseman, N.D. y Buckley, A.R. 2003. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* 144(5): 2102-10.
57. Lee, H. y Choi, B.H. 1992. Density and distribution of excitatory amino acid receptors in the developing human fetal brain: a quantitative autoradiographic study. *Exp. Neurol.* 118(3): 284-90.
58. Leff, M.A., Buckley, D.J., Krumenacker, J.S., Reed, J.C., Miyashita, T. y Buckley, A.R. 1996. Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 137(12): 5456-62.
59. Lerma, J. 1997. Kainate reveals its targets. *Neuron* 19(6): 1155-8.
60. Leuner, B., Mirescu, C., Noimain, L., Gould, E., 2007. Maternal experience inhibits the production of immature neurons in the hippocampus during the postpartum period through elevations in adrenal steroids. *Hippocampus* 17, 434-42.
61. Lightman, S.L., Windle, R.J., Wood, S.A., Kershaw, Y.M., Shanks, N. y Ingram, C.D. 2001. Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog. Brain. Res.* 133: 111-29.
62. Llorens-Martín, M., Torres-Alemán, I. y Trejo, J.L. 2009. Mechanisms mediating brain plasticity: IGF1 and adult hippocampal neurogenesis. *The Neuroscientist* (15-2): 134-48.

63. Mangurian, L.P., Walsh, R.J. y Posner, B.I. 1992. Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology* 131(2):698-702.
64. Mann, P.E. y Bridges, R.S. 2001. Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. *Progress in Brain Res.* 18(133): 251-62.
65. McEwen, B. 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent. Prog. Horm. Res.* 57:357-84.
66. McEwen, B.S. y Milner, T.A. 2007. Hippocampal formation: shedding light on influence of sex and stress on the brain. *Brain Res. Rev.* 343-355.
67. McEwen, B.S. y Alves, S.E. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.* 20(3):279-307.
68. Mellon, S.H. y Griffin, L.D. 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* 13(1): 35-43.
69. Miller, J.S. 2001. The biology of natural killer cells in cancer, infection and pregnancy. *Exp. Hematol.* 29(10): 1157-68.
70. Mödersheim, T.A., Gorba, T., Pathipatu, P., Kokay, I.C., Grattan, D.R., Williams, C.E. y Scheepens, A. 2007. Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. *Neurosciences* 145(3): 963-73.
71. Morrel, M.J. 1999. Epilepsy in women: the science of why it is special. *Neurology* 53, S42-8.
72. Neville, M.C., McFadden, T.B. y Forsyth, I. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7(1):49-66.
73. Nicoll, C.S. 1980. Ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Fed. Proc.* 39: 2563-6.
74. Nogami, H., Hoshino, R., Ogasawara, K., Miyamoto, S. y Hisano, S. 2007. Region-specific expression and hormonal regulation of the first exon variants of rat prolactin receptor mRNA in rat brain and anterior pituitary gland. *J. Neuroendocrinol.* 19(8):583-93.
75. Osterlund, M., Kuiper, G.G., Gustafsson, J.A. y Hurd, Y.L. 1998. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 54(1): 175-80.
76. Palomero-Gallagher, N., Bidmon, H.J. y Zilles, K. 2003. AMPA, kainate, and NMDA receptor densities in the hippocampus of untreated male rats and females in estrus and diestrus. *J. Comp. Neurol.* 459(4): 468-74.
77. Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F., Merabet, L.B. 2005. The plastic human brain cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 28: 377-401.
78. Paxinos, G. 1995. The hippocampal formation. En: Paxinos G (Ed), *The rat nervous system.* USA Academic Press.
79. Pawluski, J.L., Galea, L.A., 2006. Hippocampal morphology is differentially affected by reproductive experience in the mother. *J. Neurobiol.* 66(1): 71-81.
80. Pi, Xiu-Jun y Grattan, David 1998. Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J. Comp. Neurol.* 394(4): 462-74.

81. Pike, C.J. 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-x_L Expression and β -amiloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J. of Neurochemistry* 72(4): 1552-63.
82. Posner, B.I., van Houten, M., Patel, B. y Walsh, R.J. 1983. Characterization of lactogen binding sites in choroid plexus. *Exp. Brain Res.* 49(2):300-6.
83. Richards, J.S. y Williams, J.J. 1976. Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH): regulation by LH y PRL. *Endocrinology* 99(6): 1571-81.
84. Rosenblatt, J.S, Mayer, A.D. y Giordano, A.L. 1988. Hormonal basis Turing pregnancy for the Honest of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 1-2(13): 29-46.
85. Rosenzweig, E.S. y Barnes, C.A. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.* 69(3):143-79.
86. Roy, M y Sapolsky, R.M. 2003. The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. *Neuroendocrinology* 77(1): 24-31.
87. Scoville, W.B. y Milner, B. 1957. Loss of recent memory alter bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20(1):11-21.
88. Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C. y Weiss, S. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299(5603):117-20.
89. Shiu, R.P.C. y Friesen, H.G. 1980. Mechanisms of action of prolactin in the control of mammary gland function. *Annu. Rev. Physiol.* 42: 83-96.
90. Standley, C.A., 1999. N.methyl-D-aspartate receptor binding is altered and seizure potential reduced in pregnant rats. *Brain Res.* 844(1-2):10-9.
91. Svennersten-Sjaunja, K. y Olsson, K. 2005. Endocrinology of milk production. *Domestic Animal Endocrinology* 29: 241-58.
92. Takayanagi, Y., Matsumoto, H., Nakata, M., Mera, T., Fukusumi, S., Hinuma, S., Ueta, Y., Yada, T., Leng, G. y Onaka, T. 2008. Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents. *J. Clin. Invest.* 118(12):4014-24.
93. Tomita, S., Byrd, R.K., Rouach, N., Bellone, C., Venegas, A., O'Brien, J.L., Kim, K.S., Olsen, O., Nicoll, R.A. y Bredt, D.S. 2007. AMPA receptors and stargazing-like transmembrane AMPA receptor-regulatory proteins mediate hippocampal kainite neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(47):18784-8.
94. Torner, L., Neumann, I.D., 2002. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* 5(4):249-57.
95. Torner, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, G., Winkler, J., Aigner, L. y Neumann, I.D. 2009. Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J. Neurosci.* 29(6):1826-33.
96. Vanoye-Carlo, A., Mendoza-Rodriguez, C.A., Morales, T., Langley, E. y Cerbón, M. 2009. Estrogen receptors increased expression during

- hippocampal neuroprotection in lactating rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 116(1-2):1-7.
97. Vanoye-Carlo, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza-Rodriguez, A. y Cerbón, M. 2008. Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Horm. Behav.* 53(1):112-23.
 98. Vincent, P. y Mulle, C. 2009. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158(1):309-23.
 99. Walsh, R.J., Slaby, F.J. y Posner, B.I. 1987. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120(5):1846-50.
 100. Wang, L., Hinoi, E., Takemori, A. y Yoneda, Y. 2005. Release of endogenous glutamate by AMPA receptors expressed in cultured rat costal chondrocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 28(6):990-3.
 101. Wisden, W. y Seeburg, P.H. 1993. A complex mosaic of high affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.* 13(8):3582-98.
 102. Yong, V.W. 2009. Prospects of repair in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 277 Suppl 1:S16-8.
 103. Zhang, X., Gelowitz, D.L., Lai, C.T., Boulton, A.A. y Yu, P.H. 1997. Gradation of kainic acid-induced rat limbic seizures and expression of hippocampal heat shock protein-70. *Eur. J. Neurosci.* 9(4): 760-9.

XI. ANEXOS

XI.1 Ciclo estral

Se observan las 4 etapas del ciclo estral de la rata y el tipo celular que en cada una prevalece. Proestro-células epiteliales nucleadas y ausencia de leucocitos, Estro-células cornificadas (escamosas sin núcleo), presencia de mucus y leucocitos, Metaestro- células cornificadas y abundancia de leucocitos y Diestro- escasas células nucleadas y algunos leucocitos.

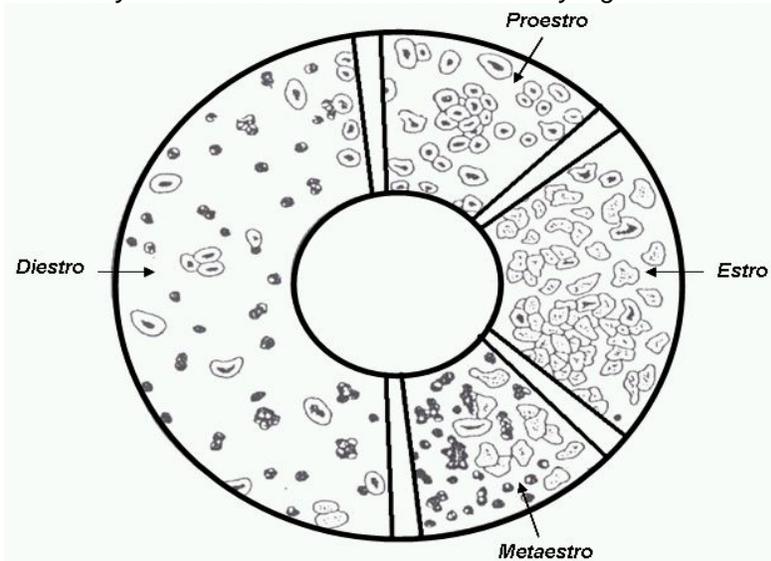


Tabla 1. Se muestran las 4 fases del ciclo estral de la rata y sus características.

Estadio/Céls	OVARIO	UTERO	VAGINA
DIESTRO/ leucocitos/60-70 horas	Folículos pequeños. Cuerpos lúteos gdes (ovulación previa).	Pequeño y con poca motilidad. Glándulas endometriales colapsadas y atróficas.	Epitelio delgado. Leucocitos del estroma migran por el epitelio hacia lumen vaginal.
PROESTRO/ epiteliales	Crecimiento rápido de algunos folículos.	Aumenta vascularización, contenido de agua y contractilidad. Crecen c.epiteliales. Leucocitos desaparecen de la mucosa. Hipertrofia glándulas endometriales.	Engrosamiento epitelial.
ESTRO/ cornificadas	10 hrs después del comienzo de esta etapa ocurre la ovulación. Se liberan de 10-20 óvulos. Receptividad dura 13 hrs.	Vascularización máxima. C. epiteliales en máx. desarrollo. Ausencia de leucocitos.	Capas celulares epiteliales más externas se cornifican y descaman hacia el lumen. Hinchazón de piel en orificio vaginal.
METAESTRO/ cornificadas y leucocitos	Muchos cuerpos lúteos que secretan por cortos periodos. Folículos pequeños.	Epitelio continúa degeneración vacuolar y reemplazo. Leucocitos en estroma. Disminuye vascularización.	Actividad mitótica en epitelio se reduce. Leucocitos en estroma y migrando hacia lumen.

XI.2 Ovariectomía

Objetivo: extripar los ovarios de la hembra.

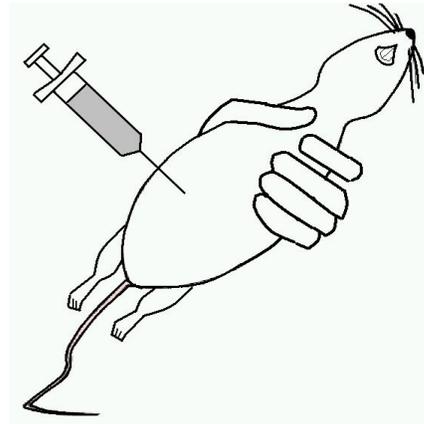
Materiales y método

- 1) 16 ratas hembra vírgenes de la cepa *Wistar* de entre 200-250gr.
- 2) Caja de acrílico transparente de 47cm x 25.5cm x 20cm (altura)
- 3) Guantes de látex y bata
- 4) Piseta con solución salina isotónica
- 5) Mesa de disecciones
- 6) Material para anestesia (jeringa con 3 partes de *Xilocina* -3mL- por 7 partes de *Ketamina* -7mL-), dosis: 1mL/Kg de peso corporal)
- 7) Material para esterilización (alcohol, benzal, algodón, gasas, sanitas)
- 8) Material para disección (bisturí, pinzas de disección, tijeras finas, hilo y aguja para sutura)
- 9) Antibiótico (Penicilina)

Paso 1.

Se sujeta al animal con una mano y se colocan las patas del animal en el costado del investigador o en una mesa haciendo un poco de presión a modo de que éstas no se muevan y de que el abdomen del animal quede expuesto y fijo para introducir la aguja en el cuadrante inferior izquierdo del abdomen, ya que en esta zona no hay órganos vitales, excepto el intestino delgado. Con el objeto de no perforar el intestino y con un movimiento rápido, se introduce solo la punta de la aguja a través de la pared abdominal en la cavidad peritoneal. Una vez en el peritoneo, se inyecta el anestésico, posterior a lo cual, se saca la aguja en la misma dirección en la cual entra previamente (*Esquema 1*).

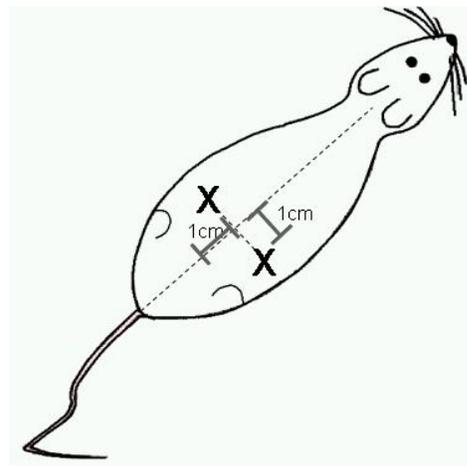
Esquema 1. Muestra la correcta manipulación del animal para aplicar la inyección intraperitoneal del anestésico.



Paso 2.

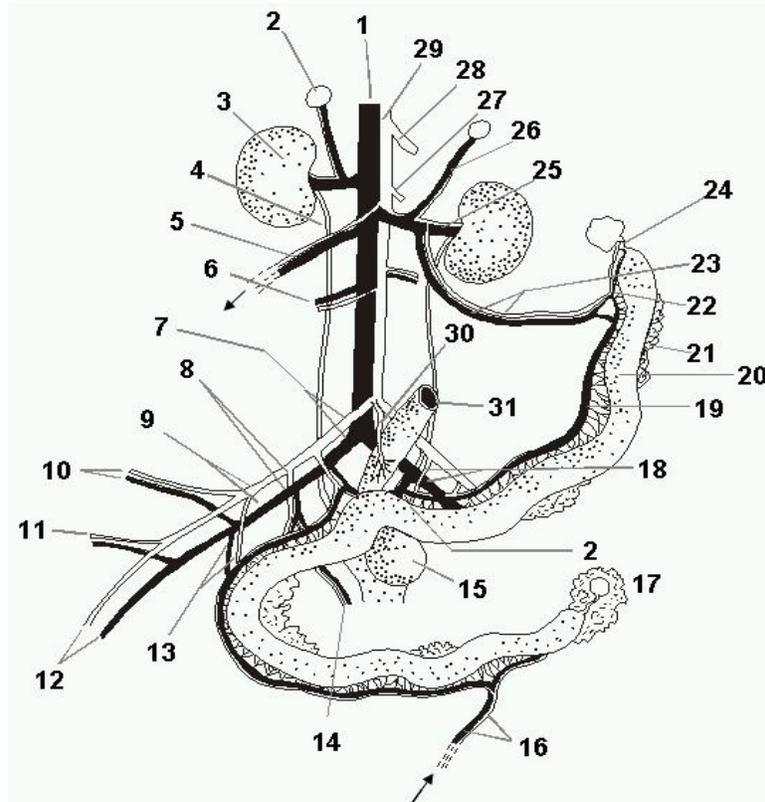
Se rasura, se limpia y se desinfecta a ambos lados de la columna vertebral a la altura de la zona renal del animal (*Esquema 2*).

Esquema 2. Muestra la zona que se limpia, se rasura, se desinfecta y luego se realiza una incisión (X) de aproximadamente 1cm de longitud.



Justo en el área señalada (X) se realizó una incisión de aproximadamente 1cm con el objeto de separar piel y músculo para acceder a las gónadas. Cada ovario se localiza a un lado de la pared posterior del abdomen, justo por debajo de los riñones. Una vez identificados estos, se extraen de la cavidad, se ciñen con hilo de sutura y posteriormente se seccionan. Se vuelve a introducir el tejido y se procede

a suturar, primero músculo para evitar herniado de algún órgano y después piel para una correcta cicatrización (Esquema 3).



Esquema 3. 1) Vena cava posterior, 2) Glándula adrenal, 3) Riñón derecho, 4) Uréter derecho, 5) Arteria y vena útero-ovárica derecha, 6) Arteria y vena ileo-lumbar derecha, 7) Arteria y vena iliaca-común derecha, 8) Arteria y vena iliaca interna derecha, 9) Arteria y vena iliaca externa derecha, 10) Arteria y vena epigástrica, 11) Vasos a glándula mamaria, 12) Arteria y vena femoral, 13) Arteria y vena pudenda derecha, 14) Arteria y vena hemorroidal derecha, 15) Vejiga, 16) Arteria y vena útero-ovárica derecha, 17) Anastomosis de arterias y venas uterina y vesicular, 18) Arteria y vena vesicular izquierda, 19) Arteria y vena uterina izquierda, 20) Útero, 21) Grasa, 22) Arteria y vena ovárica izquierda, 23) Arteria y vena útero-ovárica izquierda, 24) Tubo de falopio entrando a saco peri-ovárico, 25) Arteria y vena renal izquierda, 26) Arteria y vena adrenal izquierda, 27) Arteria mesentérica anterior, 28) Arteria coeliaca, 29) Aorta dorsal, 30) Arteria mesentérica posterior y 31) Recto.

Paso 3.

A la rata aún anestesiada, se le inyecta una dosis subcutánea de antibiótico para evitar infecciones posteriores. Se le monitorea durante las siguientes horas y días para asegurar su completa recuperación.