



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGIA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

EFFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR EL ÁCIDO
KAÍNICO EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA HEMBRA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.I. Julio Daniel Reyes Mendoza

TUTOR

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Instituto de Neurobiología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Instituto de Neurobiología

Dra. Angélica Zepeda Rivera

Instituto de Investigaciones
Biomédicas

MÉXICO, SEPTIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

El presente proyecto de maestría se realizó en el laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Juriquilla Querétaro, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Morales Guzmán.

Dicha investigación fue realizada gracias al programa UNAM-DGPA-PAPIIT-IN202315 e IN202812, además del apoyo económico del CONACYT 128090. El autor contó con beca del CONACYT (298998).

Contó con la guía constante del comité tutorial integrado por:

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Dra. Angélica Zepeda Rivera

Finalmente, agradecemos al apoyo técnico brindado por el personal de INB:

Biol. María Eugenia Ramos Aguilar

I.S.C. Elsa Nydia Hernández Ríos

Dra. Alejandra Castilla León

M.V.Z. Martín García Servín

M. en C. Leonor Casanova Rico

Personal de apoyo del bioterio del INB

Así como de la Dra. Gina Lorena Quirarte por el apoyo en la parte conductual, y la Dra. Maricela Luna Muñoz por los consejos en microscopía confocal.

RESUMEN

El ácido kaínico (KA) es un agonista glutamatérgico usado ampliamente en estudios de neurodegeneración por inducir daño excitotóxico en el cerebro de roedores. Estudios de nuestro grupo han demostrado que durante la lactancia, periodo en el que la prolactina (PRL) tiene una amplia participación, el hipocampo de la rata hembra es menos sensible al efecto deletéreo causado por la administración KA. La administración de PRL de manera crónica y previamente al KA disminuye el daño de este agente en el hipocampo. En este trabajo, investigamos si la PRL puede tener efecto neuroprotector en el hipocampo dorsal cuando su administración es subsecuente a la del KA. Ratas hembra ovariectomizadas (OVX) recibieron por vía intracerebro-ventricular (ICV) 100 ng de KA o 1 μ l de solución salina 0.9%. A continuación se les administró prolactina (103.3 μ g / día / 7 días) o vehículo mediante una mini-bomba osmótica subcutánea y para determinar la tasa neurogénica, se administró BrdU (*5-bromo-2-desoxiuridina*; 100 mg / día / 7 días, IP). Por medio de la detección de inmunofluorescencia de NeuN se determinó la cantidad de neuronas presentes en las áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo dorsal a los 7 y 30 días post administración de KA. Se encontró que la administración de PRL tiene un efecto neuroprotector en el área CA1 ya que los sujetos que solo recibieron el KA presentan una pérdida neuronal significativamente mayor. En el área CA3 y CA4 la PRL no confiere protección ya que la pérdida neuronal es similar al grupo administrado con vehículo. El KA indujo un aumento en la señal inmunopositiva a GFAP en las áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo, a los 7 y 30 días post lesión, indicando la existencia de un proceso inflamatorio en dicha área. En contraste, el tratamiento con PRL redujo la señal GFAP positiva únicamente en el área CA1. Además encontramos que la PRL evita el deterioro cognitivo causado por el KA, evaluado mediante la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR) evaluado uno y 30 días después de la administración de KA. Finalmente, no encontramos modificaciones en la tasa de neurogénesis en los sujetos administrados con PRL, evaluada a través de inmunofluorescencia doble positiva para DCX-BrdU y NeuN-BrdU, 7 y 30 días post lesión respectivamente. Estos datos muestran que la PRL confiere neuroprotección de manera diferencial en áreas del hipocampo

cuando se administra después del daño excitotóxico, lo cual se relaciona con un mejor desempeño cognitivo de los sujetos tratados.

ABSTRACT

Kainic acid (KA) is a glutamate agonist widely used in experimental neurodegeneration studies because it induces excitotoxic damage in the rodent brain. Studies from our group have shown that during lactation, when plasmatic prolactin (PRL) level are high, the female rat hippocampus is less sensitive to the deleterious effect caused by the KA administration. Chronic PRL administered before KA-induced damage, attenuates the neuronal death in the hippocampus. In this work, we investigated if PRL has a neuroprotective effect in the dorsal hippocampus when its administration follows the lesion. For this purpose, ovariectomized female rats (OVX) were administered intracerebroventricularly (ICV) with 100ng of KA or 1 μ l of 0.9% saline, and received subcutaneous PRL (103.3 μ g / day / 7 days) or vehicle delivered via osmotic minipump. To determine the neurogenic rate, rats were injected during 7 days with BrdU (5-bromo-2-desoxyuridine; 100mg / day / 7 days, IP). By immunodetection of NeuN, we determined the neuronal density in CA1, CA3 and CA4 hippocampal areas at 7 and 30 days post-administration of KA. Neuronal loss was significantly lower in the CA1 area of PRL-treated rats compared with the untreated group indicating that PRL administration has a neuroprotective effect. On CA3 and CA4 areas, PRL did not provide protection because the neuronal loss was similar to the untreated group. The KA lesion increased the GFAP-positive signal in all hippocampal areas in all KA-treated groups, as measured at 7 and 30 days after the damage, indicating the existence of an inflammatory process. PRL just decreases GFAP signal in CA1. The cognitive deficit induced by KA, evaluated by the novel object recognition test (NOR), was prevented by PRL administration. Finally, using immunodetection for DCX-BrdU and NeuN-BrdU, no modifications in the neurogenesis rate in the subjects administered with PRL were observed. These results show that when PRL is administered after excitotoxic damage, it confers differential neuroprotection in the hippocampal areas, which relates to a better cognitive performance in the KA-PRL-treated subjects.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. EXCITOTOXICIDAD.	2
2.1. EXCITOTOXICIDAD POR ÁCIDO KAÍNICO (KA).	3
2.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ÁCIDO KAÍNICO.	4
2.2. NEUROPROTECCIÓN.	5
2.2.1. HIPOCAMPO.	6
2.3. EXCITOTOXICIDAD Y LACTANCIA.	7
2.4. EXCITOTOXICIDAD Y PROLACTINA.	9
2.4.1. PROLACTINA.	9
2.4.2. PROLACTINA Y ÁCIDO KAÍNICO.	11
2.4.3. PROLACTINA Y NEUROGÉNESIS.	13
3. HIPOCAMPO. APRENDIZAJE Y MEMORIA.	14
3.1. RECONOCIMIENTO DE OBJETOS NOVEDOSOS.	14
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	16
5. JUSTIFICACIÓN.	17
6. HIPÓTESIS.	18
7. OBJETIVOS.	19
8. MATERIAL Y MÉTODO.	20
8.1. SUJETOS.	20
8.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.	20
8.3. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO.	23
8.4. INMUNOFLUORESCENCIA.	25
8.5. OBTENCIÓN DE DATOS.	27
8.5.1. CONTEO CELULAR.	27
8.5.2. DENSIDAD ASTROCÍTICA.	27
8.5.3. NEUROGÉNESIS.	28
8.5.4. PREFERENCIA DE EXPLORACIÓN.	28
8.5.5. CAMPO ABIERTO.	28
8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	29

9. RESULTADOS.30
9.1 LA ADMINISTRACIÓN DE PRL DISMINUYE LA PÉRDIDA NEURONAL EN CA1.30
9.2. EL TRATAMIENTO CON PRL DISMINUYE NÚMERO DE CÉLULAS GFAP POSITIVAS EN CA1.32
9.3. EL TRATAMIENTO CON PRL PRESERVA EL NÚMERO DE NEURONAS EVALUADO 30 DÍAS POST LESIÓN.33
9.4. EL TRATAMIENTO CON PRL REDUCE LA ASTROGLIOSIS EN CA.34
9.5. EL TRATAMIENTO CON PRL EVITA EL DETERIORO COGNITIVO CAUSADO POR EL KA.36
9.6. LA ADMINISTRACIÓN DE PRL NO MODIFICA LA TASA DE NEUROGÉNESIS DEL HIPOCAMPO.39
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.42
11. CONCLUSIONES.50
12. REFERENCIAS.51
13. ANEXOS.59
13.1 ANEXO I. OVARIECTOMÍA.59
13.2 ANEXO II. INYECCIÓN INTRACEREBRO-VENTRICULAR (ICV).60
13.3 ANEXO III. IMPLANTE DE BOMBA MINIOSMÓTICA.62
13.4 ANEXO IV. PRUEBA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS.63

1. INTRODUCCIÓN

El fenómeno de excitotoxicidad es un proceso patológico que causa lesión o muerte de neuronas debido a una sobre-activación de los receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato, tales como el receptor NMDA y AMPA. Éste es un proceso altamente involucrado en eventos deletéreos del sistema nervioso central y ocurre en diversas condiciones fisiopatológicas tales como enfermedades neurodegenerativas, traumatismos craneoencefálicos, entre otros (Albensi, 2001).

El hipocampo, es una estructura cerebral involucrada en procesos cognitivos de alto orden como aprendizaje y memoria, es extremadamente sensible a la excitotoxicidad debido a la gran densidad de receptores a glutamato, el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso. En concentraciones normales, el glutamato está asociado con procesos benéficos como la plasticidad sináptica. Sin embargo, cuando su concentración en la sinapsis se ve aumentada excesivamente, éste genera una entrada excesiva del ion calcio a la neurona lo cual genera la activación de diversas enzimas como proteasas, lipasas y nucleasas las cuales eventualmente llevan a las células a muerte apoptótica o necrótica (Faherty, Xanthoudakis y Smeyne, 1999; Wang y colaboradores, 2005).

Actualmente se sabe que existen sustancias que pueden tener un efecto neuroprotector en el hipocampo, es decir tienen la capacidad de mantener la integridad anatómica-funcional del sistema frente a un insulto. Entre dichas sustancias se encuentran factores tróficos como el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), hormonas gonadales como progesterona, hormonas peptídicas como la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PRL), entre otros elementos (Redolat y Carrasco, 2007; Tejadilla, Cerbón y Morales, 2010).

En nuestro laboratorio, se ha demostrado que durante la lactancia, el hipocampo de las ratas lactantes presenta neuroprotección, ya que cuando se le somete a un daño excitotóxico dado por el agonista glutamatérgico ácido kaínico (KA, por sus siglas en

ingles), la pérdida neuronal es menor que el de ratas no lactantes. Además, estudios posteriores demostraron que la administración de PRL, la cual es una hormona cuya concentración plasmática esta incrementada en la lactancia, puede generar un efecto protector de magnitud similar al de la lactancia cuando esta hormona se administra antes de someter al sujeto al daño excitotóxico por KA, la PRL es independiente de la presencia de hormonas gonadales (Tejadilla, Cerbón y Morales, 2010).

Considerando lo anterior y sabiendo que el fenómeno de neuroprotección se refiere a evitar la pérdida neuronal causada por un determinado insulto, en este trabajo determinamos si la PRL administrada después de inducir la lesión con KA puede tener un efecto neuroprotector similar al visto cuando ésta se administra de forma previa. Además, se evaluó si esta neuroprotección se relaciona con una disminución del déficit cognitivo que se presenta por la administración de KA, determinado mediante la prueba de reconocimiento de objetos novedosos, la cual es dependiente de la integridad del hipocampo.

2. EXCITOTOXICIDAD

La excitación neuronal en el sistema nervioso central generalmente involucra a receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópico clasificados en NMDA y AMPA/kainato (Cardinali, 2007). Ambos participan en diferentes eventos en el sistema nervioso como fenómenos de plasticidad sináptica. Sin embargo, la activación exacerbada de estos receptores puede llevar a un evento denominado excitotoxicidad, que se refiere a un proceso patológico que causa lesión o muerte de neuronas debido a una sobre-activación de los receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato, el cual está implicado en la pérdida neuronal vista en diferentes estados fisiopatológicos como la epilepsia, lesiones causadas por el traumatismo cráneo-encefálico y la hipoxia-isquemia (Albensi, 2001).

En la actualidad se cuenta con una gran cantidad de sustancias que pueden inducir excitotoxicidad al interactuar con los receptores ionotrópicos del glutamato, entre ellos se encuentran el NMDA (*N-metil-D-aspartato*) (Zhou , Hollern y colaboradores, 2013), *ácido*

domoico (Chandrasekaran, Ponnambalam y Kaur, 2004; Pérez-Gómez y Tasker, 2012), ácido kaínico (Zheng, Zhang y colaboradores, 2011), entre otros. En nuestro laboratorio, se ha tomado ventaja del modelo de lesión por KA para investigar cambios en la sensibilidad al daño debido a un estado reproductivo especial como la lactancia y acciones protectoras por la acción de hormonas como la prolactina en el hipocampo de ratas hembra.

2.1. EXCITOTOXICIDAD POR ÁCIDO KAÍNICO (KA)

El KA (Figura 1), es una sustancia aislada de la alga roja *Digenea simplex*, que crece en zonas subtropicales. Inicialmente fue utilizado como un antihelmíntico y estudios posteriores revelaron que esta sustancia es un análogo del glutamato. El KA posee una afinidad 30 veces mayor al glutamato por el receptor AMPA/kainato (Bleakman y Lodge, 1998). Actualmente el KA se utiliza en estudios sobre neurodegeneración debido a la distribución anatómica de sus receptores así como por su capacidad de inducir muerte neuronal por excitotoxicidad.

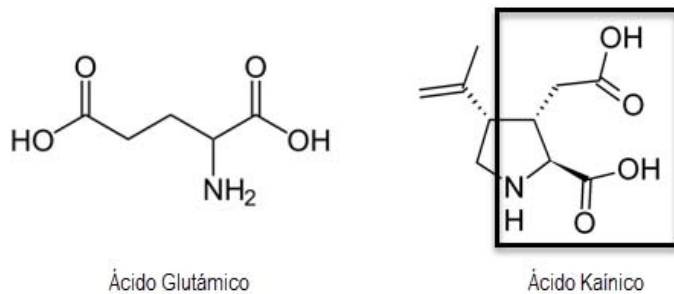


Figura 1. Molécula del ácido kainico y el ácido glutámico. Se muestra la gran similitud del KA (cuadro negro) con el glutámico o glutamato.

En el cerebro de los roedores, la mayor densidad de receptores tipo kainato (KARs, por sus siglas en inglés) se encuentra en la corteza, la amígdala y principalmente en el hipocampo (Botana, 2000). En este último, es el área CA3 la que presenta mayor concentración de estos receptores seguida del giro dentado y el área CA1, con una menor densidad. Esta distribución se ha observado en el cerebro de ratas macho y hembra (Palomero-Gallagher, Bidmon y Zilles, 2003).

La unión del KA con su receptor desencadena una larga cascada de señalización intracelular. Esta estimulación resulta en el incremento del calcio intracelular a niveles que superan los mecanismos homeostáticos de la célula. Dicha cascada involucra la activación de diversas enzimas y sustancias nocivas para la neurona como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que finalmente llevarán a ésta a morir por apoptosis o necrosis.

2.1.1. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ÁCIDO KAÍNICO

La interacción ligando-receptor del KA con el receptor AMPA/Kainato desencadena una gran cantidad de eventos al interior de la célula iniciadas por el rápido incremento de calcio intracelular (Figura 2). Dicho aumento en la concentración de calcio está mediado por diferentes factores: 1) La entrada de sodio por la activación del receptor AMPA/Kainato lo cual mantiene despolarizada la neurona. 2) La activación del receptor NMDA, el cual es permeable al ion calcio, debido a una liberación de glutamato por la acción del KA en la pre-sinapsis 3) La activación de canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales permiten el ingreso a la neurona de más calcio. El incremento en el calcio intracelular, lleva a la activación de enzimas dependientes de calcio (proteasas, fosfolipasas, lipasas y nucleasas). La activación de estas enzimas puede dañar directamente a la membrana mitocondrial e inducir la formación de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) o sustancias reactivas de nitrógeno (RNS) (Arundine y Tymianski, 2003). La acumulación de estas sustancias puede colapsar la función mitocondrial al dañar su estructura. El daño mitocondrial trae como consecuencia un deterioro energético, así como la liberación del citocromo C por el daño causado a la membrana mitocondrial. El citocromo C se enlaza con la Apaf-1 y la caspasa 9, lo que da lugar a la formación del complejo apoptosoma que a su vez activa la vía de la caspasa 3 (Faherty, Xanthoudakis, y Smeyne, 1999). La activación de esta vía lleva finalmente a la fragmentación del DNA y a la muerte celular por apoptosis. Por otra parte, la generación de ROS y RNS induce daños sobre el DNA, las proteínas del citoesqueleto y los lípidos, lo que trae como consecuencia el daño irreversible en la membrana celular por la

peroxidación de lípidos y la muerte celular por necrosis (Wang, Yu y colaboradores, 2005).

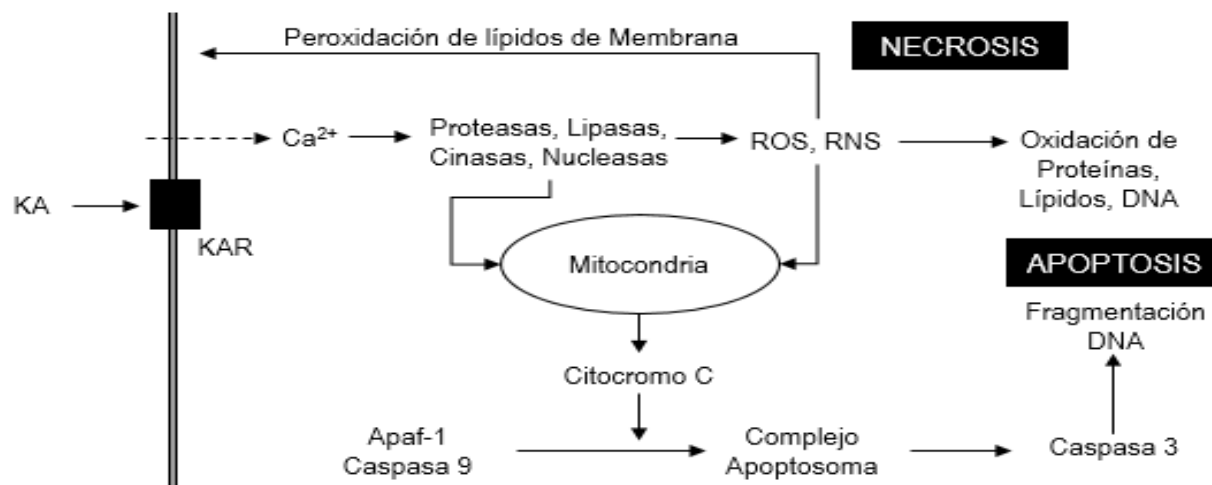


Figura 2.-Mecanismo de acción del ácido kaínico. Descripción en el texto. Abreviaturas: KA: ácido kaínico, ROS: sustancias reactivas de oxígeno, RNS: sustancias reactivas de nitrógeno.

Considerando entonces que el KA induce muerte neuronal la cual puede presentarse solo en sitios determinados del cerebro, en el presente trabajo utilizamos dicho modelo para evaluar el efecto neuroprotector de la prolactina en el hipocampo, la cual es una estructura cerebral altamente sensible a dicho agonista debido a la gran densidad de KARs que presenta.

2.2. NEUROPROTECCIÓN

El término neuroprotección se define como el conjunto de procesos que resultan en evitar la pérdida neuronal frente a un determinado insulto, por ejemplo: disminución del estado inflamatorio, inhibición de la apoptosis, reducción del estrés oxidativo, etc. (Majid, 2014).

Actualmente se conoce una gran cantidad de sustancias que pueden jugar un papel neuroprotector del cerebro, entre ellas están factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-1), factor de crecimiento nervioso (NGF), entre otros; así como enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y reductasa; las hormonas como los estrógenos, la

progesterona, la testosterona, la hormona del crecimiento (GH), las hormonas tiroideas, y la prolactina (Redolat y Carrasco, 2007).

Algunas de las moléculas mencionadas en el párrafo anterior han probado tener efecto neuroprotector cuando el sujeto de investigación es sometido a un daño excitotóxico causado por la administración de ácido kaínico. Por ejemplo, el tratamiento con progesterona previamente a la inducción del daño ha demostrado atenuar el déficit cognitivo, causado por la administración de KA, evaluado en una tarea espacial dependiente del hipocampo (Frye y Walf, 2010), y en particular, se ha documentado que la administración a dosis supra-fisiológicas de prolactina disminuye el daño por KA en el hipocampo de ratas hembra (Tejadilla y colaboradores., 2010; Morales y colaboradores, 2014).

2.2.1. HIPOCAMPO

El hipocampo es una estructura cerebral implicada principalmente en funciones como el aprendizaje asociativo, memoria espacial y contextual, control de la atención y modulación de la respuesta al estrés (Andersen y colaboradores, 2007). Esta estructura se compone principalmente dos tipos de neuronas, las piramidales que forman la citoarquitectura del área CA1, CA3 y CA4; y las granulares que forman al giro dentado (figura 3). La formación del hipocampo está compuesta por tres capas fundamentales, la polimórfica, la piramidal y la molecular (Bustamante, 2007).

La conectividad aferente (vía extrínseca) al hipocampo está dada principalmente por los axones provenientes de la corteza entorrinal (vía perforante). Éstos conectan con el giro dentado, que a su vez se conecta con el área CA3 a través de las fibras musgosas. Finalmente, las neuronas de CA3 envían proyecciones hacia el área CA1 denominadas las colaterales de Schaffer, dando como resultado un circuito tri-sináptico (Teyler & Discenna, 1984). En general, la mayor parte de las sinapsis del circuito del hipocampo son de carácter glutamatérgico y son moduladas principalmente por una gran variedad de interneuronas (Chamberland y Topolnik, 2012).

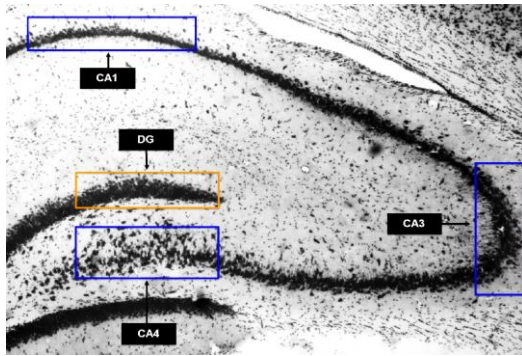


Figura 3.- Microfotografía de un corte transversal del hipocampo que muestra las principales regiones. CA= Cuerno de *Amonis* (CA1, CA3 y CA4). DG: Giro dentado.

Esta estructura cerebral ha sido ampliamente estudiada por diversas razones, entre las más relevantes se encuentra el hecho de que en el área subgranular del giro dentado se ha observado neurogénesis en la edad adulta (Kuhn, Dickinson-Anson y Gage, 1996; Eriksson y colaboradores, 1998), la cual puede ser clave en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Además, esta estructura se ha relacionado con procesos de aprendizaje y memoria (Broadbent, Squire y Clark, 2004), por lo que se han podido hacer correlaciones entre la funcionalidad y la modificación del circuito por diferentes agentes físicos como el entrenamiento y el ejercicio, factores químicos como las hormonas, o por algún evento deletéreo para el hipocampo.

Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos evaluado el efecto neuroprotector conferido por la lactancia y por hormonas como la prolactina en el hipocampo de la rata, utilizando el modelo de excitotoxicidad neuronal causada por el ácido kaínico, ya que por la alta densidad de receptores kainato en esta estructura, es relativamente sencillo causar un daño de esta naturaleza.

2.3. EXCITOTOXICIDAD Y LACTANCIA

La lactancia es un estado reproductivo en el que existe una gran variedad de cambios fisiológicos en la madre, que son necesarios para garantizar su supervivencia así como la de sus crías. Algunas de estas modificaciones incluyen alteraciones en los niveles de hormonas esteroides como estrógenos y progesterona, así como de hormonas peptídicas como prolactina y oxitocina (Lauwers y Swisher, 2011).

En estudios realizados por nuestro grupo, se demostró que en ratas lactantes existe un estado de protección en el hipocampo ante la pérdida neuronal causada por el KA a las dosis de 7.5 y 5.0 mg/Kg, comparado con ratas vírgenes (Vanoye-Carlo, Morales y colaboradores, 2008). En dicho trabajo se observó que la disminución significativa en la densidad celular en áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo inducida por KA no se presentó en ratas lactantes a diferencia de las ratas vírgenes quienes fueron muy susceptibles al daño excitotóxico y mostraron una pérdida neuronal de alrededor del 50 % con respecto de su control no dañado (Figura 4).

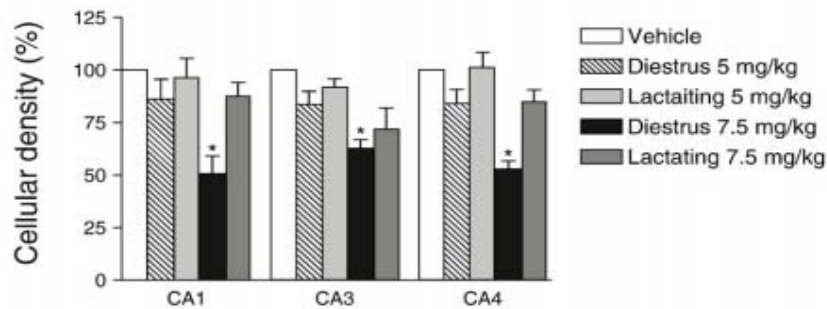


Figura 4.- Densidad celular en el hipocampo de ratas lactantes y ratas vírgenes en fase de diestro después de daño excitotóxico por kainato a dos concentraciones (5.0 y 7.5mg/Kg). (Modificado de Vanoye-Carlo, 2008).

Además de lo anterior, los autores observaron una menor activación de caspasa 3 y un menor grado de neurodegeneración, evaluado por la técnica de fluoro-jade C, en ratas lactantes comparado con ratas vírgenes. Con ello se demostró que existe una menor sensibilidad ante el daño celular (por apoptosis y necrosis) inducido por KA en el cerebro de la rata lactante.

De forma complementaria, un estudio posterior demostró que el daño progresivo causado por el KA no se presentó en el hipocampo de la rata lactante al analizarlo a las 72 h post-lesión (Figura 5), lo cual indicó que la lactancia no está retrasando el daño causado por KA sino que de hecho lo disminuye (Cabrera y colaboradores, 2009).

Con lo anterior, se hace evidente que las ratas lactantes poseen un estado de neuroprotección contra el daño causado por el KA, el cual puede deberse a la acción de hormonas gonadales como estrógenos y progesterona o peptídicas como oxitocina y

prolactina, todas ellas encontradas en altas concentraciones durante este periodo. Dado que el objetivo de esta tesis es determinar la acción protectora de la prolactina, revisaremos brevemente información sobre esta hormona.

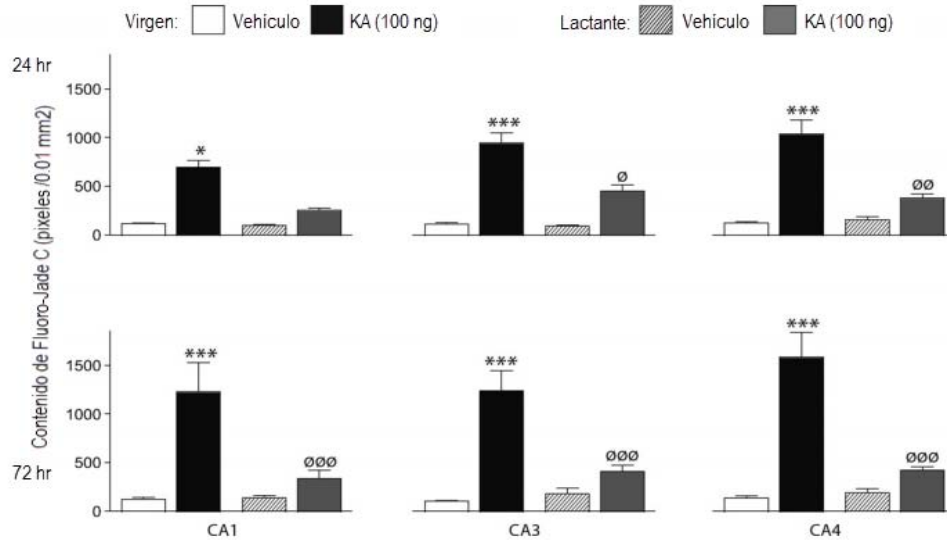


Figura 5.- Densidad de Fluoro-Jade C en diferentes áreas del hipocampo (CA1, CA3 y CA4) de ratas vírgenes y lactantes. La administración de KA, induce una menor densidad de Fluoro Jade-C en ratas lactantes comparado con ratas vírgenes en ambos tiempos medidos (24 y 72 hr). (Modificado de: Cabrera, 2009).

2.4. EXCITOTOXICIDAD Y PROLACTINA

2.4.1. PROLACTINA

La prolactina (PRL), también conocida como hormona lactogénica es una hormona peptídica de entre 197 y 199 aminoácidos dependiendo de la especie. Es una molécula que se le ha relacionado principalmente con la lactancia y con funciones de carácter reproductivo, si bien se le han descrito más de 300 acciones diversas.

Desde que Stricker y Grueter en los años 20's del siglo pasado demostraron que extractos de hipófisis bovina podían inducir el fenómeno de lactación en conejos (Stricker y Grueter, 1928), la investigación relacionada con las acciones de la PRL ha sido amplia en diferentes áreas de la investigación como conducta, metabolismo, respuesta inmune,

osmoregulación, desarrollo y crecimiento, entre otras (Bole-Feysot, 1998; Freeman y colaboradores, 2000). De hecho, se ha reportado que esta hormona puede desempeñar más de 300 funciones en diferentes organismos, lo que significaría una mayor cantidad comparada con todas las hormonas hipofisarias juntas. Esto se asocia con la casi ubicua localización de sus receptores (Bole-Feysot, 1998).

La síntesis de prolactina se da mayoritariamente en la adenohipófisis por las células denominadas lactotopos. Sin embargo, se ha encontrado que además se puede sintetizar en otros tejidos como en la placenta, glándula mamaria, el timo, huesos, entre otros (Freeman y colaboradores, 2000). Además existe evidencia acerca de la síntesis de prolactina en el sistema nervioso central como en el hipotálamo, amígdala, hipocampo, entre otras regiones; lo cual genera la posibilidad de que la prolactina sintetizada a nivel central pueda tener acciones a nivel local. Por otra parte, se ha encontrado que la PRL sintetizada a nivel periférico puede acceder al SNC mediante un transportador encontrado en el plexo coroideo que es capaz de transportarla de la sangre al fluido cerebro espinal y por lo tanto generar diferentes efectos (Walsh, Posner Barry y Patel , 1984; Walsh, Slaby y Posner, 1987; Grattan, 2001).

En cuanto al receptor de prolactina (RPRL), es una proteína transmembranal de alta afinidad perteneciente a la familia de receptores a citoquinas clase I, el cual comparte gran similitud con el receptor de la hormona del crecimiento (RGH) (Yen, Jaffe, y Barbieri, 2001). Existen varias isoformas del receptor denominadas según la longitud y composición del residuo citoplasmático que pueden formar el receptor largo, intermedio y corto. En el humano se sabe que existen 3 isoformas de RPRL, una larga y dos cortas mientras que en la rata existen las tres isoformas del RPRL. En cuanto a la vía de señalización intracelular desencadenada por el complejo hormona/receptor se incluye a la vía de las JAK-STAT (Señales transductoras y activadoras de transcripción), la de las MAP cinasas (Proteínas cinasas activadas por mitógeno); y la vía de las AKT (Proteínas serina / treonina cinasas) (Pfaff, 2002). Cada una de ellas está asociada con diferentes efectos como proliferación, supervivencia y diferenciación, entre otros (Figura 6).

Como se mencionó anteriormente, se han descrito más de 300 funciones de la PRL en distintos tejidos de organismos diversos. Algunas de estas acciones se han descrito en el cerebro, por ejemplo se le ha relacionado con la regulación de respuestas al estrés (Torner y Neumann, 2002), y la estimulación de la neurogénesis (Shingo T., 2003), entre otras.

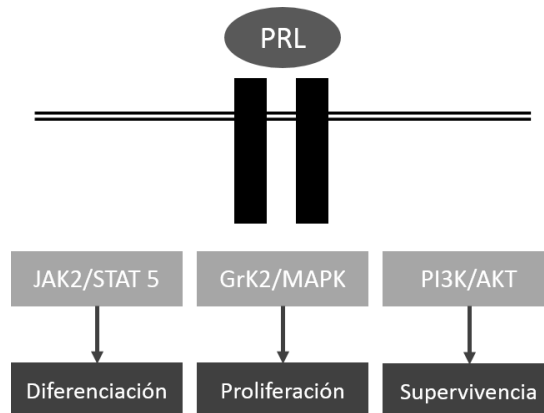


Figura 6.- Vías de señalización de la Prolactina. PRL: Prolactina. Modificado de Pfaff, 2002.

También, la PRL tiene varias acciones relacionadas con la reproducción como la inducción de la conducta maternal (Bridges, Numan y colaboradores, 1990) y como ya se mencionó, se ha encontrado que el tratamiento previo con la PRL protege al hipocampo de ratas hembras al disminuir el daño inducido por KA (Tejadilla y colaboradores., 2010).

2.4.2. PROLACTINA Y ÁCIDO KAÍNICO

Como se mencionó antes, durante la lactancia se encuentran incrementados los niveles de varias hormonas, entre ellas la PRL la cual está relacionada con la síntesis de leche por la glándula mamaria. Dado que esta hormona puede estar implicada en la neuroprotección observada durante la lactancia, nuestro grupo ha investigado el efecto de esta hormona en el modelo experimental de daño por KA. Tejadilla y colaboradores en 2010, encontraron que la administración de prolactina en ratas ovariectomizadas disminuye la pérdida de neuronas en áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo cuando se administra antes de someter a los sujetos de experimentación a un daño excitotóxico por KA (Figura 7). Además, de forma similar los trabajos en ratas lactantes, la administración

de PRL disminuye la muerte neuronal, evaluada por la técnica de fluoro-jade C (Tejadilla, Cerbón y Morales, 2010).

Dichos resultados aportan clara evidencia sobre el papel neuroprotector de la prolactina en el hipocampo, el cual es independiente de las hormonas gonadales que han probado tener efectos similares en el hipocampo sometido a daño, como se expuso anteriormente.

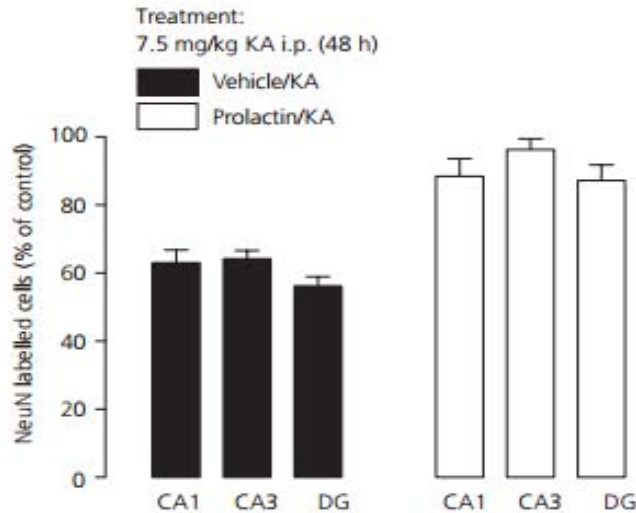


Figura 7.- Administración crónica de PRL disminuye la pérdida neuronal causada por la administración de KA comparado con la administración del vehículo (Sol. Salina 0.9%) en ratas ovariectomizadas. (Tomado de: Morales, 2011).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el término neuroprotección se refiere a **evitar la muerte neuronal** frente a una lesión. Por ello, se puede decir que en efecto, la PRL confiere neuroprotección al hipocampo de la rata. La forma en que dicha hormona puede llevar a cabo este efecto protector involucra una gran variedad de procesos posibles, entre ellos están los cambios en la neurotransmisión, efectos antiapoptóticos o antinecróticos, la regulación en la expresión de factores tróficos, la modificación de la respuesta glial, entre otros. Además de su papel protector, la PRL se ha relacionado con el proceso de neurogénesis (Torner y colaboradores, 2009), el cual ha sido implicado en procesos de recuperación de funciones cognitivas (Kleindienst, 2005), entre otras.

2.4.3. PROLACTINA Y NEUROGÉNESIS

La neurogénesis se define como el proceso de generación de neuronas funcionales a partir de precursores neurales. Es un proceso muy abundante en la etapa embrionaria y en el caso de la etapa adulta, se restringe a dos lugares únicos: La zona subventricular (SVZ, por sus siglas en inglés) del ventrículo lateral y en la zona subgranular (SGZ, por sus siglas en inglés) del giro dentado del hipocampo (Kuhn, Dickinson-Anson, y Gage, 1996; Eriksson y colaboradores, 1998; ver revisión: Konefal, Ellior y Crespi, 2013). El proceso neurogénico involucra proliferación de precursores neurales, la especificación del destino neural, la maduración neuronal, el establecimiento del blanco e integración de las neuronas recién nacidas en la red neuronal existente (Ming y Song, 2005).

En algunos trabajos experimentales, se ha observado que la administración de prolactina puede modificar la tasa de neurogénesis en el hipocampo. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Bartlett y colaboradores en 2012 se reportó que la administración de PRL en cultivos *in vitro* generó un incremento en el número de neuroesferas obtenidas a partir del giro dentado del hipocampo de ratones. Por otra parte, el cultivo de neuroesferas obtenidas de ratones *knock out* de PRL fue menor comparado con ratones control que producían normalmente prolactina, indicando que la PRL tiene un papel en la generación de precursores neurales. Sin embargo, al contabilizar el número de precursores neurales en el hipocampo, no encontraron diferencias entre los ratones *knock out* y los que sintetizan PRL. Lo anterior puede decirnos que el evento neurogénico es dependiente de diversos factores, en el cual la prolactina posiblemente no juega un papel primordial para que se genere dicho proceso. Además, en dicho trabajo se demostró que en ratones carentes de PRL existe una alteración en tareas de aprendizaje y memoria, las cuales fueron restauradas una vez que se administró PRL (Walker y colaboradores, 2012).

Por otra parte, en un estudio realizado por Torner en el 2009, se demostró que la administración de PRL evita la disminución de precursores celulares en el hipocampo del ratón cuando éstos son sometidos a estrés crónico y además produce un incremento de nuevas neuronas, en contraste con sujetos estresados no tratados y no estresados, lo

cual indica que la PRL puede promover el destino neuronal a partir de precursores celulares (Torner y colaboradores, 2009), siendo este un evento importante en el proceso neurogénico.

Con los trabajos anteriores se sugiere que la PRL puede impactar sobre la neurogénesis en condiciones fisiológicas normales y cuando el sistema es sometido a un daño. Además, esta hormona puede mejorar el desempeño en tareas de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo.

3. HIPOCAMPO. APRENDIZAJE Y MEMORIA

Como se mencionó anteriormente, el hipocampo es una estructura cerebral implicada principalmente en diversas funciones como la modulación de la respuesta al estrés, el proceso de atención así como en el aprendizaje y la memoria (Andersen y colaboradores, 2007) espacial y no espacial (Broadbent, Squire, & Clark, 2004), entre otras. Por lo anterior, dicha estructura se ha analizado para hacer correlaciones entre la administración de un determinado fármaco (Gobbo & O'Mara, 2004), la integridad o el daño de las áreas que lo componen, el efecto que pueden tener ciertas actividades como el ejercicio (Van der Borght y colaboradores, 2007) o la conducta sexual, etc. y la ejecución de diversas conductas, como parte del proceso de aprendizaje y memoria.

Actualmente, existe una gran variedad de tareas o pruebas que se utilizan para la evaluación del aprendizaje y memoria que son dependientes del hipocampo, entre ellas se encuentran: El laberinto acuático de Morris (Morris, 1984) y el laberinto en T (Gross & Black, 1968), el condicionamiento de miedo al contexto y reconocimiento de objetos novedos.

3.1. RECONOCIMIENTO DE OBJETOS NOVEDOSOS

La prueba de reconocimiento de objetos novedos (NOR, por sus siglas en inglés) que permite la evaluación de la memoria del sujeto tratado, esta basado en la conducta innata

de las ratas a explorar objetos novedos en lugar de objetos familiares presentados previamente (Berlyne, 1950). En términos generales la prueba consiste en dos fases. La primera se denomina fase de familiarización, en la cual al sujeto le son presentados dos objetos idénticos dentro de la caja de experimentación, los cuales explora libremente durante un tiempo determinado antes de regresar a su caja “hogar”.

La segunda fase o de prueba, consiste en colocar al sujeto en la caja de experimentación un determinado tiempo despues, en presencia de un objeto de la fase de familiarización y un objeto nuevo o novedoso. En esta fase se espera que el animal despliegue la conducta descrita por Berlyne y por lo tanto tenga un tiempo de interacción mayor con el objeto novedoso que con el familiar. En dicha prueba, a diferencia de otras como el laberinto de Morris o el condicionamiento de miedo a contexto, no existe una fase de entrenamiento ni se hace uso de reforzadores o castigos para desplegar la conducta (Bevins & Besheer, 2006; Antunes & Biala, 2011).

En la literatura, se ha reportado la participación de diferentes estrcuturas cerebrales que estarían participando en la ejecución de la tarea de NOR, entre ellas se describen la corteza perirrinal y al hipocampo (Antunes & Biala, 2011) específicamente en su región CA1 (Rampon, y otros, 2000; Broadbent, Squire, & Clark, 2004; Broadbent, Gaskin, Squire, & Clark, 2009; Cohen, y otros, 2013).

En el caso del presente trabajo fue utilizada la tarea de reconocimiento de objetos novedos como una medida para la evaluación de la integridad y funcionalidad del hipocampo en animales lesionados que recibieron el tratamiento con PRL.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las evidencias mencionadas anteriormente, demuestran el papel neuroprotector de la lactancia frente a un daño excitotóxico causado por el KA, y dicho efecto puede estar mediado por diferentes hormonas, entre ellas la prolactina como demostraron los trabajos hechos por Tejadilla y colaboradores en 2010 y por Morales y colaboradores en 2014. Sin embargo, se desconoce si ¿La PRL puede ejercer un efecto protector cuando se administra después un evento excitotóxico?.

Con el presente trabajo se pretendió determinar si la PRL administrada posteriormente al KA tiene un efecto protector, y si la acción de la prolactina se relaciona con un incremento en la neurogénesis causada por el daño.

5. JUSTIFICACIÓN

Dado que:

- 1) El daño excitotóxico es un evento involucrado en varias fisiopatologías que afectan al sistema nervioso como la hipoxia-Isquemia, epilepsia y traumatismo craneoencefálico, entre otras.
- 2) El hipocampo es una de las estructuras cerebrales mas sensibles al daño excitotóxico debido a la gran cantidad de receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA/Kainato.
- 3) El deterioro del hipocampo puede reflejarse en alteraciones de diferentes procesos cognitivos como aprendizaje y memoria.
- 4) La prolactina protege al hipocampo de la rata hembra cuando se administra previamente a una lesión excitotóxica.
- 5) La prolactina aumenta la tasa de neurogénesis en el bulbo olfatorio y en el hipocampo de roedores.

Entonces resulta de interés investigar si la administración de la hormona prolactina tiene un efecto protector similar al encontrado por Tejadilla en 2010, cuando se administra después de la inducción del daño excitotóxico y si la hormona aumenta la tasa neurogénica en el giro dentado bajo las condiciones deletéreas causadas por el ácido kaínico.

6. HIPÓTESIS

La administración de PRL disminuirá la pérdida neuronal causada por el KA en hipocampo dorsal de la rata hembra ovariectomizada. Además, el tratamiento con dicha hormona reducirá el déficit cognitivo causado por el KA. Finalmente, existirá un aumento en la neurogénesis del giro dentado en los sujetos tratados con PRL.

7. OBJETIVOS

General.

- Determinar el efecto de la prolactina administrada después de inducir daño excitotóxico por KA en el hipocampo dorsal de la rata hembra.

Particular.

- Determinar si la administración de prolactina disminuye la pérdida neuronal en áreas CA1, CA3 y CA4 del DG del hipocampo dorsal causada por el ácido kaínico.
- Determinar si prolactina promueve un aumento de la tasa neurogénica en el giro dentado del hipocampo de la rata hembra después de inducir un daño excitotóxico.
- Evaluar si existe una relación entre el tratamiento con prolactina y un menor déficit cognitivo, evaluado mediante la prueba de reconocimiento de objetos novedosos.

8. MATERIAL Y MÉTODO

8.1. SUJETOS

Los animales empleados en el presente estudio se obtuvieron del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todos los procedimientos experimentales se realizaron en concordancia con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del INB. Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar, de entre 180 y 200g de peso corporal, mantenidas bajo un ciclo de luz: oscuridad (12:12), con encendido de luces a las 06:00 AM, a una temperatura ambiental controlada ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) y acceso a agua y alimento *ad libitum* (Rat Chow, Purina).

Durante todo el procedimiento, las ratas se alojaron en cajas de acrílico transparente de 47cm x 25cm x 20cm (2 ratas/caja). Todas las ratas se sometieron a una cirugía para remover los ovarios (Ovariectomía, Anexo I).

8.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la elaboración del presente proyecto, los animales se distribuyeron al azar en 2 grupos experimentales y fueron sacrificados en dos diferentes tiempos después de la administración de KA: 7 días (7D) y 30 días (30D) post administración. Además, cada grupo se dividió en 3 subgrupos diferentes a los que se les dio un tratamiento farmacológico diferente como se muestra a continuación:

1. Control: Solución salina (ICV) + Solución salina (SC).
2. Control positivo: KA (ICV) + Solución salina (SC).
3. Problema: KA (ICV) + Prolactina (SC).

A los sujetos pertenecientes al grupo 30D se les hizo la prueba de NOR a los días 1 y 30 después de la administración de KA. Al grupo 7D únicamente se le hizo la evaluación histológica del tejido cerebral obtenido (Figura 8).

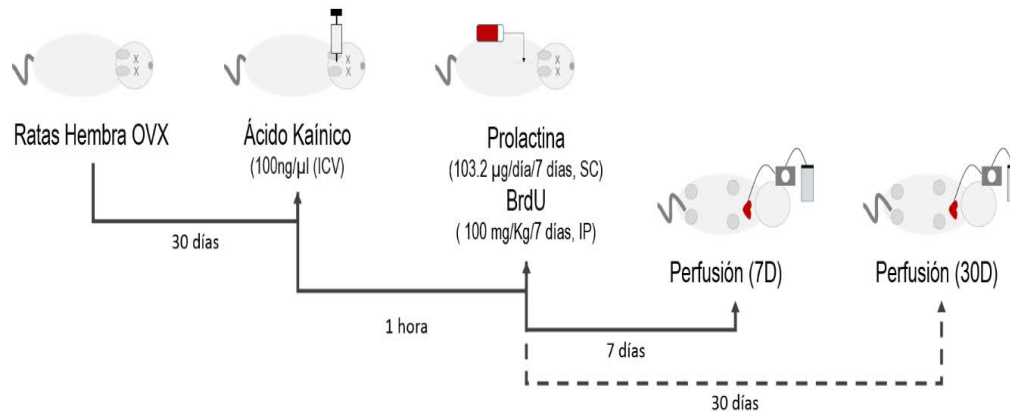


Figura 8.- Protocolo Experimental. Se muestra una representación esquemática de la forma en que fue realizado el procedimiento experimental para ambos protocolos. 7D: sacrificio a 7 días post-KA, 30D: sacrificio a 30 días post-KA. El grupo 30D se sometió a la prueba de reconocimiento de objetos novedosos.

GRUPO 7D

Después de llevar a cabo la ovariectomía de las ratas, se dejó pasar un intervalo de 30 días antes de iniciar el protocolo experimental, con la finalidad de que el sujeto se recuperara de la cirugía así como para que fuesen eliminadas las hormonas gonadales presentes en su sistema antes de la ovariectomía.

Transcurridos los 30 días, el animal bajo anestesia recibió por vía ICV (ver anexo II) 1 μl de una solución de KA (*Sigma-Aldrich*; 100ng/μl) o 1 μl de solución salina 0.9% según al grupo al que fuese asignado el sujeto. Una hora después de la administración de KA a la rata se le implantó una mini-bomba osmótica (*Alzet #2001*; ver anexo III) subcutánea en la región dorsal del cuerpo del animal, cargada con solución salina 0.9% o una solución de PRL ovina (*Sigma-Aldrich*; 4.3 mg/ml). La cantidad de prolactina administrada por día fue de 103.2 μg y ésta se dio a lo largo de 7 días. Por otra parte, después de implantar la bomba *Alzet*, a todos los sujetos se les administró vía IP una solución de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina; *Sigma-Aldrich*; 25mg/ml) a una dosis de 50 mg/Kg, 2 veces por día con

un intervalo de 6 horas entre cada administración con la intención de marcar un mayor grupo de células en división. La administración de BrdU se dio a lo largo del tratamiento con PRL, es decir, durante 7 días consecutivos. Al día 7 después de la administración de KA las ratas se sacrificaron para el análisis histológico del hipocampo.

GRUPO 30D

El diseño temporal del grupo 30D es similar al 7D en cuanto al curso temporal y las cantidades administradas del KA, la PRL y el BrdU. En el caso de la bomba *A/zet* implantada, ésta fue removida al día 7 después de la administración de KA ya que después de este tiempo la bomba comienza a liberar componentes de su estructura que pueden afectar el tejido del sujeto.

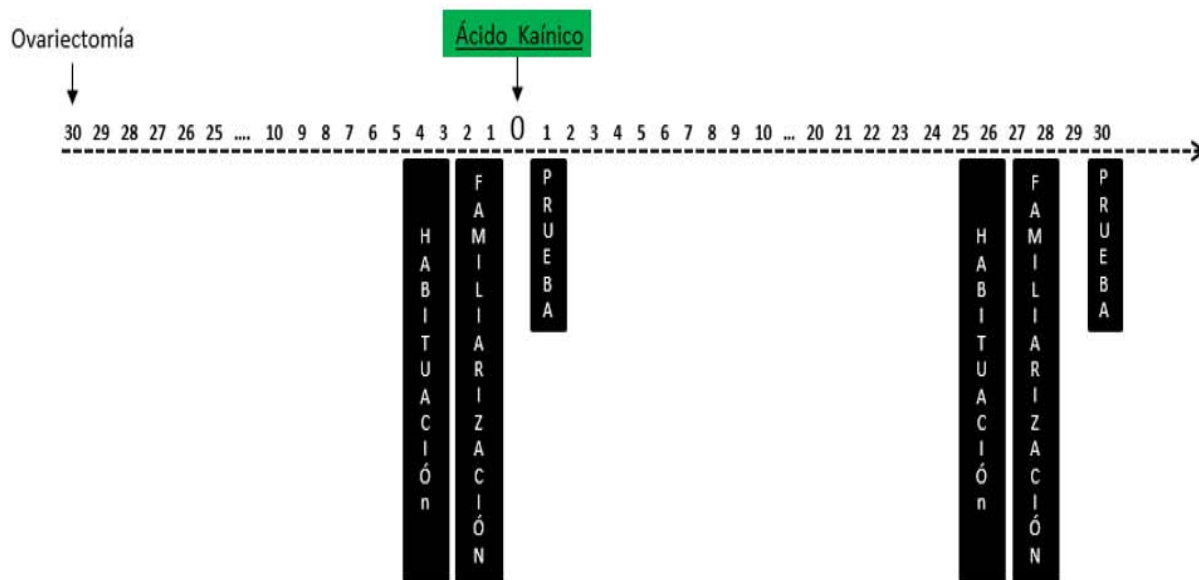


Figura 9.- Protocolo de reconocimiento de objeto novedoso (NOR). Se muestra una representación del diseño temporal de la prueba de NOR al grupo 30D. Se resalta al día 0 en cual es administrado el KA.

Como se mencionó anteriormente a este grupo se le realizó la prueba de NOR (Figura 9; ver anexo IV) para evaluar la integridad del hipocampo después del daño por KA y la administración de PRL. Brevemente, al día 3 y 4 previos a la administración de KA a los sujetos se les permitió explorar libremente la caja de prueba durante 8 minutos (habituación), lo anterior con la finalidad de que la caja de prueba y el ambiente no

representen un estímulo que afecte la ejecución de la prueba por parte de la rata. En el día 2 y 1 previos al KA se colocaron un par de objetos idénticos dentro de la caja y se le permitió al sujeto explorar dichos objetos durante 8 minutos (familiarización). Finalmente un día después de la administración de KA se realizó la prueba de NOR, la cual consistió en colocar un objeto de la fase de familiarización y un objeto novedoso para el sujeto. Se le permitió explorar ambos objetos durante un periodo de 8 minutos antes de ser retirado de la caja de prueba. El mismo procedimiento se le realizó de nuevo a cada sujeto, siendo el día 25 y 26 post-KA la fase de habituación, el día 27 y 28 post-KA la fase de familiarización y el día 30 post-KA la prueba de memoria. De la fase de familiarización y de prueba se obtuvo el tiempo que permaneció el animal en cada objeto. Al final de ambas fases de prueba se procedió a evaluar la actividad locomotriz mediante la prueba de campo abierto, la cual consiste en colocar al sujeto en una plataforma de 100x80 cm dividida en cuadros de 20x20 cm y medir el número de cuadros que atraviesa durante 5 minutos, lo anterior para descartar un efecto de la PRL debido a modificaciones en la actividad motriz. Una vez terminada la prueba al día 30 se procedió al sacrificio del animal y la posterior obtención de tejido cerebral.

8.3. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

PERFUSIÓN

Los sujetos se anestesiaron con una sobredosis de uretano (1.38 g/Kg de peso corporal) y se les perfundió con 250 ml de solución salina isotónica (0.9%) seguido de 250 ml de PAF (Paraformaldehído, *Sigma-Aldrich*) al 4.0% en agua desionizada pH 9.5, 10°C. Los cerebros de los animales fueron obtenidos y fijados en PAF al 4.0% durante toda la noche. Al día siguiente los cerebros se colocaron en un tubo *Falcon* de 50 ml en una solución al 30% de sacarosa en buffer de fosfatos como agente crioprotector a 4°C durante 3 días o hasta que éstos se precipitaron al fondo del tubo. Una vez terminado este procedimiento se procedió a la obtención de los cortes que fueron utilizados para el análisis inmunohistoquímico.

OBTENCIÓN DE CORTES

Se realizaron cortes coronales de 30 μm de grosor del hipocampo dorsal con un micrótomo de congelación. Los cortes se colectaron de manera rostro-caudal en 5 series en una caja estéril para cultivo (5x5 pozos) a fin de obtener en cada serie una muestra representativa del hipocampo. De esta forma, cada serie contenía un corte cada 150 μm y las 5 series contenían secciones consecutivas del tejido adyacente en la caja de cultivo (Figura 10). Los cortes se almacenaron en una solución crioprotectora de sacarosa 20% (*Sigma-Aldrich*), etilenglicol 30% (*Fisher Scientific*) en buffer de fosfatos 0.05M. El tejido se mantuvo a -20°C hasta el momento de su utilización para el procesamiento histoquímico.

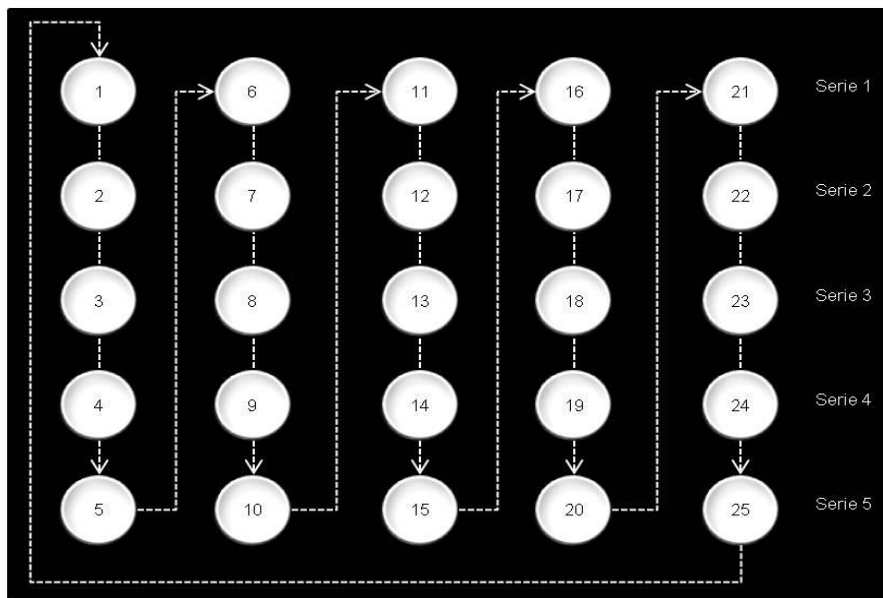


Figura 10.- Recolección de los cortes de hipocampo. Las flechas punteadas indican el orden que fue seguido en la recolección con el fin de obtener muestras representativas del hipocampo en cada una de las 5 series.

8.4. INMUNOFLUORESCENCIA

NEUN-BrdU

Con el fin de conocer el daño existente en áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo dorsal se procedió a hacer Inmunofluorescencia para NeuN (Proteína nuclear neuronal), un marcador específico para neuronas, además, para analizar la presencia de nuevas neuronas maduras se realizó doble marcaje para NeuN para neuronas y contra BrdU que identifica células en proliferación al insertarse en la cadena de ADN durante la división celular.

Las secciones se procesaron por inmunohistoquímica en flotación. Primero se lavaron 3 veces con KPBS (buffer salino de fosfato de potasio) 0.02M durante 10 minutos con el fin de eliminar el remanente de la solución crioprotectora en la que fueron almacenadas. Posteriormente se incubó con Tritón 1.0% en KPBS durante 25 minutos con la finalidad de permear la membrana celular y se lavó 3 veces con KPBS por 5 minutos c/u. Después se procedió a incubar con HCl 2N a 37°C durante 1 hora con el fin de abrir la cadena de DNA y facilitar la detección de la molécula de BrdU introducida en su secuencia durante la división celular. Transcurrido este tiempo se incubó durante 15 minutos con borohidruro de sodio 0.5% en KPBS para neutralizar el pH y se lavó con KPBS 3 veces durante 10 minutos.

Posteriormente se procedió a incubar con los anticuerpos *Guinea Pig anti-NeuN (Millipore)* y *Mouse anti-BrdU (BD biosciences)* a una concentración de 1:750 y 1:300 respectivamente, con suero normal de cabra 0.5% más Triton 0.5% en KPBS 0.02M durante toda la noche a 4°C y agitación constante. Una vez finalizado este periodo se lavó 3 veces con KPBS y se incubó durante 2 horas con el anticuerpo secundario *goat anti-Guinea Pig Alexa Fluor 488 (Jackson Immuno Research)* y *goat anti-mouse Cy3 (Abcam)* a una concentración de 1:750 y 1:500 respectivamente) diluidos en suero normal de cabra 0.5% más Triton 0.5% en KPBS 0.02M a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Finalmente se lavó con KPBS 3 veces por 10 minutos c/u, se montó el

tejido en portaobjetos gelatinados y se cubrió con medio de montar para fluorescencia (*Vectashield, Vector Laboratories, Inc.*).

DCX-BrdU

Para la determinación de neuronas inmaduras se procedió a realizar doble marcaje contra doblecortina (DCX), una proteína asociada a los microtúbulos del citoesqueleto expresada en neuronas inmaduras y contra BrdU para células en proliferación.

El procedimiento utilizado para la inmunohistoquímica fue el mismo que se usó para la detección de NeuN-BrdU. Se utilizaron como anticuerpos primarios el *Guinea Pig anti-Doblecortina (Millipore)* y el *Mouse anti-BrdU (BD biosciences)* a concentraciones de 1:600 y 1:300 respectivamente. Como anticuerpos secundarios se utilizaron *goat anti-Guinea Pig Cy3 (Abcam)* y *goat anti-Mouse Alexa 488 (Invitrogen)* a concentraciones de 1:550 y 1:500 respectivamente.

GFAP-BrdU

La identificación de astrocitos se realizó mediante el marcaje contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en ingles), la cual se encuentra en los filamentos intermedios de los astrocitos.

Se procedió de la misma forma que para la inmunodetección del punto anterior. Se utilizaron como anticuerpos primarios *rabbit anti-GFAP (Abcam)* y *Mouse anti-BrdU (BD biosciences)* a concentraciones de 1:800 y 1:300 respectivamente. Como anticuerpos secundarios *goat anti-rabbit Cy3 (Jackson Immuno Research)* y *goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen)* a concentraciones de 1:700 y 1:500 respectivamente.

8.5. OBTENCIÓN DE LOS DATOS

8.5.1 CONTEO CELULAR

Se obtuvieron imágenes de las rebanadas de hipocampo dorsal (-2.45 y -4.20 de Bregma; Swanson, 1998), de las áreas CA1, CA3 y CA4 del tejido marcado con NeuN para hacer el conteo neuronal de los grupos 7D y 30D, y con GFAP para determinar el número de astrocitos inmunopositivos presentes en el tejido para el grupo 7D. Se utilizó un microscopio de fluorescencia (*Zeiss AX10*) acoplado a una cámara fotográfica (*AxioCam ICm1*) y con el uso del programa *Zen2011* se obtuvieron series de imágenes las cuales se guardaron en formato *Tiff*. Las imágenes obtenidas se exportaron al programa *ImageJ* para realizar los conteos celulares correspondientes. Para cada región del hipocampo se estableció una región representativa (ROI: región de interés, por sus siglas en inglés) en donde se cuantificó de forma manual el número de células inmunopositivas a cada anticuerpo. Se contaron individualmente las áreas CA1, CA3, y CA4 en un total de 5 o 6 secciones por sujeto en el hipocampo ipsilateral al lugar donde se hizo la administración ICV del KA. Los resultados se expresaron como número de células NeuN y GFAP positivas por área.

8.5.2. DENSIDAD ASTROCITICA (FRACCIÓN DE ÁREA GFAP+)

Ya que el grupo 30D presentó una marca a GFAP muy exacerbada lo cual hizo imposible la cuantificación célula a célula, se procedió a evaluar la fracción de área que presentaba células y filamentos GFAP-positivos. Dicha fracción de área es el cociente entre el área positiva a GFAP y el área total de la región de interés. Se obtuvieron imágenes de secciones de hipocampo al igual que las obtenidas para el conteo celular en un microscopio confocal (*Zeiss LSM 780*) utilizando los mismos parámetros de adquisición para todos los sujetos. Las imágenes obtenidas se exportaron al programa *ImageJ* para determinar la fracción de área que presentaba marca positiva a GFAP. Para cada región del hipocampo se estableció una región de interés representativa (ROI: región de interés, por sus siglas en inglés). Se contaron individualmente las áreas CA1, CA3, y CA4 en un

total de 4 o 5 rebanadas por sujeto en el hipocampo ipsilateral al lugar donde se hizo la administración ICV. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de marca GFAP positiva por área.

8.5.3. NEUROGÉNESIS

Para la evaluación en la tasa de neurogénesis, se contó el número de células DCX-BrdU y NeuN-BrdU positivas en el giro dentado del hipocampo 30 días después de la administración de KA. Se adquirieron 3 imágenes por animal en un microscopio confocal (*Zeiss LSM 780*), de una región rostro-caudal (-2.85 y -3.90 de Bregma; Swanson, 1998) del hipocampo ipsilateral a la administración de KA. Cada imagen estuvo compuesta de un stack en el plano en “z” de 10.22 μm con una imagen cada 1.022 μm . Las imágenes se exportaron al programa *ImageJ* para determinar el número de células que colocalizaron para ambos marcadores en la capa subgranular (DCX-BrdU) y granular (NeuN-BrdU) del giro dentado. Los resultados se expresaron como la “fracción del control”, calculado de dividir el número de células de los grupos tratados con y sin PRL entre el número promedio de células del grupo control.

8.5.4. PREFERENCIA DE EXPLORACIÓN

Para determinar el porcentaje de tiempo que cada sujeto se mantiene explorando cada objeto durante la prueba de NOR, se analizó cada video cronometrando el tiempo que el animal explora cada objeto en la fase de familiarización y de prueba, tomando en cuenta los parámetros mencionados en el anexo IV. Únicamente se contabilizaron los primeros 5 minutos de exploración, ya que estos representaron el tiempo donde hubo mayor exploración de los objetos en ambas fases. La preferencia de exploración se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Tiempo de exploración en A}}{\text{Tiempo de exploración en A} + \text{Tiempo de exploración en B}} * 100$$

Además de la preferencia de exploración, se cuantificó el tiempo total de exploración como medida para descartar que el índice de exploración pudiese verse afectado por alteraciones en la actividad motriz o problemas en la exploración. Éste fue calculado haciendo la sumatoria del tiempo de exploración que gasta el sujeto en ambos objetos dentro de la caja de prueba.

8.5.5. CAMPO ABIERTO

Para descartar que el resultado obtenido en la prueba de NOR fuese un problema motriz se procedió a realizar una evaluación de motilidad en campo abierto para todos los sujetos. Se cuantificó el número de cuadros que atravesó el sujeto durante 5 minutos. Se consideró que un cuadro era atravesado solo cuando las cuatro patas estuviesen dentro de él. Los resultados se expresaron como número de cuadros recorridos por 5 minutos.

8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos numéricos se expresaron como la media \pm el error estándar. Para la evaluación del número total de neuronas y astrocitos en las diferentes áreas del hipocampo, el tiempo total de exploración en la prueba de NOR, la actividad locomotriz en la prueba de campo abierto y la neurogénesis, se procedió a realizar un análisis de varianza unifactorial (one way ANOVA, por sus siglas en inglés) seguido de un análisis post hoc con una prueba Tukey. En el caso de los valores de índice de exploración de la prueba de NOR, se utilizó un análisis de varianza bifactorial (two way ANOVA: Factores, tratamiento x tipo de objeto), seguido de un análisis post hoc con una prueba Tukey. Finalmente, para la evaluación de la preferencia del objeto novedoso entre el día 1 y 30 post-KA de cada tratamiento, se utilizó una prueba t-student de medidas repetidas. Fue utilizado el programa *Sigma Stat 3.5* para la realización de las pruebas estadísticas. Se consideró un valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

9. RESULTADOS.

9.1. LA ADMINISTRACIÓN DE PRL DISMINUYE LA PÉRDIDA NEURONAL EN CA1

Con el fin de evaluar el daño existente en áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo dorsal se procedió a hacer Inmunofluorescencia para NeuN (Proteína nuclear neuronal), un marcador específico para neuronas maduras.

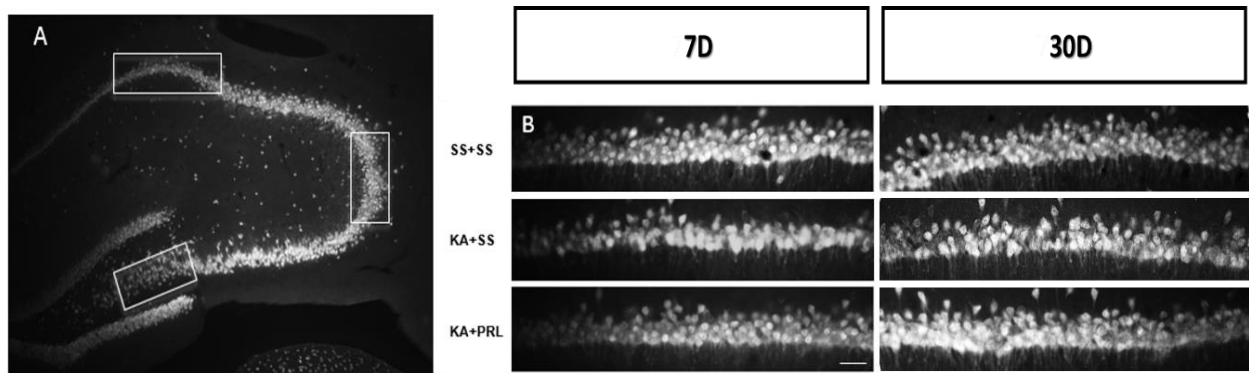


Figura 10.- Células Inmunopositivas para NeuN. A) Se resaltan las áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo que fueron muestreadas para realizar conteos celulares. B) Microfotografías del área CA1 capturadas en microscopio de fluorescencia para los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos de evaluación, 7 días (7D) y 30 días (30D) post administración de KA. Se observa que existe una disminución del número de células en el grupo KA+SS en los dos tiempos de evaluación, no así el grupo que recibió el tratamiento con PRL. Barra de escala: 50 μ m

En una vista panorámica del hipocampo dorsal (Figura 10 A), se resaltan los campos en los que se contabilizó el número de neuronas para las diferentes áreas que lo componen. Las imágenes del área CA1 (Fig. 10 B) muestran que existe una disminución del número de neuronas en los grupos que se administraron con KA (KA+SS) comparados con el grupo control (SS+SS) a los 7 y 30 días post administración de KA, sin embargo, la administración de PRL disminuyó la pérdida neuronal observada en comparación con el grupo KA+SS. En contraste, en las áreas CA3 y CA4 el tratamiento con PRL no mostró tener efecto sobre la pérdida neuronal causada por la administración de KA a los 7 o 30 días post lesión (Imágenes no mostradas).

Los conteos celulares 7 días (7D) después de la administración de KA, permiten mostrar que existe una disminución significativa en la densidad neuronal en las áreas CA4, CA3 (aproximadamente del 40%) y CA1 (aproximadamente del 20%) del hipocampo (Fig. 11) del grupo KA+SS comparado con su respectivo grupo control ($P < 0.001$). Por otra parte, el tratamiento con PRL no evita la pérdida neuronal causada por el KA en las áreas CA4 y CA3 del hipocampo, ya que se observó una disminución de aproximadamente el 40% en el número de neuronas con respecto a su grupo control ($P < 0.001$). En contraste, la administración de PRL tiene un efecto protector en el área CA1, ya que la pérdida neuronal observada fue menor al 10%, sin embargo, dicha disminución neuronal no es significativamente distinta al grupo SS+SS ($P = 0.133$) y si al grupo que solo recibió el KA ($P < 0.025$).

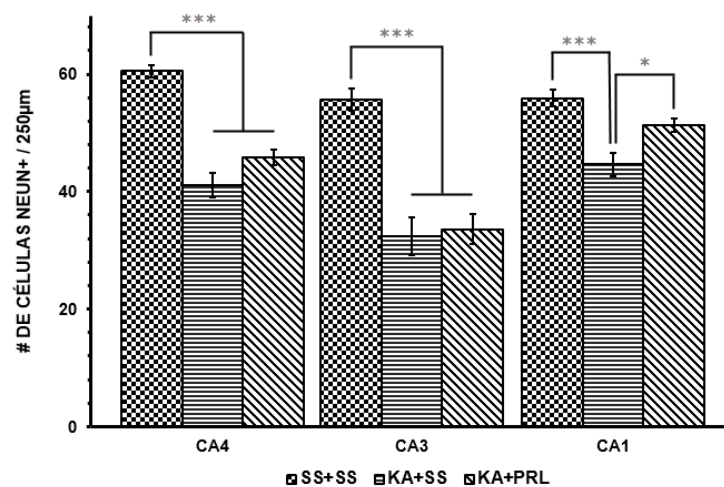


Figura 11.- Células positivas para NeuN (7D). Áreas hipocámpicas CA4, CA3 y CA1 de ratas ovariectomizadas tratadas crónicamente con PRL o vehículo durante 7 días, después de haber sido administradas con KA o vehículo. SS: Vehículo, solución salina 0.09%. KA: Ácido kaínico. PRL: Prolactina. Barras representan la media \pm SEM *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ ($n = 5$).

Con los resultados anteriores, se observa que la administración crónica de PRL después de la administración de KA, tiene un efecto protector únicamente en CA1 donde existe una preservación del número de neuronas cuando se compara con grupo KA+SS.

9.2. EL TRATAMIENTO CON PRL DISMINUYE NÚMERO DE CÉLULAS GFAP POSITIVAS EN CA1

Para determinar la respuesta astrocítica en el hipocampo, se procedió a realizar inmunofluorescencia para GFAP (Proteína ácida fibrilar glial) la cual es un marcador específico del citoesqueleto del astrocito.

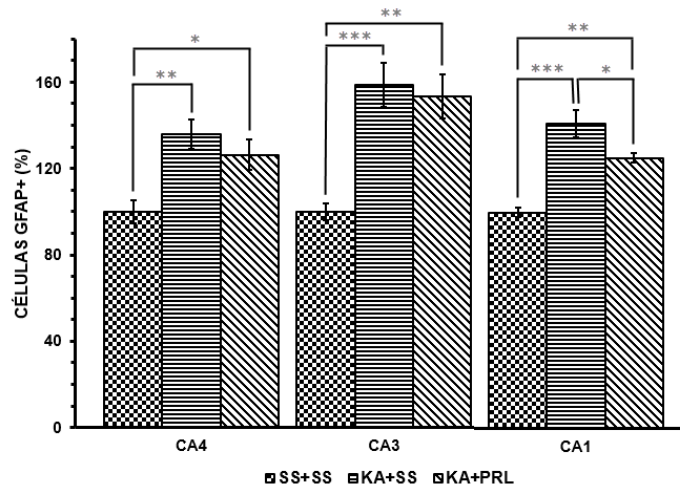


Figura 12.- Porcentaje de células positivas para GFAP. Áreas hipocámpicas CA4, CA3 y CA1 de ratas ovariectomizadas tratadas crónicamente con PRL o vehículo durante 7 días, después de haber sido administradas con KA o vehículo. El porcentaje de células GFAP+ es expresado con respecto al grupo control (SS+SS). SS: Vehículo, solución salina 0.09%. KA: Ácido kainico. PRL: Prolactina. Barras representan la media \pm SEM. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 (n= 5).

El conteo de astrocitos revela que existe un incremento significativo (aproximadamente del 30%) en el número de células GFAP positivas en las áreas CA4, CA3 y CA1 del hipocampo con respecto su propio grupo control (P<0.01) después de la administración de KA (Fig. 12, 14). Por otra parte, el tratamiento con PRL no modifica significativamente el porcentaje de astrocitos inmunopositivos a GFAP observados en las áreas CA4 y CA3 con respecto al grupo que recibió KA y el vehículo. En contraste, la PRL disminuyó significativamente (P<0.05) el número de astrocitos en el área CA1 con respecto al grupo que no fue tratado, sin embargo, comparado con el grupo control existe un incremento (P<0.01) en la densidad de astrocitos. Lo anterior indica que la administración de PRL puede atenuar el aumento en el número de astrocitos presentes en el área CA1 causado por la lesión del KA.

9.3. EL TRATAMIENTO CON PRL PRESERVA EL NÚMERO DE NEURONAS EVALUADO 30 DÍAS POST LESIÓN

Con respecto al conteo neuronal del grupo que se sacrificó 30 días post lesión, se determinó que existe una disminución significativa de la densidad neuronal (Fig. 13) en el área CA3, CA4 de aproximadamente del 50% ($P<0.001$ y $P=0.008$ respectivamente) y del 20% en CA1 ($P=0.004$) en los grupos administrados con KA con respecto al grupo SS+SS. Al igual que el grupo 7D el tratamiento con PRL durante 7 días no disminuyó significativamente la pérdida neuronal causada por el KA en las áreas CA4 y CA3 del hipocampo, ya que la disminución neuronal con respecto al control es de aproximadamente el 40% ($P=0.008$) y del 50% ($p<0.001$) respectivamente.

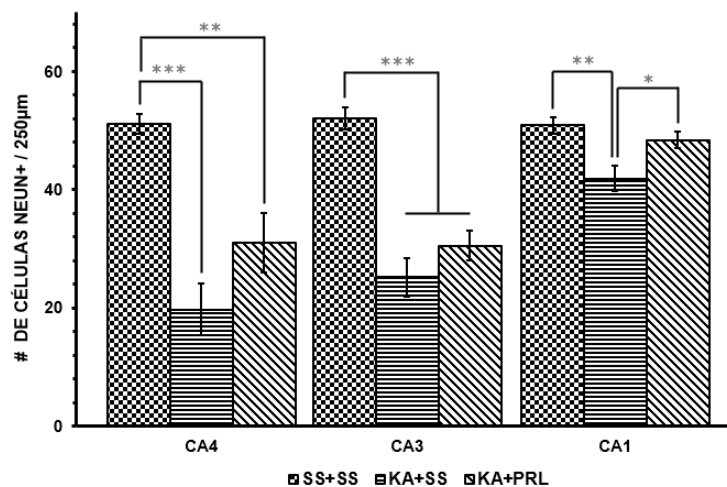


Figura 13.- Células positivas para NeuN (30D). Áreas hipocámpales CA4, CA3 y CA1 de ratas ovariectomizadas tratadas crónicamente con PRL o vehículo durante 7 días, después de haber sido administradas con KA o vehículo. SS: Vehículo, solución salina 0.09%. KA: Ácido kaínico. PRL: Prolactina. Barras representan la media \pm SEM *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$. SS+SS (n=7), KA+SS (n=6), KA+PRL (n=7).

Por el contrario, en el área CA1 a pesar de existir una disminución neuronal del aproximada del 5% no hubo diferencia significativa en la densidad neuronal entre el grupo control y el grupo tratado ($P=0.524$) y si la hubo con el grupo que únicamente recibió KA ($P=0.029$), indicando que la administración de la PRL puede evitar el efecto deletéreo causado por la administración de KA (Fig. 10).

9.4. EL TRATAMIENTO CON PRL REDUCE LA ASTROGLIOSIS EN CA1

Para determinar la respuesta astrocítica en el grupo 30D se procedió a cuantificar la fracción de área que fue positiva a GFAP para cada región del hipocampo, debido a que a diferencia del grupo 7D existió un incremento exacerbado del inmunomarcaje positivo a GFAP en las áreas CA3 y CA4, lo cual impidió realizar el conteo celular correspondiente al no distinguirse el cuerpo celular de los astrocitos (Fig. 14).

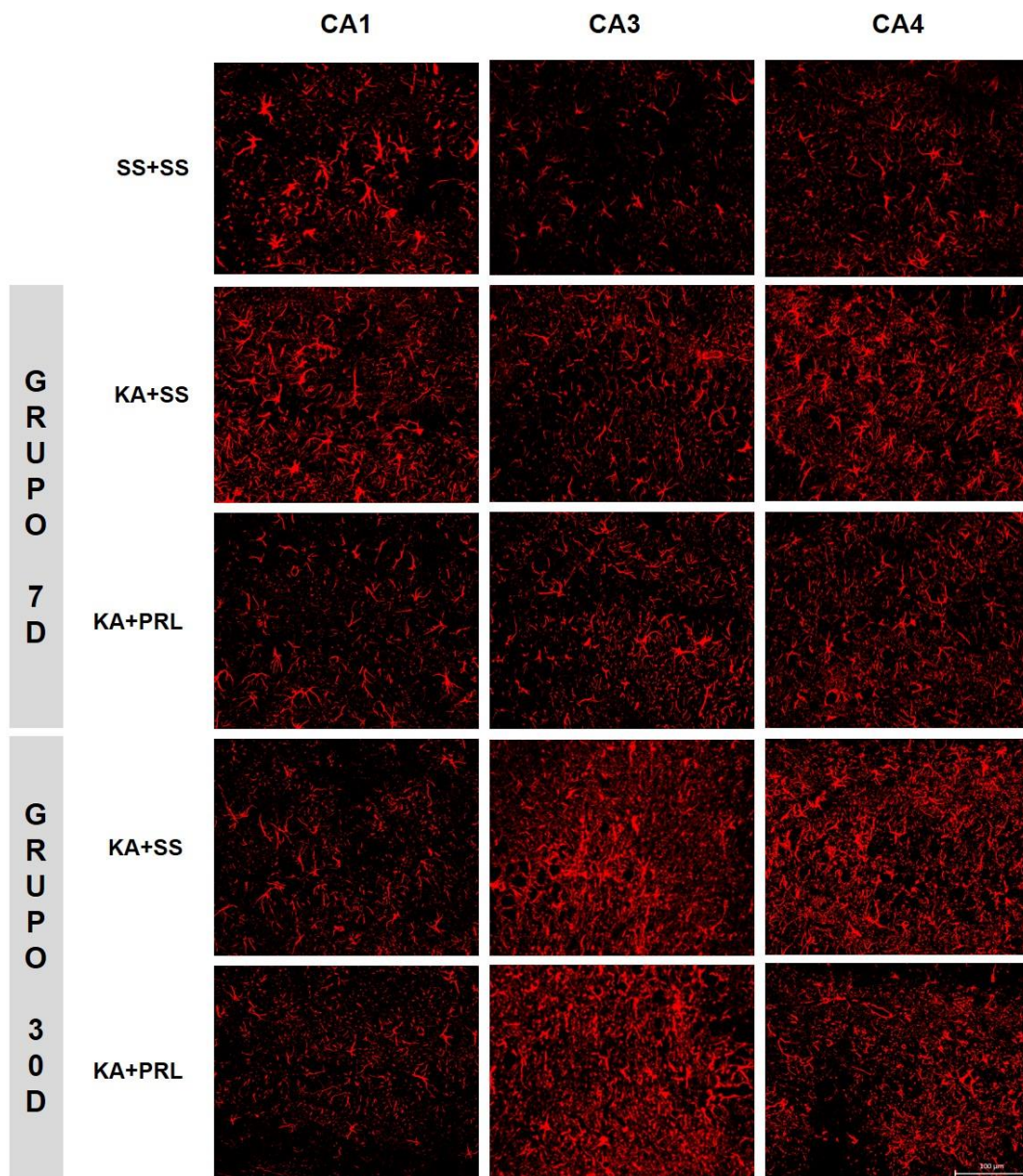


Figura 14.- Inmunofluorescencia GFAP. Áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo que fueron muestreadas para realizar conteos de células GFAP positivas (7D) y fracción de área positiva a GFAP (30D). Existe un

incremento en el número de células GFAP positivas de los grupos que recibieron KA, siendo mayor a los 30 días post lesión. Nótese que en CA1 la densidad de marca positiva a GFAP es menor que en CA3 y CA4. SS: solución salina, KA: ácido kaínico, PRL: prolactina. Barra de escala: 100 μ m

Al cuantificar la fracción de área GFAP+ (Fig. 15), se encontró que al igual que el grupo 7D existe un aumento en la marca de GFAP en los grupos que recibieron KA en las tres áreas del hipocampo evaluadas con respecto al grupo SS+SS ($P < 0.001$). Los sujetos que recibieron el tratamiento con PRL no presentaron una disminución significativa en la respuesta de GFAP en las áreas CA4 y CA3 con respecto al grupo que únicamente recibió KA. En contraste, dentro del área CA1 se encontró que la respuesta astrocítica en el grupo KA+PRL fue menor que el grupo KA+SS ($P < 0.05$) y no fue significativamente distinta al grupo control o SS+SS, indicando que el tratamiento con PRL tiene un efecto temprano y sostenido evitando la astrogliosis, tal y como se vio en el grupo 7D (Fig. 13).

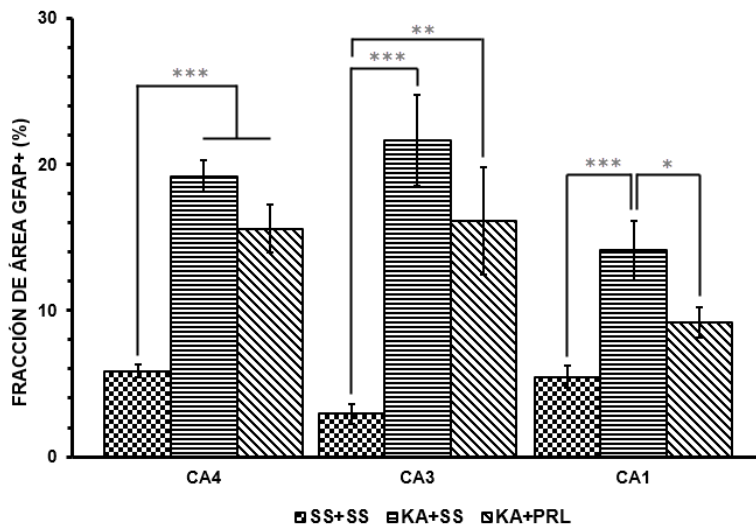


Figura 15.- Fracción de área GFAP positiva. Áreas hipocámpales CA4, CA3 y CA1 de ratas ovariectomizadas tratadas crónicamente con PRL o vehículo durante 7 días, después de haber sido administradas con KA o vehículo). Se cuantificó la densidad de marca GFAP en una región de interés igual para cada área del hipocampo. El resultado se expresa en porcentaje. SS: Vehículo, solución salina 0.09%. KA: Ácido kaínico. PRL: Prolactina. Barras representan la media \pm SEM *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. SS+SS (n=7), KA+SS (n=6), KA+PRL (n=7).

9.5. EL TRATAMIENTO CON PRL EVITA EL DETERIORO COGNITIVO CAUSADO POR EL KA

Con la finalidad de evaluar el efecto de la PRL sobre la integridad funcional del hipocampo después de la administración de ácido kaínico, se procedió a realizar la prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR) para evaluar la memoria del sujeto de experimentación. Dicha prueba se ha reportado que necesita la participación del hipocampo dorsal en su área CA1.

En la figura 16 se muestra el porcentaje de exploración durante la segunda familiarización (ver método). Observamos que no existe diferencia significativa en el porcentaje de tiempo que pasan los sujetos con el objeto A y B, lo que significa que no poseen preferencia por alguno de los objetos que pudiese influir en el desarrollo de la prueba. Resultados similares fueron observados durante la primer familiarización (datos no presentados).

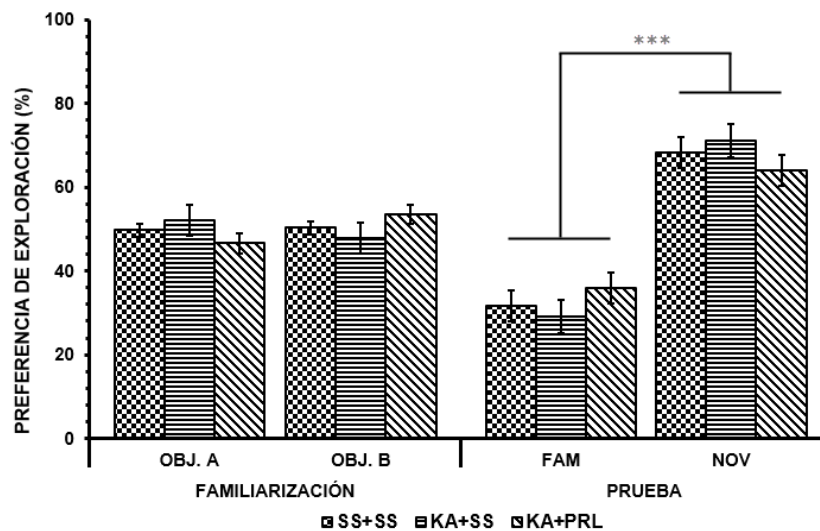


Figura 16.- Reconocimiento de objetos novedosos (1D). Índice de exploración en el objeto A (OBJ A) y el B (OBJ B) durante la fase de familiarización; y del objeto familiar (FAM) y novedoso (NOV) durante la fase de prueba. Barras representan la media \pm SEM. SS+SS (n=7), KA+SS (n=6), KA+PRL (n=7). ***P<0.001.

Durante la fase de prueba, 24hr después de la administración de KA, se observó una preferencia significativa (P<0.001) por el objeto novedoso (aproximadamente del 70%)

de parte de todos los grupos, implicando que el KA en este intervalo no afecta la integridad cognitiva de los animales administrados con esta sustancia, posiblemente a una ausencia de daño en CA1 del hipocampo, lo cual implica que en esta ventana de tiempo el circuito está intacto.

Por otra parte, no se observaron diferencias en el tiempo total de exploración entre los grupos durante la fase de familiarización ($P=0.986$) y la fase de prueba ($P=0.556$). Para descartar que los resultados observados pudiesen ser debido a alteraciones en la actividad locomotora por el efecto del KA, se realizó la prueba de campo abierto. No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados ($P= 0.269$) medido como número de cuadros recorridos durante 5 minutos (SS+SS: 58.857 ± 4.667 ; KA+SS: 66.000 ± 7.052 ; KA+PRL: 77.857 ± 11.236).

Ya que la pérdida neuronal generada después de la administración de KA va aumentando a medida que transcurre el tiempo (Hopkins, Wang y Schmued, 2000), evaluamos el desempeño cognitivo de los sujetos tratados 30 días después de la lesión con la prueba de NOR.

Al igual que la prueba 1 día después de la lesión (Fig. 16), no existen diferencias significativas en el tiempo que pasan los animales con el objeto A y B durante la fase de familiarización (Fig. 17). Y de la misma manera, durante la fase de prueba todos los grupos muestran una mayor preferencia por el objeto novedoso ($P<0.001$), sin embargo, el grupo KA+SS presenta un menor porcentaje de exploración en comparación del control ($P<0.016$), indicando que existe una alteración en su capacidad de reconocer el objeto novedoso. Por otra parte, el grupo KA+PRL no presentó diferencias significativas en relación al tiempo que dedicó a la exploración del objeto novedoso en relación al grupo control ($P=0.431$), ni con el grupo KA+SS ($P= 0.204$).

De la misma forma que la prueba al día 1 post lesión, no se observaron diferencias significativas en el tiempo total de exploración entre los grupos durante la fase de

familiarización ($P=0.509$), ni en la de prueba ($P=0.466$). En el caso de la actividad locomotriz no se observaron diferencias significativas entre los grupos ($P=0.529$).

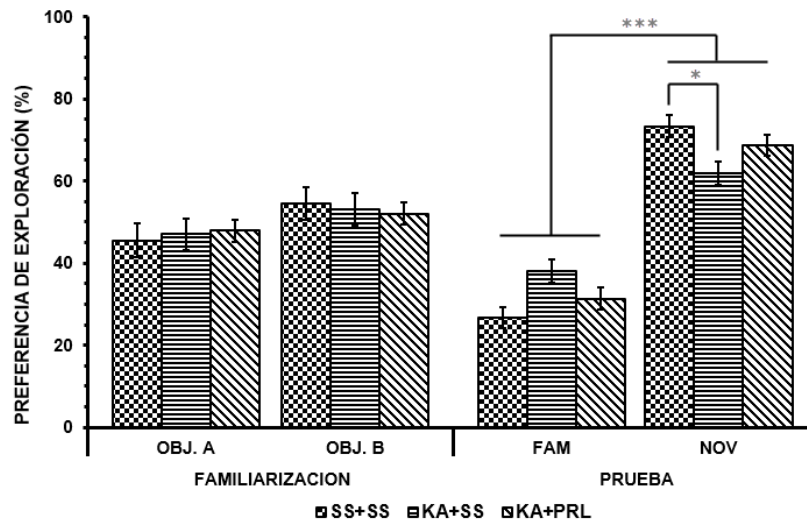


Figura 17.- Reconocimiento de objetos novedosos (30D). Porcentaje de exploración en el objeto A (OBJ A) y el B (OBJ B) durante la fase de familiarización; y del objeto familiar (FAM) y novedoso (NOV) durante la fase de prueba. Barras representan la media \pm SEM. SS+SS (n=7), KA+SS (n=6), KA+PRL (n=7). *** $P<0.001$, * $P<0.05$

Finalmente, ya que el resultado de la fase de prueba 30 días después de la administración de KA fue inconcluso acerca del papel de la PRL en la tarea de NOR, se procedió a evaluar si hubo un deterioro cognitivo a lo largo del tiempo causado por el KA y así conocer si la PRL puede contrarrestar dicho efecto, por lo que evaluamos la diferencia en el porcentaje de exploración entre el objeto novedoso y el familiar (porcentaje de preferencia) al día 1 y 30 después de la administración de KA y los comparamos para cada grupo. Encontramos que únicamente el grupo control y el grupo tratado con PRL no presentan diferencias significativas en el porcentaje de preferencia (Fig. 18) al día entre el día 1 y 30 ($P=0.433$ y $P=0.614$ respectivamente). Por el contrario, el grupo que recibió únicamente KA presenta una disminución significativa en el porcentaje de preferencia entre el día 1 y 30 ($P=0.049$).

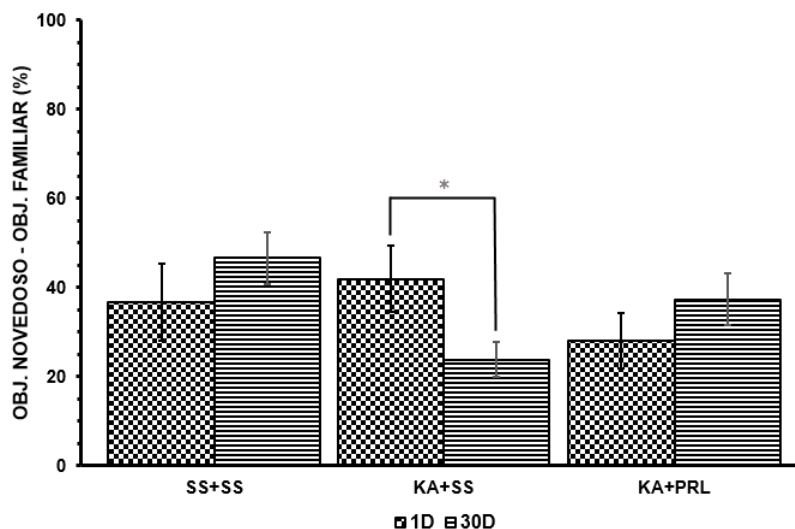


Figura 18.- Porcentaje de preferencia. Diferencia entre el % de exploración del objeto novedoso y el objeto familiar, para cada grupo al día 1 (1D) y 30 (30D) post lesión. *P<0.05

Con los resultados anteriores, se presume decir que el tratamiento de PRL disminuye el déficit cognitivo causado por la administración de KA, visto como un mejor desempeño en la prueba de NOR.

9.6. LA ADMINISTRACIÓN DE PRL NO MODIFICA LA TASA DE NEUROGÉNESIS DEL HIPOCAMPO

Ya que en otros trabajos se ha propuesto que la administración de PRL puede aumentar la neurogénesis, a través de incrementar la sobrevivencia de las neuronas generadas (Torner, 2009), decidimos evaluar el número de células positivas a DCX-BrdU 7 días post lesión. Además, considerando que no todas las neuronas inmaduras encontradas a los 7 días llegarán a madurar para insertarse en la capa granular del hipocampo, se evaluó el número de células positivas a NeuN-BrdU 30 días post lesión, para determinar si existe un incremento en el número de neuronas maduras debido al tratamiento con PRL posiblemente mediado por un aumento en la sobrevivencia de las mismas.

Observamos que en el grupo administrado solo con KA existe una mayor cantidad de células positivas a DCX y NeuN doble positivas con BrdU a los 7 y 30 días post lesión respectivamente en comparación con el grupo SS+SS (Fig. 19, 20), indicando que la sola

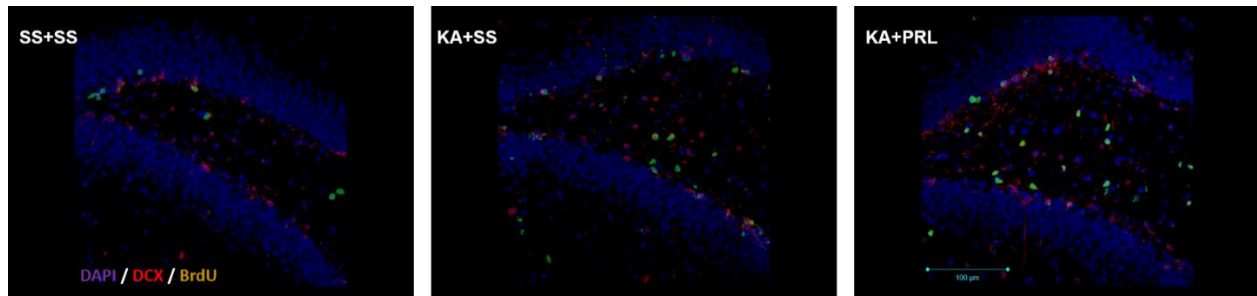


Figura 19.- Inmunofluorescencia-Neuronas inmaduras. Imágenes representativas de células del giro dentado del hipocampo inmunopositivas contra DCX (rojo), BrdU (verde) y contrastadas con DAPI (azul). SS: solución salina, KA: ácido kaínico, PRL: prolactina. Barra de escala: 100μm. Magnificación: 20x

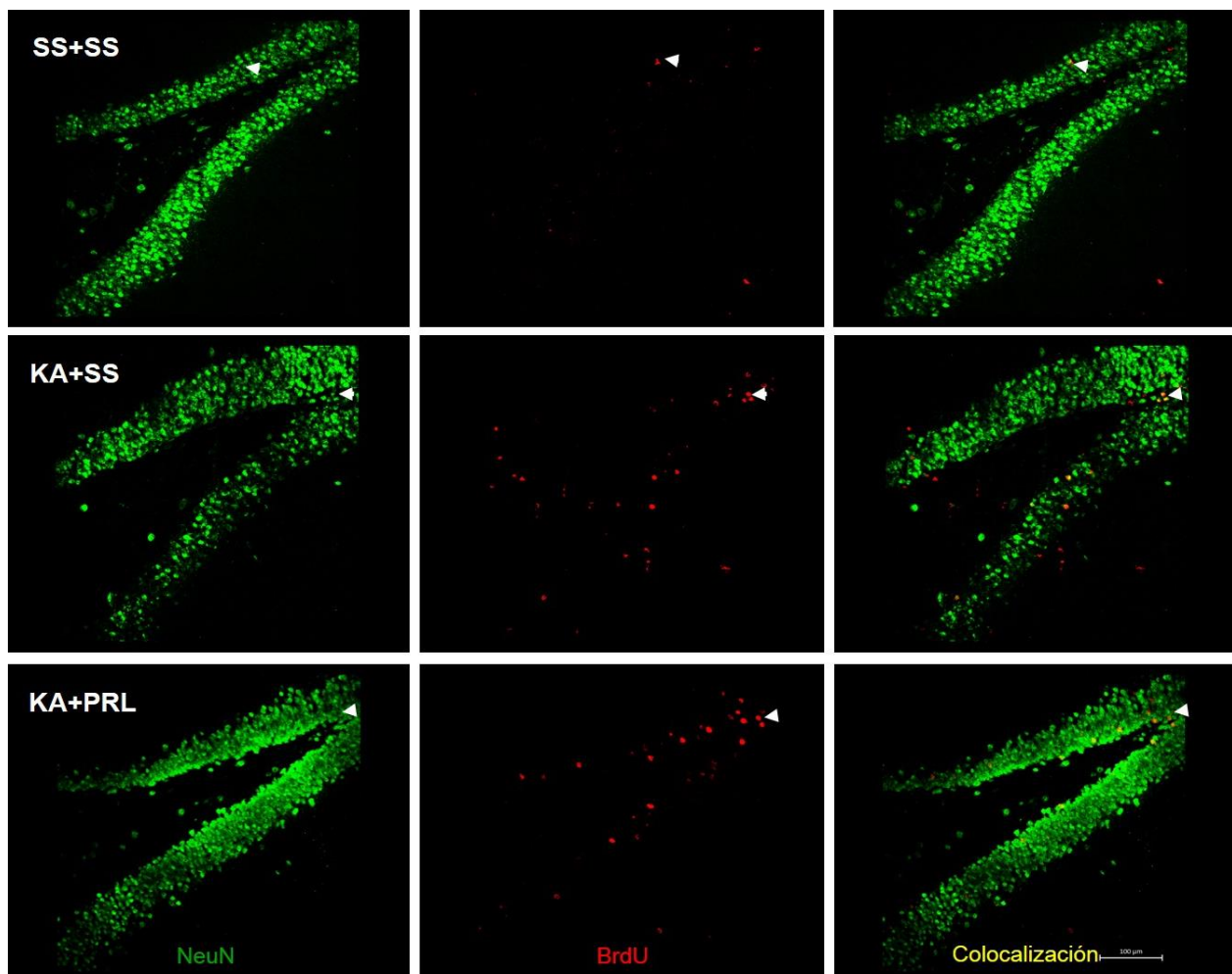


Figura 20.- Inmunofluorescencia-Neuronas maduras. Imágenes representativas de células del giro dentado del hipocampo inmunopositivas contra NeuN (verde) y BrdU (rojo). La flecha blanca indica células doblemente marcadas. SS: solución salina, KA: ácido kaínico, PRL: prolactina. Barra de escala: 100μm. Magnificación: 20x

administración de KA incrementa la tasa de neurogénesis. Por otra parte, el tratamiento con PRL no incrementó el número de células doble positivas a DCX-BrdU y NeuN-BrdU comparado con el grupo KA+SS. Realizando el conteo celular correspondiente, se determinó que existe un incremento significativo (Fig. 21) de aproximadamente 1.8 y 2.5 veces en el número de células doble positivas DCX-BrdU y NeuN-BrdU a los 7 y 30 días respectivamente, en el grupo KA+SS con respecto al control ($P < 0.05$). El tratamiento con PRL no tuvo efecto sobre el incremento en el número de nuevas neuronas, tanto inmaduras a los 7 días post lesión como maduras a los 30 días, ya que el número de nuevas neuronas no es significativamente distinto entre el grupo KA+SS y KA+PRL ($P = 0.950$). Los resultados anteriores nos indican que si bien existe un aumento en la neurogénesis después de la lesión con KA, como previamente se ha reportado, la PRL incide sobre un incremento en la generación de nuevas neuronas bajo las condiciones del microambiente creado por la administración de KA.

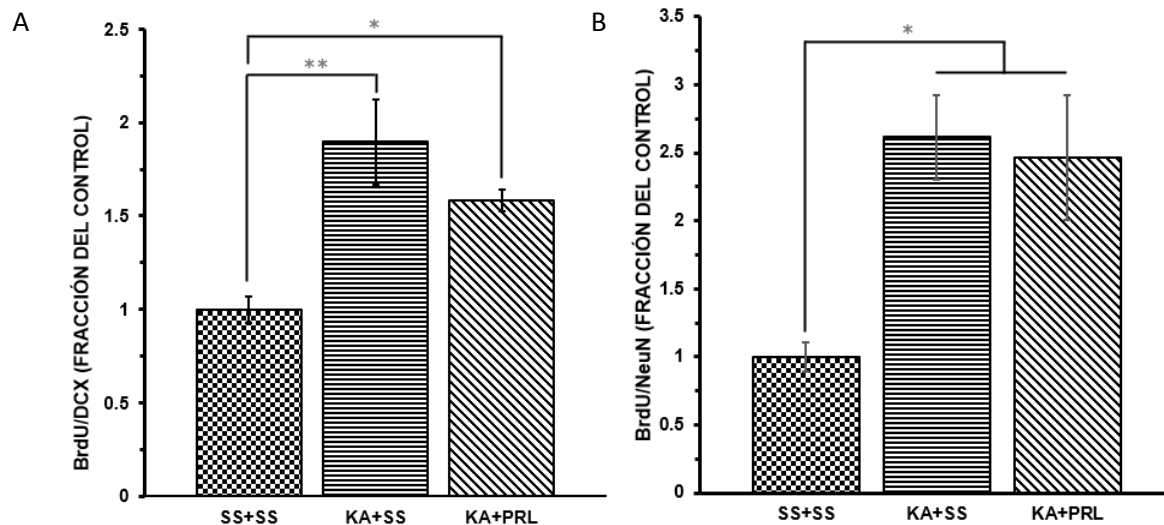


Figura 21.- Neurogénesis. Se muestra el incremento en el número de células doble positivas a DCX-BrdU (A) y NeuN-BrdU (B) a los 7 y 30 días post administración de KA respectivamente, en el Giro Dentado del hipocampo de los grupos administrados con KA y PRL con respecto al grupo control. SS: Vehículo, solución salina 0.09%. KA: Ácido kaínico. PRL: Prolactina. Barras representan la media \pm SEM ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ SS+SS (7D, $n = 4$; 30D, $n = 6$), KA+SS (7D, $n = 4$; 30D, $n = 6$), KA+PRL (7D, $n = 4$; 30D, $n = 7$).

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El hipocampo es una estructura involucrada en diversas funciones como el aprendizaje y la memoria, espacial y no espacial como la de reconocimiento, respuesta al estrés (Andersen y colaboradores, 2007; Broadbent, 2004), entre otras. En nuestro laboratorio se ha estudiado a dicha estructura para evaluar el papel neuroprotector de la hormona PRL en el modelo de excitotoxicidad por KA. En trabajos previos se describió que la administración crónica de PRL previa a una lesión por el KA evita la pérdida neuronal en las áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo (Tejadilla, Cerbón y Morales, 2010), por lo que en este trabajo nos interesó determinar el efecto de la PRL cuando su administración se aplica después de haber inducido la lesión.

El tratamiento crónico con PRL evaluado a 7 días post lesión, solo evitó la pérdida neuronal causada por el KA en el área CA1 donde el conteo neuronal es similar al grupo control, no así en las áreas CA4 y CA3, donde la pérdida fue mayor del 40%. Este resultado se mantuvo cuando el análisis se hizo a los 30 días después de inducir el daño por KA, revelando que el efecto de la PRL permanece por un largo periodo a pesar de que continúa la degeneración causada por el KA (Hopkins, Wang y Schmued, 2000). Además, el análisis sobre la astrogliosis posterior al daño mostró que la PRL disminuyó la cantidad de células GFAP positivas únicamente en el área CA1, no así en CA3 y CA4 donde se tuvo una astrogliosis severa, lo cual concuerda con el grado de daño observado en esas regiones. Por otra parte, en la prueba de NOR no existieron diferencias entre los grupos al primer y 30 días después de la lesión, sin embargo, al comparar el desempeño de cada grupo entre ambos tiempos de evaluación, encontramos que la PRL evitó el déficit cognitivo causado por el KA. Finalmente, la evaluación del número de nuevas neuronas o neurogénesis en el giro dentado del hipocampo reveló que no existieron diferencias en la tasa de esta entre el grupo que recibió la PRL y el no tratado, mostrando que dicha hormona no incrementa la generación de nuevas neuronas bajo las condiciones creadas por el KA.

Una posible explicación de la protección diferencial de la PRL puede atribuirse a la distinta sensibilidad al KA de las diferentes áreas del hipocampo. Un estudio que evaluó la densidad de receptores al KA (KAR) en hembras, indicó que la mayor concentración de dichos receptores se encuentran en el área CA4 y CA3 en comparación con el área CA1 (Palomero-Gallagher, Bidmon y Zilles, 2003). Lo anterior se relaciona con la intensidad de daño causada por el KA, donde las áreas CA3 y CA4 tienen una reducción del 40% en la densidad neuronal y CA1 solo el 20%. Además, se sabe que la administración de KA por vía ICV afecta diferencialmente las áreas del cuerno de ammon (CA) del hipocampo, siendo CA1 la menos dañada (Nadler, Perry y Cotman, 1978; Nadler y colaboradores, 1980). En resumen, es posible que el efecto que vimos en la protección del área CA1 por la PRL sea debido a que dicha área es la menos sensible y por lo tanto la menos dañada, a diferencia del resto de las áreas del CA, por lo que la PRL puede ser capaz de evitar el efecto deletéreo del KA en función de la intensidad del daño causado por dicha molécula.

Para que la PRL pueda ejercer efecto, es necesaria la interacción de dicha hormona con su receptor. En el cerebro de la rata hembra se ha descrito la presencia del RNA mensajero del receptor (Bakowska y Morrell, 2003), así como de la proteína en regiones como el hipotálamo, el estriado, el plexo coroideo y otras estructuras cerebrales (Pi y Grattan, 1998). En el hipocampo, son pocos los trabajos que mencionan la presencia del RPRL, sin embargo, ha sido detectado usando técnicas como inmunofluorescencia (Tejadilla, 2010) o western blot (Torner, 2009). Lo anterior pone en evidencia un posible efecto directo de la prolactina en el hipocampo que puede ser mediado por el receptor largo o el corto. En contraste, no conocemos evidencia acerca de la densidad del RPRL en las diferentes regiones del CA del hipocampo. Es posible que el efecto protector de la PRL en el área CA1 sea debido a una mayor concentración de RPRLs en comparación con las áreas CA3 y CA4.

Dada la variedad de acciones descritas para la PRL, hay varios posibles mecanismos que pueden mediar los efectos neuroprotectores de dicha hormona. Entre éstos se encuentran modificaciones en la apoptosis, la secreción de factores tróficos, modulación

de proteínas antioxidantes, etc. Se ha reportado que en células de linfoma Nb2 la administración de PRL incrementa la expresión de la proteína Bcl-2, la cual suprime la cascada de señalización apoptótica (Leff y colaboradores, 1996), también en líneas celulares de cáncer de mama la presencia de hPRL (Prolactina humana) disminuye la relación Bax/Bcl-2, siendo bax una proteína involucrada en el desarrollo del proceso apoptótico (Peirce y Chen, 2004). Considerando lo anterior es posible que el efecto protector de la PRL sea debido a una inhibición en la muerte neuronal mediada por apoptosis. Por otra parte, se sabe que la PRL modula la expresión de VEGF en células de linfoma Nb2 y células de epitelio mamario HC11 (Goldhar y colaboradores, 2005). La administración del VEGF ha demostrado ser neuroprotector en cultivos neuronales tratados con glutamato (Matsuzaki y colaboradores, 2001) y en el hipocampo de ratas administradas con pilocarpina (Nicoletti y colaboradores, 2008). Además se ha sugerido que puede participar en la protección del hipocampo después de haber sido administrado con NMDA y tratado con agonistas colinérgicos (Inada y colaboradores, 2014). También la PRL puede modular otros factores tróficos como FGF-2 (Too y colaboradores, 1998) y TGF- α (DeVito y colaboradores, 1995), los cuales han mostrado tener efectos positivos sobre la integridad del hipocampo en respuesta a diferentes tipos de daño (Yoshimura y colaboradores, 2003; Alipanalsadeh y colaboradores, 2014). Tomando en cuenta lo anterior, existe la posibilidad de que el efecto protector de la PRL sea mediado indirectamente por el VEGF, FGF-2, TGF alfa, entre otros, por lo que es necesario ahondar más al respecto evaluando los niveles de dichos factores tróficos en el hipocampo para saber si existe alguna relación entre la no pérdida neuronal y un incremento en alguno de ellos. Por otro lado, se ha visto que durante la lactancia, un estado de hiperprolactinemia, existe una disminución en la activación de cFos en regiones de la corteza cerebral e hipocampo, en respuesta al agonista glutamatérgico N-methyl-D,L-aspartate (NMA; Abbud y colaboradores, 1992), por lo que existe la posibilidad que el efecto protector de la PRL sea debido a una modificación en la excitabilidad de las neuronas lo cual impediría que el KA ejersa su efecto. Finalmente, se ha visto que existe una correlación positiva entre la concentración plasmática de PRL y la actividad de la enzima superóxido dismutasa en tejido mamario (Bolzán y colaboradores, 1995; Bolzán y colaboradores, 1997), por lo que no se descarta que el efecto de la PRL puede ser

mediado por una reducción en las sustancias reactivas de oxígeno generadas por el daño con KA.

Respecto a la respuesta astrogliar, se encontró que la lesión con KA aumentó en cantidad de astrocitos inmunopositivos a GFAP así como la longitud y el tamaño del cuerpo de este en las áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo (Fig. 14). Se sabe que existe una astrogliosis en el tejido cerebral en respuesta a cualquier tipo de daño o enfermedad del SNC, la cual puede tener diferentes funciones, entre ellas se incluyen el mantenimiento del ambiente extracelular, el metabolismo y liberación de glutamato, el soporte metabólico para las neuronas, la liberación de factores tróficos y de citocinas pro y anti-inflamatorias (Sofroniew, 2005; Zhang y Zhu, 2011), entre otros. Sin embargo, aún existen discrepancias acerca de su papel benéfico o deletéreo sobre el tejido dañado (Pekny, Wilhelmsson y Pekna, 2014). En el caso de la degeneración cerebral causada por el KA sobre el hipocampo, se considera que la astrogliosis es un marcador de neurotoxicidad (Zhang y Zhu, 2011), representado por un incremento en la densidad de células GFAP positivas (Mitchell, Sundstrom y Wheal, 1993) a 2 días post administración de KA y un pico máximo en la respuesta a los 21 días con la presencia de células con un alto grado de hipertrofia. Así, existe una relación entre el grado de daño neuronal y la respuesta astrogliar (Jorgensen y colaboradores, 1993), similar a nuestros resultados a los 7 y 30 días post administración de KA.

Por otro lado, se conoce que la presencia de PRL y otros factores séricos incrementan la proliferación de astrocitos en cultivo, (DeVito y colaboradores, 1992) al igual que cuando son cultivados sobre medios enriquecidos en células gliales más PRL (Möderschein y colaboradores, 2007). Además, en un modelo de daño mecánico sobre el hipotálamo de ratas hembra, la administración local de PRL incrementa la expresión de GFAP en la periferia del área dañada (DeVito, Stone y Shamgochian, 1995) sugiriendo un aumento en la reactividad astrocítica. En contraste, se ha visto que en ratas que fueron sometidas a estrés crónico y tratadas con PRL, existe una disminución en el porcentaje de células GFAP-BrdU positivas en comparación al grupo control y estresado (Torner y colaboradores, 2009), y en ratas con daño retiniano por exposición a la luz, se demostró

que un estado hiperprolactinémico disminuye la expresión de GFAP en el tejido dañado y aún sin haber sido lesionado (Arnold y colaboradores, 2014), sugiriendo una disminución en la respuesta astrocítica. Tomando en cuenta lo anterior, el papel de la PRL sobre el astrocito varía dependiendo del estado fisiológico del sujeto así como el tipo del daño al que es sometido.

En el caso del modelo de excitotoxicidad por KA utilizado en este protocolo, no se encontró efecto de la PRL sobre la cantidad de astrocitos ni en la densidad de marca GFAP positiva evaluado a los 7 y 30 días post lesión respectivamente, dentro de las áreas CA4 y CA3, comparado con el grupo no tratado, lo cual se relaciona con la pérdida neuronal encontrada. Posiblemente el daño que genera el KA es tan exacerbado (Jorgensen y colaboradores, 1993) que la PRL tiene un efecto nulo sobre la modulación de la respuesta del astrocito reactivo, o en su defecto puede ser respecto a la liberación de factores tróficos o algunas citocinas que pudiesen afectar de forma positiva el sistema, sin embargo, no tenemos evidencia de ello por lo que es necesario realizar más estudios al respecto. En contraste, el área CA1 presentó una menor cantidad de astrocitos así como una disminución en la densidad de GFAP en el grupo administrado con PRL con respecto al grupo dañado, lo cual coincide con trabajos previamente mencionados (Torner y colaboradores, 2009; Arnold y colaboradores, 2014). Además, en un modelo de artritis inducida por citocinas inflamatorias, se ha visto que la PRL reduce el estado inflamatorio causado en este modelo (Adán y colaboradores, 2013), por lo que es posible que la disminución en la respuesta astrocítica sea mediada por un efecto antiinflamatorio de la PRL.

Otra posibilidad es que el efecto protector de la PRL en el área CA1, sea mediado a través del astrocito y no por una interacción directa con las neuronas. Se ha visto que existe un aumento en la expresión del RPRL en los astrocitos adyacentes a la región de daño en ratas sometidas a isquemia (Mödersheim y colaboradores, 2007), por lo que una posible interacción entre dicha hormona y el astrocito puede ser la respuesta al efecto generado por la PRL. Además, se ha visto que la PRL induce la expresión de algunas moléculas como TGF- α (DeVito y colaboradores, 1995) cuyo papel mejorando la función

cognitiva del hipocampo después de daño isquémico ha sido probado (Alipanalsadeh y colaboradores, 2014). También, los astrocitos pueden secretar otros factores tróficos como VEGF (Nicoletti y colaboradores, 2008; Inada y colaboradores, 2014), NGF, BDNF, FGF, entre otros (Zhang y Zhu, 2011), los cuales podrían actuar en el hipocampo en respuesta a la PRL, sin embargo, es necesario hacer más experimentos para evidenciar una posible participación de éstos.

Por otra parte, en algunos trabajos se ha tratado de relacionar el efecto de algún tratamiento sobre el desempeño cognitivo en tareas que involucran el hipocampo, cuando los sujetos son administrados con KA (Gobbo y O'Mara, 2004), con la finalidad de tener un tratamiento que evite el deterioro cognitivo causado por el daño. Utilizando el paradigma de NOR, en el cual se ha mostrado que existe participación del hipocampo en su región CA1 para ejecutar la tarea (Rampon y colaboradores, 2002), evaluamos si la PRL evitaba el deterioro cognitivo causado por el KA.

La ejecución de la prueba un día después de la administración de KA, mostró que todos los sujetos, sin importar el tratamiento que recibieron, reconocen el objeto familiar explorando mayoritariamente el novedoso. Algunos trabajos que evaluaron la participación del hipocampo mediante lesiones o inactivación de esta área, mencionan que para alterar la tarea de NOR es necesario un daño mayor al 10% del hipocampo (Broadbent y colaboradores, 2009; Cohen y colaboradores, 2013). Si consideramos que a la administración IP de KA causa degeneración neuronal 8 hrs después de la administración, evaluada por fluorojade-B (Hopkins, Wang y Schmued, 2000) y 24 hrs después evaluado con tinciones argénticas (Covolan y Mello, 2000), y que además se ha descrito que la administración ICV de KA genera un daño mínimo en CA1 a 24 horas después de su administración (Nadler, Perry y Cotman, 1978), es posible que los sujetos que recibieron KA, con y sin PRL, hayan explorado el objeto novedoso de manera similar al grupo control debido a que aún no había sido modificada la integridad del hipocampo. En contraste, la evaluación al día 30 mostró que los sujetos tratados con KA y que no recibieron el tratamiento con PRL exploraron menos el objeto novedoso respecto de los controles de 30 días y respecto de ellos mismos al día 1 post lesión. Esto indica que la

administración de KA tiene un efecto deletéreo sobre la memoria evaluado con la prueba de NOR, como ha sido publicado previamente (Pearson, Schulz y Patel, 2014). El tratamiento con PRL, evitó el deterioro cognitivo causado por el KA, ya que el tiempo de exploración del objeto novedoso no fue distinto al grupo control, además cuando fue comparado el resultado del día 1 con el día 30 post lesión no se presentó una disminución en el tiempo que permanecían los sujetos con el objeto novedoso a diferencia del grupo no tratado. Dicho resultado fue independiente de modificaciones en la actividad locomotriz.

Pocos han sido los trabajos que han intentado relacionar el papel de la prolactina con tareas cognitivas, sin embargo, existen algunos con resultados interesantes. Por ejemplo, en ratones se ha visto que la ausencia de PRL altera la función cognitiva en tareas hipocampales espaciales y no espaciales (Walker y colaboradores, 2012). Respecto a la prueba de NOR, se ha visto en ratas macho que un estado hiperprolactinéxico altera negativamente el reconocimiento del objeto novedoso (Torner y colaboradores, 2013), lo cual contrasta con los resultados obtenidos por nosotros. Sin embargo, como lo hemos mencionado antes, es posible que el papel de PRL sea distinto dependiendo del estado fisiológico del sujeto, obteniendo resultados distintos al evaluar el mismo paradigma. Es posible que el que no se haya modificado la respuesta en la prueba de NOR sea debido a la neuroprotección conferida por la PRL sobre el hipocampo, sin embargo, no descartamos otros efectos de dicha hormona que pudiesen mejorar la función cognitiva, como alteraciones en los niveles de sustancias tróficas que han probado mejorar la función cognitiva (Alipanalsadeh y colaboradores, 2014) o modificaciones en la neurotransmisión hipocampal, por lo que es necesario investigar mas al respecto.

Finalmente, respecto a la evaluación del proceso neurogénico, encontramos que existe un aumento en el número de neuronas positivas a DCX-BrdU y NeuN-BrdU a los 7 y 30 días después de la administración de KA respectivamente, lo que ha sido reportado anteriormente por otros autores (Gray y Sundstrom, 1998). Se sabe que la administración de PRL en ratas estresadas, tiene un efecto positivo sobre la generación de nuevas neuronas (Torner y colaboradores, 2009). En nuestro trabajo, no observamos

alteraciones en la respuesta neurogénica a los 7 o 30 días post daño con respecto al grupo dañado, en los sujetos que fueron administrados con PRL. El daño causado por el KA puede causar un incremento en algunos factores tróficos (Zhang y Zhu, 2011), algunos de los cuales han demostrado tener efectos positivos sobre la neurogénesis, por ejemplo el BDNF (Rudge y colaboradores, 1998; Scharfman y colaboradores, 2005) y el IGF-1 (Liquitaya, 2012). Es posible el microambiente generado por el KA impida observar un posible efecto neurogénico de la PRL, o por el contrario al tener una gran variedad de moléculas pro-neurogénesis, es probable que la presencia de la PRL no modifique el proceso a diferencia de otros modelos, sin embargo, es necesario evaluar mas a fondo si la PRL interviene o no en modificaciones de la neurogénesis como se ha visto en la region del bulbo olfatorio (Shingo, 2003).

En resumen (Fig. 22), después de la administración crónica de la PRL es posible que esta hormona llegue al hipocampo de la rata para ejercer su efecto protector en las neuronas del área CA1 a través de la inhibición de la apoptosis, reduciendo el estrés oxidativo por medio de enzimas antioxidantes como la SOD, etc. Además es posible que dicho efecto protector de la PRL sea ejercido de forma indirecta a través de los astrocitos u otras células como las del endotelio vascular, a través de la generación de factores tróficos como VEGF, TGF alfa, FGF, BDNF, entre otros. También, es posible que la prolactina proteja a las neuronas al reducir el estado inflamatorio causado por el KA lo cual fue visto como una menor astrogliosis. Finalmente, existe la posibilidad de que el mantenimiento de la integridad del área CA1 se haya reflejado como un mejor rendimiento cognitivo en la prueba de NOR comparado con los sujetos que fueron lesionados.

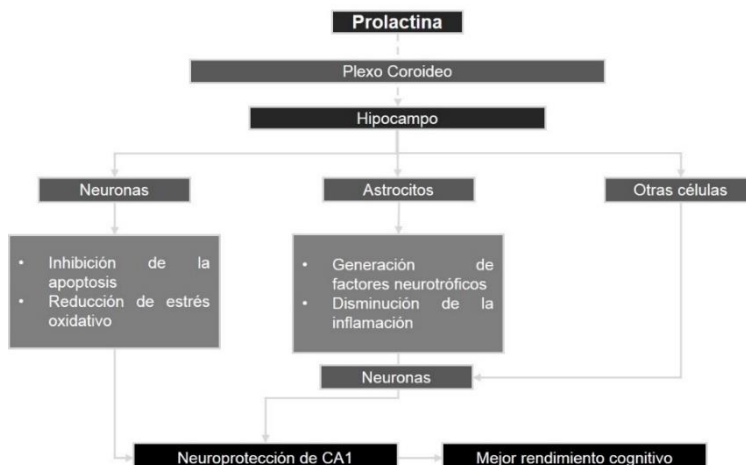


Figura 22. Posibles efectos protectores de la PRL en el área CA1 del hipocampo dorsal.

11. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos mostramos que la PRL administrada después del KA, tiene un efecto protector diferencial en el hipocampo, siendo el área CA1 la única en la que se evitó la pérdida neuronal y la respuesta astrocítica causada por dicho agonista glutamatérgico. Además, mostramos que dicha protección evita el deterioro cognitivo causado por la administración de KA y evaluado con la prueba de NOR,. Finalmente, no encontramos evidencia que implique a la PRL en una modificación en la tasa de neurogénesis en el modelo de excitotoxicidad por KA.

12. REFERENCIAS

1. Abbud, R., Lee, W. S., Hoffman, G., y Smith, M. S. (1992). Lactation Inhibits Hippocampal and Cortical Activation of cFos Expression by NMDA but not Kainate Receptor Agonists. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 3, 244-50.
2. Adán , N., Guzmán-Morales, J., Ledesma-Colunga, M. G., Perales-Canales, S. I., Quintanar-Stéphano, A., López-Barrera, F., Méndez, I., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., Binart, N., Martínez de la Escalera, G., Thebault, S., y Clapp, C. (2013). Prolactin Promotes Cartilage Survival and Attenuates Inflammation in Inflammatory Arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123, 3902-13.
3. Albeni, B. C. (2001). Models of Brain Injury and Alterations in Synaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience Research*, 65, 279–283.
4. Alipanalsadeh, H., Soleimani, M., Asl, S. S., Pourheydar, B., Nikkhah, A., y Mehdizadeh, M. (2014). Transforming Growth Factor- α Improves Memory Impairment and Neurogenesis Following Ischemia Reperfusion. *Cell Journal*, 16, 315-24.
5. Antunes, M., y Biala, G. (2011). The Novel Object Recognition Memory: Neurobiology, Test procedure, and Its Modifications. *Cong Process*, 13, 93-110.
6. Arnold, E., Thebault, S., Baeza-Cruz, G., Arredondo, Z. D., Adán Norma, Quintanar-Stéphano , A., Condés-Lara, M., Rojas-Pilloni, G., Binart, N., Martínez de la Escalera, G., y Clapp, C. (2014). The Hormone Prolactin is a Novel, Endogenous Trophic Factor Able to Regulate Reactive Glia and to Limit Retinal Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 34, 1868-78.
7. Arundine, M., y Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34, 325-337.
8. Bakowska, J. C., y Morrell, J. I. (2003). The Distribution of mRNA for the Short Form of the Prolactin Receptor in the Forebrain of Female Rat. *Molecular Brain Research*, 116, 50-58.
9. Berlyne, D. (1950). Novelty and Curiosity as Determinants of Exploratory Behavior. *Br. J. Psychol.*, 41, 68-80.
10. Bevins, R., Besheer, J. (2006). Object Recognition in Rats and Mice: A One-Trial non-Matching-to-Sample Learning Task to Study "Recognition Memory". *Nature Protocols*, 1(3), 1306-1311.
11. Bleakman, D., y Lodge, D. (1998). Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 37, 1187-1204.

12. Bole-Feysot C, G. V. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*, 19, 225-268.
13. Bolzán, A. D., Bianchi, M. S., Cónsole, G. M., y Goya, R. G. (1997). Relationship Between Pituitary Hormones, Antioxidant Enzymes, and Histopathological Changes in the Mammary Gland of Senescent Rats. *Experimental Gerontology*, 32, 297-04.
14. Bolzán, A. D., Brown, O. A., Goya, R. G., y Bianchi, M. S. (1995). Hormonal Modulation of Antioxidant Enzyme Activities in Young and Old Rats. *Experimental Gerontology*, 30, 169-75.
15. Botana, L. M. (2000). Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection. *EUA: Pharmacology, Physiology and Detection*.
16. Bridges, R. S., Numan, M., Ronsheim, P. M., Mann, P. E., y Lupini, C. E. (1990). Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Neurobiology*, 87, 8003-8007.
17. Broadbent, N., Gaskin, S., Squire, L., y Clark, R. (2009). Object Recognition Memory and the Rodent Hippocampus. *Learning and Memory*, 17(1), 5-11.
18. Broadbent, N., Squire, L., y Clark, R. (2004). Spatial Memory, Recognition Memory and the Hippocampus. *PNAS*, 101(40), 14515-20.
19. Bustamante, E. (2007). *El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano*. Colombia: Universidad de Antioquia.
20. 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. *Neuroscience Letters*, 461, 136-139.
21. Cardinali, D. P. (2007). *Neurociencia Aplicada. Sus Fundamentos*. Argentina: Panamericana.
22. Chamberland, S., y Topolnik, L. (2012). Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 01-13.
23. Chandrasekaran, A., Ponnambalam, G., y Kaur, C. (2004). Domoic Acid-induced Neurotoxicity in the Hippocampus of Adult Rats. *Neurotoxicity Research*, 6, 105-117.
24. Cohen, S., Munchow, A., Rios, L., Zhang, G., Ásgeirsdóttir, H., y Stackman, R. (2013). The Rodent Hippocampus Is Essential for Nonspatial Object Memory. *Current Biology*, 23(17), 1685-1690.
25. Covolan, L., y Mello, L. A. (2000). Temporal Profile of Neuronal Injury Following Pilocarpine or Kainic Acid-Induced Status Epilepticus. *Epilepsy Research*, 39, 133-52.

26. DeVito, W. J., Avakian, C., Stone, S., Okulicz, W. C., Tang, K.-T., y Shamgochian, M. (1995). Prolactin Induced Expression of Interleukin-1 Alpha, Tumor Necrosis Factor-Alpha, and Transforming Growth Factor-Alpha in Cultured Astrocytes. *Journal od Cellular Biochemistry*, 57, 290-98.
27. DeVito, W. J., Okulicz, W. C., Stone, S., y Avakian, C. (1992). Prolactin-Stimulated Mitogenesis of Cultured Astrocytes. *Endocrinology*, 130, 2549-56.
28. DeVito, W. J., Stone, S., y Shamgochian, M. (1995). Prolactin Induced Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein and Tumor Necrosis Factor-alpha at a Wound Site in the Rat Brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 108, 125-30.
29. Eriksson, P., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D., y Cage, F. (1998). Neurogenesis in the Adult Human Hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313-1337.
30. Faherty, C. J., Xanthoudakis, S., y Smeyne, R. J. (1999). Caspase-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Molecular Brain Reserch*, 70, 159-163.
31. Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., y Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. 80, 1523-1586.
32. Frye, C. A., y Walf, A. (2010). Progesterone, Administered Before Kainic Acid, Prevents Decrements in Cognitive Performance in the Morris Water Maze. *Neurocognitive Progesterone*, 71, 142-152.
33. Gobbo, O. L., y O'Mara, S. M. (2004). Post-Treatment, but not Pre-Treatment with the Selective Ciclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib Markedly Enhances Functional Recovery from Kainic Acid-Induced Neurodegeneration. *Neuroscience*, 125, 317-27.
34. Gobbo, O., y O'Mara, S. (2004). Post-Treatment, but not Pre-Treatment, with the Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib Markedly Enhances Functional Recovery From Kainic Acid-Induced Neurodegeneration. *Neuroscience*, 125, 317-327.
35. Goldhar, A. S., Vonderhaar, B. K., Trott, J. F., y Hovey, R. C. (2005). Prolactin-Induced Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Via Egr-1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 232, 9-19.
36. Grattan, D. R. (2001). The Actions of Prolactin in the Brain During Pregnancy and Lactation. *Progress in Brain Resesearch*, 133, 153-171.
37. Gray, W. P., y Sundstrom, L. E. (1998). Kainic Acid Increases the Proliferation of Granule Cell Progenitors in the Dentate Gyrus of the Adult Rat. *Brain Research*, 790, 52-59.

38. Gross, C., y Black, P. (1968). Hippocampal Lesion: Effects on Memory in Rats. *Psychon. Sci.*, 12(5), 165-166.
39. Hopkins, K. J., Wang, G.-J., y Schmued, L. C. (2000). Temporal Progression of Kainic Acid Induced Neuronal and Myelin Degeneration in the Rat Forebrain. *Brain Research*, 864, 69-80.
40. Hopkins, K., Wang, G.-J., y Schmued, L. (2000). Temporal Progression of Kainic Acid Induced Neuronal and Myelin Degeneration in the Rat Forebrain. *Brain Research*, 864, 69-80.
41. Inada , C., Niu, Y., Matsumoto, K., Thi Le, X., y Fujiwara, H. (2014). Possible Involvement of VEGF Signaling System in Recuing Effect of Endogenous Acetylcholine on NMDA-induced Long-lasting Hippocampal Cell Damage in Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Neurochemistry International*, 75, 39-47.
42. Jorgensen, M. B., Finsen, B. R., Jensen, M. B., Castellano, B., Diemer, N. H., y Zimmer, J. (1993). Microglial and Astroglial Reactions to Ischemic and Kainic Acid-Induced Lesions of the Adult Rat Hippocampus. *Experimental Neurology*, 120, 70-88.
43. Kleindienst, A., McGinn, M. J., Harvey, H. B., Colello, R. J., Hamm, R. J., y Bullock, M. R. (2005). Enhanced Hippocampal Neurogenesis by Intraventricular S100B Infusion is Associated with Improved Cognitive Recovery after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 22, 645-55.
44. Konefal, S., Ellior, M., y Crespi, B. (2013). The adaptive significance of adult neurogenesis: an integrative approach. *Frontiers in Neuroanatomy*, 7, 01-21.
45. Kuhn, H., Dickinson-Anson, H., y Cage, F. (1996). Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Rat: Age-Related Decrease of Neuronal Progenitor Proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 16(6), 2027-2033.
46. Lauwers, J., y Swisher, A. (2011). *Counseling the Nursing Mother*. (5 ed.). Jones and Bartlett Publishers, Inc.
47. 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*, 144, 2102-10.
48. Liquitaya-Montiel, A., Aguilar-Arredondo, A., Arias, C. y Zepeda, A. (2012). Insulin Growth Factor-1 Promotes Functional Recovery After a Focal Lesion in the Dentate Gyrus. *CNS and Neurological Disorders*, 11, 818-28
49. Majid, A. (2014). *Neuroprotection in Stroke: Past, Present and Future*. Hindawi, 1-17.

50. Matsuzaki, H., Tamatani, M., Yamaguchi, A., Namikawa, K., Kiyama, H., Vitek, M. P., Mitsuda, N., y Tohyama, M. (2001). Vascular Endothelial Growth Factor Rescues Hippocampal Neurons from Glutamate-Induced Toxicity: Signal Transduction Cascades. *FASEB J*, 15, 1218-20.
51. Ming, G.-I., y Song, H. (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28, 223-250.
52. Mitchell, J., Sundstrom, L. E., y Wheal, H. V. (1993). Microglial and Astrocytic Cell Responses in the Rat Hippocampus afthe an Intracerebroventricular Kainic Acid Injection. *Experimental Neurology*, 121, 224-30.
53. Mödersheim, T. A., Gorba, T., Pathipati, 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. *Neuroscience*, 145, 963-73.
54. Morris, R. (1984). Developments of a Water-Maze Procedure for Studying Spatial Learning in the Rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47-60.
55. Nadler, J. V., Perry, B. W., y Cotman, C. W. (1978). Intraventricular Kainic Acid Preferentially Destroys Hippocampal Pyramidal Cells. *Nature*, 271, 676-77.
56. Nadler, V. J., Perry, B. W., Gentry, C., y Cotman, C. W. (1980). Degeneration of Hippocampal CA3 Pyramidal Cells Induced by Intraventricular Kainic Acid. *The Journal of Comparative Neurology*, 192, 333-59.
57. Nicoletti, J. N., Shah, S. K., McCloskey, D. P., Goodman, J. H., Elkady, A., Scharfman, H. E., y Croll, S. D. (2008). Vascular Endothelial Growth Factor is Up-regulated After Status Epilepticus and Protects Against Seizure-induced Neuronal Loss in Hippocampus. *Neuroscience*, 151, 232-41.
58. 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. *The Journal of Comparative Neurology*, 459, 469-474.
59. Pearson, J. N., Schulz, K. M., y Patel, M. (2014). Specific Alterations in the Performance of Learning and Memory Task in Models of Chemoconvulsant-Induced Status Epilepticus. *Epilepsy Research*, 108, 1032-40.
60. Peirce, S. K., y Chen , W. Y. (2004). Human Prolactin and its Antagonist, hPRL-G129R, Regulate bax and bcl-2 Gene Expression in Human Breast Cancer Cells and Transgenic Mice. *Oncogene*, 23, 1248-55.
61. Pekny, M., Wilhelmsson, U., y Pekna, M. (2014). The Dual Role of Astrocyte Activation and Reactive Gliosis. *Neuroscience Letters*, 565, 30-38.

62. Pérez-Gómez, A., y Tasker, R. (2012). Enhanced Neurogenesis in Organotypic Cultures of Rat Hippocampus After Transient Subfield-Selective Excitotoxic Insult by Domoic Acid. *Neuroscience*, 208, 97-108.
63. Pfaff, D. W. (2002). *Hormones, Brain and Behavior*. San Diego, USA: Elsevier.
64. Pi, X.-J., y Grattan, D. R. (1998). Distribution of Prolactin Receptor Immunoreactivity in the Brain of Estrogen-Treated, Ovariectomized Rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 394, 462-474.
65. Rampon, C., Tang, Y.-P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., y Tsien, J. (2000). Enrichment Induces Structural Changes and Recovery From Nonspatial Memory Deficits in CA1 NMDAR1-Knockout Mice. *Nature America Inc.*, 3(3), 238-244.
66. Redolat, I. R., y Carrasco, P. C. (2007). Hormonas esteroides y procesos cognitivos. En Z. M. Almela, *Hormonas, Estado de Ánimo y Función Cognitivo* (págs. 183-185). España: Publicaciones Delta.
67. Rudge, J. S., Mather, P. E., Pasnikowski, E. M., Cai, N., Corcoran, T., Acheson, A., Andreson, K., Lindsay, R. M., y Wiegand, S. J. (1998). Endogenous BDNF Protein is Increased in Adult Rat Hippocampus after a Kainic Acid Induced Excitotoxic Insult but Exogenous BDNF is not Neuroprotective. *Experimental Neurology*, 149, 398-410.
68. Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., y Croll, S. (2005). Increased Neurogenesis and the Ectopic Granule Cells after Intrahippocampal BDNF Infusion in Adult Rats. *Experimental Neurology*, 192, 348-56.
69. Shingo T., G. C. (2003). Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin. *Science*, 299, 117-120.
70. Sofroniew, M. V. (2005). Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *Neuroscientist*, 11, 400-07.
71. Stricker P., G. R. (1928). Action du lobe anterieur de l'hypophyse sur la mont'ee lacteuse. *C. R. Soc. Biol.*, 99, 1978-80.
72. Swanson, L. (1998). *Brain Maps: Structure of the Rat Brain* (2 ed.). Elsevier.
73. Tejadilla, D., Cerbón, M., y Morales, T. (2010). Prolactin Reduces the Damaging Effects of Excitotoxicity in the Dorsal Hippocampus of the Female Rat Independently of Ovarian Hormones. *Neuroscience*, 169, 1178-1185.
74. Teyler, T., y Discenna, P. (1984). The Topological Anatomy of the Hippocampus: A Clue to Its Function. *Brain Research Bulletin*, 12(6), 711-719.

75. Too, C. L., Knee, R., Pinette, A. L., Li, A. W., y Murphy, P. R. (1998). Prolactin induces expression of FGF-2 and a novel FGF-responsive NonO/p54-related mRNA in Rat lymphoma Cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 137, 187-95.
76. Torner, L., y Neumann, I. D. (2002). The Brain Prolactin System: Involvement in Stress Response Adaptations in Lactation. *Stress*, 5, 249-257.
77. Torner, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, H.-G., Winkler, J., Aigner, L., y Neumann, I. (2009). Prolactin Prevents Chronic Stress-Induced Decrease of Adult Hippocampal Neurogenesis and Promotes Neuronal Fate. *The Journal of Neuroscience*, 29(6), 1826-1833.
78. Torner, L., Tinajero, E., Lajud, N., Quintanar-Stéphano, A., y Olvera-Cortés, E. (2013). Hyperprolactinemia Impairs Object Recognition without Altering Spatial Learning in Male Rats. *Behavioural Research*, 252, 32-39.
79. Van der Borght, K., Havekes, R., Bos, T., Eggen, B., y Van der Zee, E. (2007). Exercise Improves Memory Acquisition and Retrieval in the Y-Maze Task: Relationship With Hippocampal Neurogenesis. *Behavioral Neuroscience*, 121(2), 324-334.
80. Vanoye-Carlo, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza-Rodríguez, A., y Cerbón, M. (2008). Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Hormones and Behavior*, 53, 112-123.
81. Walker, T. L., Vukovic, J., Koudjij, M. M., Blackmore, D. G., Mackay, E. W., Sykes, A. M., Overall, R. W., Hamlin, A. S., y Bartlett, P. F. (2012). Prolactin Stimulates Precursor Cells in the Adult Mouse Hippocampus. *PLOS one*, 7, e44371. doi:10.1371/journal.pone.0044371.
82. Walsh, R., Posner Barry, y Patel, B. (1984). Binding and Uptake of [¹²⁵I]iodoprolactin by Epithelial Cells of the Rat Choroid Plexus: An in vivo Autoradiographic Analysis. *Endocrinology*, 114(5), 1496-1505.
83. Walsh, R., Slaby, F., y Posner, B. (1987). A Receptor-Mediated Mechanism for the Transport of Prolactin from Blood to Cerebrospinal Fluid. *Endocrinology*, 120(5), 1846-1850.
84. Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Sun, G. Y., y Sun, A. Y. (2005). Kainic Acid-Mediated Excitotoxicity as a Model for Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 31, 3-16.
85. Yen, S. C., Jaffe, R. B., & Barbieri, R. (2001). *Endocrinología de la Reproducción*. Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
86. Yoshimura, S., Teramoto, T., Whalen, M. J., Irizarry, M. C., Takagi, Y., Qiu, J., Harada, J., Waeber, C., Breakefield, X. O., y Moskowitz, M. A. (2003). FGF-2 Regulates

- Neurogenesis and Degeneration in the Dentate Gyrus After Traumatic Brain Injury in Mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 112, 1202-10.
87. Zhang, X.-M., y Zhu, J. (2011). Kainic Acid-Induced Neurotoxicity: Targeting Glial Responses and Glia-Derived Cytokines. *Current Neuropharmacology*, 9, 388-98.
88. Zheng, X.-Y., Zhang, H.-L., Luo, Q., y Zhu, J. (2011). Kainic Acid-Induced Neurodegenerative Model: Potentials and Limitations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-11.
89. Zhou , X., Hollern, D., Andrechek, E., y Wang, H. (2013). NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell Death and Disease*, 4, 1-11.

13. ANEXOS

13.1 ANEXO I. OVARIECTOMÍA

Objetivo: Remover los ovarios de la rata (castración).

Materiales y Método.

- Ratas hembra de la cepa *Wistar* de entre 180-200g.
- Material de cirugía (Pinzas de disección, tijeras finas, hilo y aguja para suturar, grapas para sutura).
- Solución de Ketamina + Xilacina (70mg + 6mg / ml, *Cheminova de México*).
- Material para sanitización (alcohol 96%, cloruro de benzalconio, algodón, toallas de papel).

Procedimiento.

Después de anestésiar al animal con 0.25 ml de la solución de Ketamina-Xilacina (IP), se procedió a rasurar y desinfectar el lado izquierdo-dorsal del animal por debajo de las costillas. Posteriormente se realizó una incisión de aproximadamente 1.0 cm cortando primero la piel y posteriormente el músculo para así tener acceso a una de las gónadas. Con ayuda de unas pinzas de disección se extrae el ovario dejando expuesto aproximadamente 1.0 cm de la trompa de Falopio y la arteria útero-ovárica, las cuales serán ligadas con un hilo de sutura por debajo del ovario para evitar una hemorragia una vez que éste sea seccionado. Finalmente la trompa de Falopio es reintroducida a la cavidad del animal y se procede a suturar con hilo el músculo con el fin de evitar herniado de algún órgano y posteriormente la piel con ayuda de 2 grapas para sutura. El mismo procedimiento es llevado a cabo del lado contrario del animal para extraer el segundo ovario. El animal es limpiado en la zona expuesta a cirugía con cloruro de benzalconio y posteriormente es colocado en su caja para monitorear su completa recuperación en los días siguientes.

13.2. ANEXO II. INYECCIÓN INTRACEREBRO-VENTRICULAR (ICV)

Objetivo: Administración de la solución de ácido kaínico en el caso del grupo problema y control positivo; y de solución salina isotónica en el caso del grupo control en uno de los ventrículos laterales del cerebro.

Materiales y Método.

- Ratas hembra de la cepa *Wistar* previamente ovariectomizadas.
- Material de cirugía (bisturí, grapas para sutura, pinzas de disección).
- Estereotáxico y taladro para cirugía.
- Jeringas Hamilton de 10 μ l
- Solución de Ketamina + Xilacina (70mg + 6mg / ml, *Cheminova de México*).
- Solución salina isotónica (0.9%).
- Ácido kaínico (100ng/ μ l, *Sigma-Aldrich*).
- Material para sanitización (alcohol 96%, cloruro de benzalconio, algodón, toallas de papel).

Procedimiento.

Después de anestesiar al sujeto de experimentación con 0.35ml de la solución de Ketamina-Xilacina (IP), se rasuró la parte superior de la cabeza y se colocó cuidadosamente el animal en el aparato estereotáxico para efectuar la administración de la solución correspondiente.

Primero se procedió a desinfectar la parte superior de la cabeza del sujeto y se realizó una incisión de aproximadamente 1.5cm para descubrir el cráneo del animal. Con ayuda de las pinzas de disección y un fragmento de algodón se retiró el tejido muscular del cráneo con el fin de dejarlo completamente descubierto e identificar la sutura cerebral *Bregma* para usarla como referencia 0. Colocar la punta de la jeringa Hamilton montada en el estereotáxico *Bregma* y ajustar los ejes antero-posterior (Y), lateral-medial (X) y ventral-dorsal (Z) en 0. Posteriormente, se fijaron las coordenadas (Y: -1.3, X:-1.9) y se realizó un orificio en el cráneo con ayuda del taladro para cirugía hasta llegar a las

meninges. Una vez limpiada la zona se introdujo la jeringa Hamilton moviendo el eje ventro-dorsal del estereotáxico (Z: -5.0) y se administró 1µl de la solución de ácido kaínico o salina dependiendo del grupo al que perteneciera el sujeto. Para dejar que la solución difundiera en el cerebro, la jeringa fue retirada 1 minuto después de la administración. Finalmente se retiró la jeringa cuidadosamente para evitar dañar el tejido y se limpió la zona afectada con ayuda de algodón y cloruro de benzalconio para posteriormente suturar la herida con ayuda de grapas para sutura.

13.3. ANEXO III. IMPLANTE DE MINIBOMBA OSMÓTICA

Objetivo: Implantar la bomba osmótica en el sujeto de experimentación para la administración crónica de la solución de prolactina o salina durante 7 días consecutivos de tratamiento.

Material y Método.

- Ratas hembra de la cepa *Wistar* previamente ovariectomizadas.
- Material de cirugía (tijeras de disección, grapas para sutura, pinzas de disección).
- Minibombas osmóticas (*Alzet, modelo 2001*).
- Solución de Ketamina + Xilacina (70mg + 6mg / ml, *Cheminova de México*).
- Prolactina de hipófisis de oveja (4.3mg/ml, *Sigma-Aldrich*).
- Solución salina isotónica (0.9%).
- Material para sanitización (alcohol 96%, cloruro de benzalconio, algodón, toallas de papel).

Después de realizar la administración intracerebro-ventricular (Anexo II), se procedió a implantar una bomba osmótica, previamente cargada con 200µl de la solución de prolactina o solución salina isotónica dependiendo del tratamiento, en la parte dorsal de la rata.

En primer lugar se procedió a desinfectar el área donde sería colocada la bomba, posteriormente se realizó una incisión de aproximadamente 1.0cm en la piel del sujeto a través de la cual se separó del tejido muscular para poder introducir la bomba osmótica con el fármaco.

Finalmente se limpió el área con ayuda de cloruro de benzalconio y se suturó la herida con ayuda de grapas para sutura. Después de 7 días (grupo 7D), el animal fue sacrificado y el tejido cerebral fue obtenido para su análisis. En otro grupo de animales (grupo 30D), las bombas fueron retiradas a los 7 días bajo anestesia, ya que su permanencia en el animal es nociva.

13.4. ANEXO IV. PRUEBA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

Objetivo: Determinar la existencia de un déficit cognitivo en los grupos tratados con ácido kaínico, a corto plazo inmediatamente después del daño, y a largo plazo para determinar si existe una mejora cognitiva por el tratamiento con prolactina. Lo anterior evaluado con la prueba de reconocimientos de objetos novedosos.

Material y Método.

- Ratas hembra de la cepa *Wistar* previamente ovariectomizadas.
- Caja de acrílico negro de 50x50x30cm.
- 2 pares de objetos completamente iguales.
- Solución limpiadora (etanol 10%, extran 10% en agua desionizada).
- Toallas de papel.
- Cronómetro.

Siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección de Métodos (Figura 9), se procedió a realizar el siguiente procedimiento:

1. Día -4, -3: Habitación. Los animales son colocados por 30 minutos en el cuarto de experimentación, antes de colocarlos en la caja de prueba. Posteriormente se les deja explorar la caja durante 8 minutos para posteriormente ser regresados a su caja “hogar”.
2. Día -2, -1: Familiarización. Se llevó a cabo durante dos días consecutivos con 2 objetos idénticos. Se permitió una exploración por 8 minutos con los objetos colocados previamente en la caja separados 15 cm de las paredes adyacentes y 20 cm entre ellos. Posteriormente se regresó el sujeto a su caja “hogar”.
3. Día 1: Prueba. El sujeto fue introducido a la caja de prueba que contiene un objeto de la etapa de familiarización y un objeto nuevo (novedoso). Se le permitió un tiempo de exploración de 8 minutos para posteriormente regresarlo a su caja.

Con la finalidad de comparar los datos obtenidos en ambos puntos de la prueba y conocer si el sujeto tratado mejoro su memoria con respecto a los grupos tratados con solución salina. El mismo procedimiento se realizó otra vez a partir del día 26 post-lesión.

La caja y los objetos fueron sanitizados con la solución limpiadora cada vez que se colocaba un nuevo sujeto a fin de evitar la existencia de olores que pudiesen mermar el desempeño de los animales durante cada una de las fases del experimento.

Para el análisis de datos se cronometró el tiempo que exploraba cada sujeto en ambos objetos durante 5 minutos y se obtuvo el porcentaje de tiempo de exploración en cada objeto mediante la siguiente fórmula:

% Tiempo en Objeto X=

$$\frac{\text{Tiempo de exploracion en X}}{\text{Tiempo de exploración en X} + \text{Tiempo de exploración en Y}} * 100$$

Finalmente se procedió a hacer un análisis de varianza bifactorial seguido de una prueba Tukey, para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos y entre el tipo de objeto utilizado.