



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**PSICOLOGÍA**

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DE LA LACTANCIA EN  
EL HIPOCAMPO DE LA RATA HEMBRA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA  
P R E S E N T A:  
NANCY KARINA CABRERA SERRANO**

**JURADO DE EXAMEN**

**DIRECTORA: DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN  
COMITÉ: DR. ALEJANDRO VALDÉS CRUZ  
DR. VÍCTOR MANUEL MAGDALENO MADRIGAL  
MTRO. MARTÍN PÉREZ MENDOZA  
LIC. JUAN CARLOS DEL RAZO BECERRIL**



MÉXICO, CDMX

MAYO, 2016



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.

# Índice

I INTRODUCCIÓN .....	7
II ANTECEDENTES.....	9
II.1 NEUROPLASTICIDAD EN EL CEREBRO MATERNO.....	9
II.2 NEUROPROTECCIÓN ANTE ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO KAÍNICO EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA.....	11
II.3 LACTANCIA COMO MODELO DE NEUROPROTECCIÓN ANTE DAÑO EXCITOTÓXICO.....	17
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
IV JUSTIFICACIÓN .....	21
V HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	21
VI OBJETIVOS.....	22
VI.1 OBJETIVOS GENERALES .....	22
VI.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
VII MATERIAL Y MÉTODOS .....	22
VII.1 DISEÑO DE ESTUDIO .....	22
VII.2 UNIVERSO DE ESTUDIO.....	23
VII.3 VARIABLES.....	24
VII.4 TÉCNICAS.....	24
VII.4.1 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE TEJIDO .....	24
VII.4.2 PROTOCOLOS DE HISTOLOGÍA.....	25
VIII DISEÑO ESTADÍSTICO .....	27
VIII.1 OBTENCIÓN DE DATOS.....	28
VIII.2 CUANTIFICACIÓN CELULAR.....	28
VIII.3 CONTEO DE PÍXELES .....	28
VIII.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	29
IX. RESULTADOS .....	30
IX.1 DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA CELULAR POR TINCIÓN DE NISSL.....	30
IX.2 MARCAJE DE NEURODEGENERACIÓN CON FLUORO JADE C.....	34
X. DISCUSIÓN .....	38
XI. CONCLUSIONES .....	40
ANEXO I: ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	41
XII. REFERENCIAS.....	42

## **AGRADECIMIENTO INSTITUCIONAL**

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología del Instituto de Neurobiología de la UNAM con la supervisión de la Dra. María Teresa Morales Guzmán.

Este trabajo de tesis contó con apoyo financiero de los donativos UNAM-DGAPA-PAPIIT IN 202812 y IN202315, y de CONACYT 128090; y con apoyo técnico del personal académico del INB-UNAM:

Biol. María Eugenia Ramos Aguilar

M en C. Alejandra Castilla León

M.V. Z. Martín García Servín

Tec. C Víctor Pérez

Alumnos del Laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología:

M. en C. Cesar David Solís García

M. C Ilektra Anagnostou

QFI Julio Daniel Reyes Mendoza

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre, que siempre ha apoyado e impulsado mi crecimiento tanto personal como profesional. Quien me enseñó a siempre hacer lo que amo y afrontar cada uno de mis miedos buscando también la fortaleza que hay en ellos, lo cual se ha convertido en mi forma de vida . A ti que incentivaste siempre mis sueños y amores por más extraños que estos fueran. Por esto no puedo olvidar darte las gracias por tantos libros, rompecabezas y acertijos que enriquecieron mi infancia y nutrieron mi mente siempre insatisfecha e inquieta de “querer saber siempre más”, gracias por hacerme una “glotona de información” y por mostrarme lo que significa ser una mujer fuerte y criarme con fortaleza, independencia, libertad y amor. Sobre todo gracias madre por mostrarme que no existen límites para alcanzar nuestras metas y enseñarme a ignorar las convenciones sociales impuestas hacia la mujer.

A ti *bolita*, siempre estarás en mi corazón. Me enseñaste tanto sobre el valor de la familia y de las relaciones, tú me mostraste que un corazón humano tiene tanto amor y calidez que no cabe en un cuerpo y hay de darlo siempre a nuestros queridos y aún más ofrecerlo a aquellos que lo necesitan. Fuiste un gran modelo de persona, siempre brindando refugio en tu amor y haciendo frente a la vida.

A mis amigos que a pesar de ser tan rara y ermitaña siempre han estado presentes y en varios momentos fueron mi soporte en los tiempos difíciles y con quienes siempre celebró cada uno de nuestros triunfos y alegrías. Quienes se han robado mi corazón.

A Eric, por todo el amor, el apoyo así como las porras y regaños. Por ser la gran persona que es y tanto admiró, mi compañero y mi amor.

A todos mis profesores, por las clases, tantas charlas, consejos y lecciones de vida y sobre todo gracias por el amor y dedicación a su trabajo lo cual fue pilar en mi formación académica y personal.

A la Dra. Tere, sin la cual este trabajo no habría sido posible, a quien admiró por su labor científica y por la persona que es. Gracias por los regaños, los consejos, las pláticas y sobre todo la paciencia. Gracias por brindarme un refugio en su laboratorio y convertirse en un modelo a seguir.

A ti UNAM, *mi alma mater*. A ti debo mi formación y desarrollo, me enseñaste lo que significa libertad, independencia, honestidad, esfuerzo, capacidad, dedicación, ambición y excelencia en la vida profesional. Siempre serás mi muy amada proveedora de alimento intelectual e impulsora y hacedora de sueños y experiencias. Contigo aprendí a no conformarme nunca, a que el conocimiento es base fundamental de la libertad por lo cual, el conocimiento se comparte.

## RESUMEN

Durante el periodo de lactancia en el cerebro materno se generan una serie de cambios que favorecerán su adaptación para poder hacer frente a la demanda que la maternidad representa, siendo éstos tanto morfológicos como funcionales en la plasticidad cerebral durante la etapa de lactancia. Estudios previos en nuestro laboratorio muestran que durante el periodo de lactancia se manifiesta un efecto neuroprotector en el hipocampo dorsal de la rata hembra ante la acción excitotóxica del ácido kaínico (AK). En el presente trabajo se investigó si este efecto neuroprotector resulta mayor en el inicio de la lactancia y también si es crucial el establecimiento de la lactancia (estimulación de succión) para que se presente la resistencia ante el daño excitotóxico provocado por AK en el hipocampo dorsal. El daño celular fue administrado al 4° día postparto mediante la inyección de AK y fue evaluado por el método histológico de tinción de Nissl y con Fluoro-Jade C. Los resultados muestran que la administración sistémica de AK indujo una clara degeneración en el hipocampo de ratas vírgenes. Este efecto deletéreo del AK no fue observado en ratas lactantes con condición postparto con crías (LACT-AK-CC) o sin crías (LACT-AK-SC). Se cuantificó la pérdida del número celular por administración de AK la cual resultó ser mínima en los grupos de ratas lactantes, no hubo significancia estadística entre los grupos LACT-SS-CC con respecto a LACT-AK-CC y LACT-SS-SC con respecto a LACT-AK-SC. Solamente la comparación del número celular de la región CA1 del hipocampo del grupo LACT-AK-CC con LACT-AK-SC mostró una diferencia significativa ( $p=0.04$ ). Por otro lado, se observaron diferencias morfológicas en las células piramidales de las áreas CA1, CA3 y CA4 de las ratas hembras lactantes frente a las ratas vírgenes, tanto en aquellas con administración de AK como las administradas con solución salina. Estos resultados indican que desde el inicio de la lactancia el cerebro materno se encuentra protegido ante este tipo de daño; la menor sensibilidad al daño excitotóxico se presenta de manera independiente de la succión y del establecimiento de la lactancia, sugiriendo así que este efecto neuroprotector puede existir desde el embarazo.

## I INTRODUCCIÓN

Durante el ciclo reproductivo de los mamíferos, las hembras pasan por un proceso de reorganización de diferentes señales sensoriales, olfatorias, visuales y auditivas. Estas adaptaciones facilitan el cuidado y mantenimiento de las crías (Moratalla, 2004) las cuales dependen completamente de los cuidados maternos. La maternidad, incluida la lactancia, representa una fase en la cual las señales internas generan una reorganización del sistema que es mantenido por la información aferente y resulta en respuestas adaptativas eferentes (Morales, 2011). Recientemente, se ha dado una especial atención a la plasticidad neuronal relacionada con la reproducción. Por ejemplo, en la región cerebral del hipocampo se ha reportado una menor tasa de neurogénesis y el aumento en espinas dendríticas durante el periodo de lactancia (área CA1). Otro aspecto a resaltar radica en que los cambios en las diferentes regiones del cerebro materno no sólo ocurren en las neuronas, sino que también abarcan a las células gliales (Cabrera, 2009), las cuales tienen una función en la respuesta inmune y dan aislamiento eléctrico a los nervios. Uno de los modelos de daño cerebral en animales adultos más utilizados es el de la inducción de daño excitotóxico en las neuronas piramidales del hipocampo y en la región hilar por la inyección de AK (Schwob, 1980; Sperk, 1985). Cuando se administra AK por vía sistémica o intracerebral a ratas se observa la destrucción de las células piramidales del hipocampo principalmente y en particular en el área CA3 (Nadler, 1980).

Se ha observado que durante el periodo de lactancia se manifiesta un efecto neuroprotector ante la acción dañina de AK, ya que disminuye la sensibilidad en el hipocampo dorsal de la rata en lactancia, en comparación con ratas vírgenes (Morales, 2011). Por lo tanto, resulta necesario indagar más acerca de este fenómeno en el cual las hormonas implicadas en el embarazo y la lactancia juegan un papel por demás importante. La protección conferida a la madre durante la lactancia se ha analizado a diferentes días postparto; sin embargo, no se conoce si se presenta desde el embarazo. Por esto, en el presente trabajo se analiza el papel de la succión y el establecimiento de la lactancia en este fenómeno. Este trabajo toma a la lactancia como un modelo de neuroprotección natural, focalizando la atención en el período temprano, en específico a los primeros cuatro días postparto, con dos condiciones postparto: 1) el establecimiento de la lactancia con el mantenimiento de las crías y 2) la

separación de las crías y la madre al nacer para evitar así la estimulación de la succión por el amamantamiento. En estos animales se analizó si se presenta algún cambio en este estadio temprano ante la lesión excitotóxica en el hipocampo. Se realizaron dos métodos de análisis histológico: tinción de Nissl para determinar la densidad y la morfología de las células piramidales del hipocampo y la tinción con Fluoro Jade C, el cual es un marcador de muerte celular para determinar el grado de neurodegeneración. Una vez obtenidos los datos, se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de ANOVA de dos vías en el paquete estadístico *GraphPad PRISM*.

## II ANTECEDENTES

### II.1 NEUROPLASTICIDAD EN EL CEREBRO MATERNO

La plasticidad cerebral es una propiedad intrínseca del sistema nervioso central (SNC) retenida durante el periodo vital y que implica una serie de cambios fisiológicos y morfológicos en el cerebro que ocurren en respuesta a modificaciones en la señal aferente o en la respuesta motora (eferente). Dentro de los cambios estructurales se incluyen el establecimiento de nuevas conexiones, el crecimiento dendrítico y la arborización, y pueden seguir cambios rápidos y dinámicos constituyendo un mecanismo de desarrollo, crecimiento y aprendizaje. Además, puede haber cambios en función de las células gliales y en la habilidad de generar nuevas células en algunas estructuras (neurogénesis) (Pascual-Leone *et al.* 2005).

Los mecanismos biológicos implicados en la plasticidad cerebral más importantes son: La ramificación o sinaptogénesis reactiva, que es el crecimiento de un cuerpo celular hacia otro como consecuencia de su crecimiento normal; supersensibilidad de desnervación, la cual resulta de un permanente incremento de la respuesta neuronal por la disminución de las aferencias; compensación conductual, que se refiere a que pueden desarrollarse nuevas combinaciones de conductas después de un daño; neurotransmisión por difusión no sináptica, en la que existe un incremento en la regulación de receptores de membrana extrasinápticos después de la destrucción de las vías dopaminérgicas, según se ha demostrado en un modelo de isquemia; desenmascaramiento, que se refiere a cómo las conexiones neuronales en reposo que están inhibidas en el estado normal pueden desenmascarse después de un daño cerebral; factores tróficos, siendo éstos los relacionados con la recuperación cerebral después de una lesión; sinapsinas, las cuales son fosfoproteínas que aglutinan vesículas sinápticas y las unen al citoesqueleto de las membranas; y los neurotransmisores, que además de mediar información transináptica pueden inducir efectos de sinaptogénesis y reestructuración neuronal, regeneración de fibras y células nerviosas, diasquisis, potencialización a largo plazo y potencialización a corto plazo (Morales, 2003, Rebolledo, 2003, Hernández-Muela, 2004).

La neuroplasticidad puede modificarse dependiendo de la edad, el ambiente, el género y el estado fisiológico del sujeto. Un ejemplo pertinente es la lactancia (Kinsley *et al.*, 2008), ya que ésta representa una fase en la cual las señales internas generan una reorganización del sistema que es mantenido por la información aferente y resulta en respuestas adaptativas eferentes. Tal reorganización puede ser demostrable a varios niveles, como el anatómico, fisiológico y conductual. Estudios en humanos reportan que las regiones del cerebro materno, incluida la sustancia negra, amígdala, tálamo, corteza parietal y corteza prefrontal, son activadas en respuesta a los estímulos que resultan de la relación con un infante. Por esto, se sabe que estas partes del cerebro tienen un rol importante en el desarrollo y expresión de la conducta maternal (Morales, 2011).

En investigaciones recientes se ha dado una especial atención a la plasticidad neuronal relacionada con la reproducción. Por ejemplo, en la región CA1 del hipocampo se ha reportado una menor tasa de neurogénesis y el aumento en espinas dendríticas. Otro aspecto que vale la pena resaltar radica en que los cambios en las diferentes regiones del cerebro materno no sólo ocurren en las neuronas, sino que también abarca a las células gliales, las cuales también tienen una función en la respuesta inmune y dan aislamiento eléctrico a los nervios. El número y la forma de las células gliales están aumentados en la corteza cerebral, el giro dentado del hipocampo y en otras regiones del cerebro de la madre (Cabrera, 2009).

En paralelo con estas alteraciones morfológicas, la experiencia reproductiva mejora el aprendizaje espacial y la memoria a corto y largo plazo, disminuye la expresión de marcadores de envejecimiento neuronal, modifica la transmisión glutamatérgica y confiere neuroprotección contra daño excitotóxico. Todas estas adaptaciones en el cerebro de la madre le sirven para contender con las demandas que la experiencia materna conlleva. Referente a estos datos, cabe mencionar que en el cerebro materno ocurren dos cambios cognitivos importantes: 1) el mejoramiento en su habilidad para buscar comida, lo cual implicaría una mejora en su capacidad de aprendizaje y memoria espacial; y 2) una disminución de su ansiedad y miedo, así como el aumento en su conducta agresiva contra intrusos (Kinsley, 2006).

## **II.2 NEUROPROTECCIÓN ANTE ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO KAÍNICO EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA**

La neuroprotección es un conjunto de mecanismos celulares dirigidos a prevenir o limitar la magnitud de una lesión o la muerte del tejido cerebral para asegurar su supervivencia ante factores de daño, tanto internos como externos. Un agente neuroprotector es un factor que previene la muerte neuronal mediante la inhibición de uno o más de los pasos fisiopatológicos en los procesos que siguen a una lesión de sistema nervioso, isquemia debida a la oclusión de una arteria, o hipoxia debida a cualquier causa (Kewal, 2011). La excitotoxicidad es uno de los procesos que se presentan después de una lesión, la cual es el mecanismo que promueve la muerte celular mediante la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos o de cualquiera de sus análogos. Ésta provoca la entrada excesiva de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a la célula que es secuestrado por la mitocondria, ello conlleva un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, que provoca la disfunción metabólica, la producción de radicales libres, la activación de proteasas, fosfolipasas, la sintasa del óxido nítrico y endonucleasas, la inhibición de la síntesis de proteínas, generación de radicales libres que inducen la peroxidación de lípidos de la membrana, la síntesis de óxido nítrico y la activación de enzimas involucradas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos. Además, el óxido nítrico puede actuar como mensajero retrógrado y potenciar el efecto excitotóxico del glutamato al aumentar su liberación desde las terminales presinápticas. Una vía de daño celular es la activación de óxido nítrico sintasa, cuyo producto reacciona con el superóxido y forma el peroxinitrito. Otra vía es la activación de la poli-adenosina difosfato ribosa-polimerasa (PARP) como respuesta al daño del ADN mediado por los radicales libres (Lorigados, 2013)

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia en SNC de los mamíferos. La regulación de la neurotransmisión glutamatérgica es crítica no sólo por las propiedades de señalización atribuidas a los niveles y la actividad del glutamato y su receptor, sino también por la muerte celular excitotóxica (Wang, 2010. Yang, 2011). Inicialmente se describió que la muerte celular inducida por excitotoxicidad se caracteriza por el aumento del volumen de la célula, la vacuolización del citoplasma y la ruptura de las membranas, características que apuntan a un proceso de muerte celular necrótica. Luego se definió que la degradación

internucleosomal del ADN y la activación de las caspasas son indicativas de muerte neuronal apoptótica (Rodríguez-Moreno, 2003. Lorigardos, 2013). Recientemente, se sugiere que la autofagia puede ser un mecanismo de muerte celular no apoptótica inducida por excitotoxicidad, lo que revela que la autofagia es una estrategia de respuesta ante el estrés (Wang, 2010) y se activa como respuesta a un daño excitotóxico agudo.

El mecanismo de acción del glutamato es relativamente simple: la liberación del exceso de glutamato provoca la despolarización y repolarización repetitiva de las terminales del glutamato, lo que conduce a su concentración tóxica y finalmente origina la degeneración excitotóxica de la neurona posináptica (Eid, 2008. Pereno, 2010). La excitotoxicidad mediada por el receptor de glutamato ejerce una función importante en el desarrollo neuronal, la diferenciación y la plasticidad (Wang, 2010. Yang, 2011). Los receptores que activa el glutamato se han dividido en dos grandes familias: receptores metabotrópicos y receptores ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos (mGluR) están acoplados a proteínas G y regulan la producción de los mensajeros intracelulares. Por el contrario, los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) forman un canal catiónico con diferente selectividad iónica según el tipo de receptor, son permeables a sodio, potasio y en ocasiones a  $Ca^{2+}$ . En función del agonista que produce la activación de éstos con mayor afinidad, los receptores ionotrópicos de glutamato se han clasificado en tres tipos: receptores de NMDA, receptores de AMPA y receptores de kainato. Actualmente está bien establecido que la activación de los receptores a kainato (KAR) situados en la parte presináptica de los contactos excitadores puede producir una depresión de la liberación del neurotransmisor glutamato. La mayoría de los estudios del efecto del kainato sobre la transmisión glutamatérgica se han llevado a cabo en el hipocampo, siendo esta parte del cerebro donde mejor se conoce la función de estos receptores, concretamente se han estudiado las sinapsis establecidas entre las neuronas piramidales de CA3 y CA1 por las colaterales de Schaffer y la establecida entre los axones de las células granulosas del giro dentado (fibras musgosas) y las dendritas proximales de las neuronas piramidales de CA3 (Rodríguez-Moreno, 2003-2006).

El hipocampo es una importante región del cerebro tanto de los seres humanos como de los mamíferos en general, y desempeña un papel importante en la memoria a largo plazo como en la navegación espacial. Forma parte del sistema límbico, se encuentra localizado en la parte medial e interna del lóbulo temporal bajo la superficie cortical. A su vez, forma parte del

conjunto de regiones las cuales en conjunto dan lugar a la formación hipocámpica (FH). En cuanto a la localización anatómica de la FH de la rata, ésta es una estructura elongada, bilateral y prominente que mide aproximadamente 1.2 cm y se localiza en el lóbulo temporal. Su ubicación obedece a dos ejes: el longitudinal, en forma de “C”, limitándose rostro-dorsalmente con el septum y pasando por detrás y a lo largo del diencéfalo (este gran eje corre en dirección septo-temporal), y el eje transversal, que es donde se encuentra el giro dentado en su extremo proximal y el surco rinal en el extremo distal. El hipocampo se pliega hacia arriba y hacia adentro en la porción interna de la corteza temporal para formar la superficie ventral del asta anterior del ventrículo lateral. Un extremo limita con los núcleos amigdalinos y uno de sus bordes se fusiona con la circunvolución parahipocámpica, que forma la corteza de la superficie ventromedial del lóbulo temporal. Según la profundidad, a las regiones más cercanas a la pía se les denomina superficiales y a las más cercanas al ventrículo, profundas (Paxinos, 1995) (Figura 1).

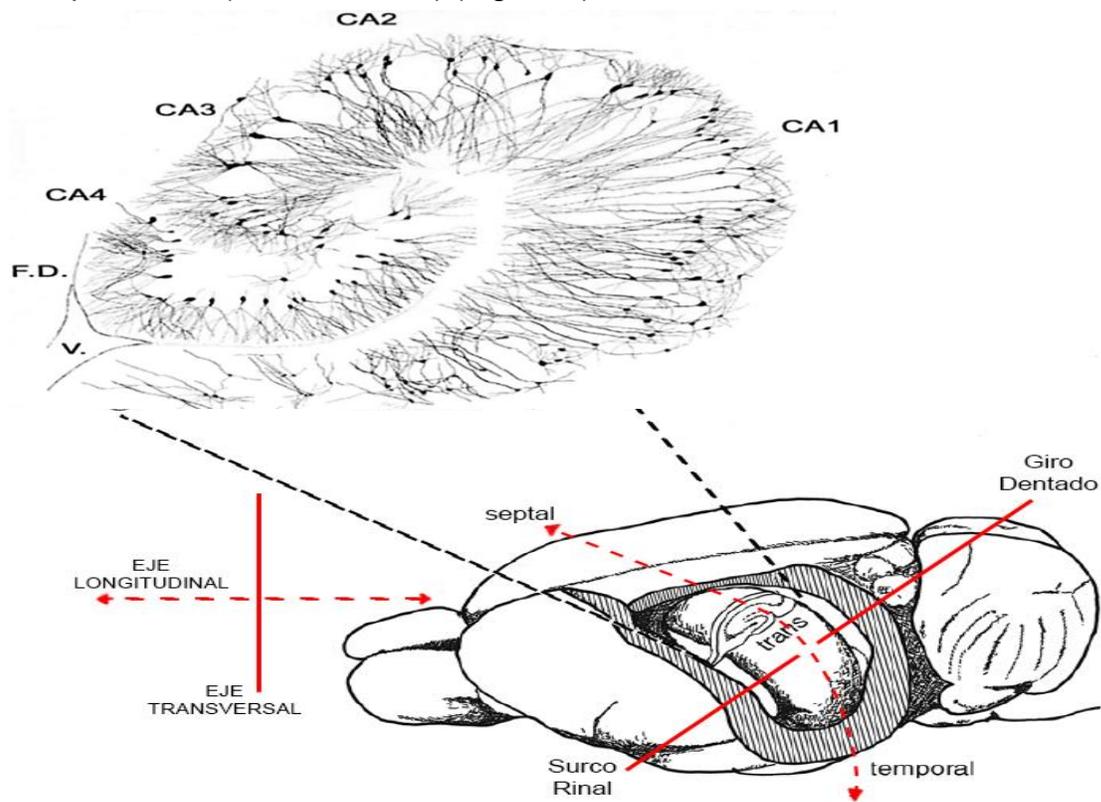


Figura 1. Ubicación de la Formación Hipocámpica donde se muestran los ejes longitudinal y transversal, así como los límites Septal, Giro dentado, Surco Rinal y Lóbulo temporal de la Formación Hipocámpica de la rata hembra (Modificado de Andersen et al , 2007 y Larriva ,2002).

A su vez, la FH tiene un conjunto de regiones relacionadas entre sí que comprenden un complejo sistema constituido por seis áreas citoarquitectónicamente distintas: 1) giro dentado (GD), 2) hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4), 3) subículo, 4) presubículo, 5) parasubículo y 6) corteza entorrinal. El criterio para incluirlas dentro de la FH es que todas estas regiones están ligadas una con la otra por una larga proyección unidireccional (Paxinos, 1995) (Figura 2A).

A

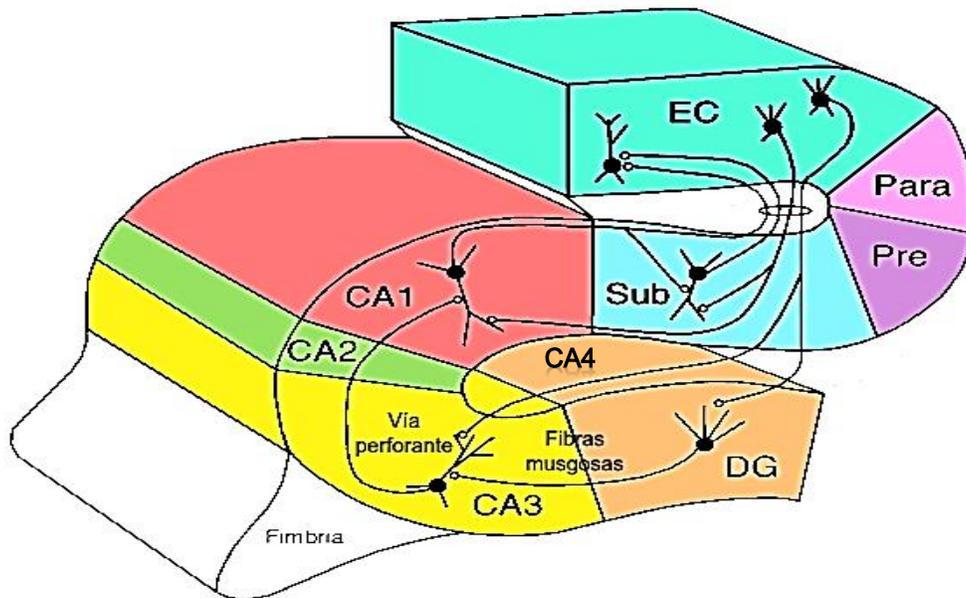


Figura 2A. Regionalización de la FH de la rata (1) Giro Dentado (GD), 2) Hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4), 3) Subículo (Sub), 4) Presubículo (Pre), 5) Parasubículo (Para) y 6) Corteza Entorrinal (EC) (Modificado de Andersen et al , 2007 y Larriva, 2002).

Las diferentes regiones contienen una capa de neuronas principales (piramidales o granulares) denominadas neuronas de proyección o Golgi tipo I y las interneuronas locales o Golgi tipo II, que son muy numerosas. La distribución celular y la organización de las interconexiones hipocámpales es laminar (estratos) y unidireccional teniendo como origen a la corteza entorrinal. En cuanto a las principales conexiones de la FH, la principal es por la vía del patrón perforante medial (PPM) cuyos axones provienen de las capas II/IV de la corteza entorrinal (CE) y hacen conexiones con el giro dentado GD y las células piramidales del área CA3, mismas que también reciben la entrada proveniente de las fibras musgosas (MF), cuyo origen son las células granulares del GD. Las células piramidales de CA3 envían axones vía las colaterales de Schaffer hacia el área CA1, la cual también recibe axones del patrón perforante lateral (PPL) mismos que provienen de la corteza entorrinal pero en este caso de la capa III. Los axones de las células de esta capa se dirigen hacia el subiculum

(Sub), el cual envía axones de regreso hacia la corteza entorrinal lateral (LEC) y medial (MEC) (Kandel et al., 2000)(Figura 2B).

B

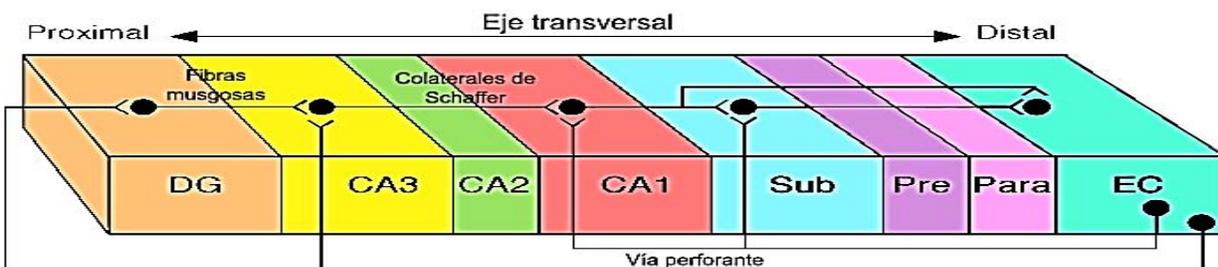


Figura 2B. Conexiones de la FH: Fibras musgosas, Colaterales de Shaffer y Vía perforante. (Modificado de Andersen et al., 2007).

Anteriormente se le llamaba hipocampo a toda la FH, ahora se conoce por hipocampo al Asta de Ammon o Cornu Ammonis (CA), subdivisión de la FH que se divide a su vez en cuatro áreas que contienen células piramidales (CA1, CA2, CA3). El Giro Dentado (GD) comprende tres capas celulares: granular, polimórficas (donde se incluye a CA4) y molecular (Larriva, 2002. Andersen et al., 2007). Una de las características principales del hipocampo es que mayormente todas sus neuronas poseen receptores excitatorios cuya afinidad es principalmente por glutamato (Krishnan, et al. 2003). Hoy en día se conocen diversos agonistas del glutamato; el AK es ampliamente usado para inducir lesión o actividad tipo epilepsia. El AK es 50 veces más potente que el glutamato mismo y su inyección intracerebral produce la destrucción selectiva de cuerpos neuronales, daños electrofisiológicos y conductuales (Lee, y Choi, 1992). Este tipo de efectos neurotóxicos se emplean a nivel experimental para inducir lesiones en los sistemas de los cuales queremos ver su función. Diversos estudios han reportado la susceptibilidad del hipocampo tras la administración en particular en las áreas CA1, CA3 y GD (Leef, et al. 1996. Lerma, J et al.1997. Leuner, et al. 2007).

El AK es un potente convulsivo estructuralmente conectado con el glutamato y posee propiedades tanto neuroexcitatorias como neurotóxicas. Cuando se administra AK directamente en el cerebro de ratas, se observa la destrucción preferente de las células piramidales del hipocampo en el área CA3. Estos datos mostraron que el AK está al menos parcialmente relacionado con la destrucción de las células piramidales de los circuitos

hipocampales (Nadler, 1980). El AK es uno de los modelos de excitotoxicidad más utilizados en animales adultos ya que provocan daño en las neuronas piramidales del hipocampo y en la región hilar. El daño depende de la dosis, la cepa y la especie del animal; pero el resultado es la muerte de las neuronas en las regiones vulnerables, la proliferación de astrocitos y el aumento de las otras células gliales (Schwob, 1980; Sperk, 1985). Uno de los primeros cambios que ocurren en el hipocampo después de la administración de AK es la inducción de ARN mensajero (ARNm) y la expresión de proteínas de choque térmico de diferentes pesos moleculares (HSP27, HSP70 y HSP72). Esta última se expresa constitutivamente en el cerebro de los mamíferos, y se sobreexpresa en las poblaciones neuronales sensibles del hipocampo (Anguelova et al., 2000). La expresión de estas proteínas parece prevenir el plegamiento anormal de proteínas de nueva síntesis en las poblaciones vulnerables al AK. Durante las dos semanas siguientes a la administración, esas proteínas se transportan por el árbol dendrítico y a lo largo de los axones hacia las zonas más distales. La HSP70 y la HSP72 tienen una función protectora, aunque no consiguen rescatar a las células de la muerte excitotóxica. La sobreexpresión de HSP27 y HSP70 *in vivo* protege del daño excitotóxico, mientras los niveles excesivamente altos de la HSP72 pueden ser nocivos para las células (Anguelova, et al. 2000; Valentim, et al. 2001; Planas, et al. 1995-1997, Yenari, et al. 1998). Luego de tres a cinco horas de la inyección de AK también se induce la síntesis de ARNm y la sobre-expresión de las proteínas cFos y cJun en las regiones vulnerables del hipocampo y en el giro dentado (Pozas, 1997). La inmunoreactividad contra cFos decrece a las seis horas en el giro dentado, pero permanece alta en el hipocampo. Ello sugiere que la muerte celular puede asociarse con los altos niveles de cFos. Además, el incremento prolongado de cFos no tiene un carácter predictivo y no es necesario para que ocurra daño neuronal excitotóxico. También se ha observado un aumento de la expresión de cJun en el hipocampo y en la circunvolución dentada. El significativo aumento de los niveles de cJun es contradictorio ya que se considera marcador de la muerte celular retardada, secundaria a crisis epilépticas, o como posible marcador de supervivencia neuronal frente a daño excitotóxico (Gass, et al.1995; Kasof, et al, 1995; Pozas, et al. 1997; Lorigados et al. 2013).

### **II.3 LACTANCIA COMO MODELO DE NEUROPROTECCIÓN ANTE DAÑO EXCITOTÓXICO**

La maternidad, incluida la lactancia, desemboca en una serie de cambios en el cerebro maternal los cuales incluyen modificaciones en la cognición, la respuesta emocional y cambios neuroendocrinos que promueven modificaciones en la conducta materna y la producción de leche que distinguen a una madre lactante de una hembra nulípara y que la preparan para los desafíos de la maternidad (Hillerer, *et. al.* 2014. Kim *et al.*, 2010). El periodo de los primeros meses postparto marca un tiempo crítico para el desarrollo de cambios estructurales en las regiones del cerebro implicadas en la motivación y conducta maternal que pueden ser importantes promotoras en la instalación de la conducta (Kim *et al.*, 2010). La motivación materna toma un papel de vital importancia en esta etapa de desarrollo pues la hembra hace del infante el objetivo de su conducta, donde ésta será dirigida a promover el bienestar de la cría. Igualmente entra en juego otro proceso denominado excitabilidad maternal, siendo éste el que a su vez determinará la conducta maternal y proviene de la habilidad de potencializar los estímulos (positivos o negativos) para activar al sistema nervioso central de la hembra (Melo, 2002). La conducta maternal consiste en la expresión de una serie de patrones motores (conductas) por parte de la madre al final de la gestación, en el momento del parto y durante la lactancia, esto con la finalidad de proveer calor, protección y nutrición a la progenie. La conducta maternal varía de acuerdo con la especie, la movilidad y el estado de maduración y desarrollo del infante al nacimiento. Por ejemplo, las madres de especies cuya progenie nace inmadura (especies altriciales) construyen un nido (roedores, lagomorfos), conducta que no ocurre en especies cuyos infantes nacen maduros (especies precoces). La conducta maternal se ha clasificado de acuerdo a su relación con el parto (antes, preparto; después, post-parto), a su orientación hacia los objetos (construcción del nido), hacia sí misma (acicalamiento) o hacia la progenie. En general la conducta maternal post-parto en los mamíferos altriciales inicia en el momento en el que el crío sale del canal vaginal. La madre lame el cuerpo y los genitales de los críos, ingiere la placenta, los acarrea con el hocico, emite vociferaciones de baja intensidad y adopta la postura de amamantamiento para alimentarlos. A partir de ese día y hasta el destete, ella los cuida y los amamanta frecuentemente (Melo, 2002).

En cuanto a los cambios neurales, durante la maternidad se da la combinación de factores hormonales, sensoriales y exteroceptivos, la experiencia maternal en el periparto activa múltiples sistemas cerebrales que regulan la expresión de la conducta maternal. En los mamíferos existen al menos dos sistemas neurales antagonistas, uno excitatorio y otro inhibitorio. El balance entre ellos determina el nivel de motivación maternal y, por ende, la expresión o no de la conducta materna (CM). En las hembras vírgenes, el sistema inhibitorio es más potente y causa la aversión y rechazo hacia los críos recién nacidos; en cambio, al final de la gestación y al parto, la balanza favorece al sistema excitatorio y el temor se transforma en atracción. Las áreas neurales involucradas en este sistema son: el área preóptica medial, el núcleo del lecho de la estría terminal y sus proyecciones eferentes hacia la corteza motora y hacia áreas del tallo cerebral. El sistema inhibitorio, por otra parte, comprende al sistema límbico; bulbos olfatorios, amígdala (parte medial y cortical), corteza cingulada, e hipocampo (Melo, 2002).

La respuesta materna se ve influida por varios cambios de tipo hormonal:

1. Cambios hormonales al final de la gestación y durante la lactancia: En la rata, la coneja y los primates, las concentraciones en plasma de estradiol (E), prolactina (PRL) y oxitocina (OXI) se encuentran bajos durante la mayor parte de la gestación y se incrementa súbitamente poco antes del parto. En contraste, los niveles de progesterona (P) son altos durante la gestación y declinan drásticamente días antes del parto. Durante la lactancia, los valores de E y P se mantienen bajos y los de OXI y PRL aumentan después de cada amamantamiento.
2. Correlación hormonal con responsividad materna: Los factores hormonales desempeñan una función esencial en el inicio de la conducta maternal. Así, la disminución en los valores plasmáticos de P y el incremento de E y PRL al final de la gestación, estimulan el inicio de la conducta maternal al incrementar la excitabilidad maternal y la atracción hacia el olor de los críos, y disminuir la aversión y el miedo hacia los estímulos novedosos que proveen los críos.

Además, estos cambios favorecen la retención de la experiencia maternal durante el parto y poco después del mismo. De hecho, se ha demostrado una correlación positiva entre los cambios hormonales y la expresión de la conducta maternal (Melo, 2002).

En cuanto al estímulo de la succión, el hecho de proporcionar leche para alimentar a sus crías es una tremenda fuga de energía en las hembras de los mamíferos. Ante esta demanda se presenta la mediación de múltiples mecanismos dependientes de hormonas tanto en el tejido periférico como en el cerebro, que conservan los nutrientes para la producción de leche y facilitan el aumento en la ingesta de alimentos. Además, el balance energético negativo asociado con la entrega de la leche en sí da lugar a cambios en las vías centrales que controlan el metabolismo que impulsan el aumento en la ingesta de alimentos. Por lo tanto, la lactancia exitosa depende de la capacidad de la madre para obtener y convertir adecuadamente alimentos suficientes para proporcionar suficiente leche y también en su respuesta ante los cambios de necesidades de la cría. En el caso de la rata hembra puede producir 75 g de leche al día para nutrir una camada de un promedio de ocho crías. Esto resulta en una gran demanda pues se asocia a la duplicación de la tasa metabólica de la madre, la cual inicia con un aumento de las reservas de grasa materna durante el embarazo y una adaptación de algunas enzimas para aumentar la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, cuando la demanda de la producción de leche se presenta después del parto, la madre está equipada con un depósito de grasa y  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales son movilizados para compensar el costo energético de la lactancia (Woodside, 2014). Bajo estos constantes cambios morfológicos y funcionales que ocurren en la hembra para hacer frente a todas estas demandas, se ha encontrado que manifiestan una notable resistencia ante el daño excitotóxico.

La excitotoxicidad se refiere a la muerte neuronal provocada por la activación sostenida de receptores de aminoácidos. El neurotransmisor excitatorio principal en el cerebro y la médula espinal es el ácido glutámico. Un trauma en el sistema nervioso central causa una elevación en los niveles locales de glutamato extracelular hasta ocho veces la concentración normal. La excitotoxicidad por glutamato mediada por los receptores de AMPA/kainato daña no sólo a las neuronas, sino a las células productoras de mielina del sistema nervioso central, los oligodendrocitos (McDonald et al., 1998). Se entiende el papel sumamente importante del

mecanismo de excitotoxicidad en la contribución a la neurodegeneración durante la isquemia, el trauma y otros desórdenes neurológicos en el SNC (Sattler et al., 2001). Se ha observado que durante el embarazo se disminuye la frecuencia de las convulsiones recurrentes espontáneas en ratas con lesiones de AK en el hipocampo, y se reduce la unión de glutamato y receptores de kainato (Berzaghi et al., 1987). Dado que se sabe que el estrés o la presencia de niveles elevados de cortisol exacerbaban una lesión con AK, al considerarse a la lactancia como un estado de hipercortisolemia parecería que el cerebro materno sería más vulnerable al daño excitotóxico. Sin embargo, esto no es así pues los niveles de hormonas ováricas que fluctúan durante el embarazo y la lactancia como estrógenos y progesterona pueden tener acciones protectoras. También, los niveles de prolactina se incrementan preparando a la madre para la lactancia. Recientemente se ha reportado que la lactancia protege las regiones CA1, CA3 y el hilus del giro dentado del hipocampo dorsal de la rata ante el daño causado por administración sistémica de AK (Vanoye-Carlo et al., 2008), en comparación con ratas vírgenes. La mayoría de las áreas del hipocampo dorsal se ven afectadas por la administración de kainato en ratas durante el periodo diestro en específico en CA1 y giro dentado y en menor grado en CA3, mientras que en las ratas lactantes sólo se observaron alteraciones de menor grado en la región CA3 y sólo con una dosis alta de AK. Dado que se reduce la afinidad de receptores glutamatérgicos tipo kainato durante el embarazo y la lactancia, esto explicaría la menor sensibilidad ante el AK durante este periodo. Sin embargo, el efecto neuroprotector de la lactancia se deriva del papel que juegan las hormonas esteroideas como la P y los estrógenos, proteicas como PRL y OXI (Morales, 2011). Además, se desconoce el papel que la succión tiene en este proceso de protección, esto es, si el establecimiento de la lactancia es crucial para que se presente la neuroprotección en el hipocampo.

### **III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Durante la lactancia se originan cambios o adaptaciones en la hembra, tanto fisiológicos como emocionales y conductuales, los cuales favorecen a que la madre se adapte rápidamente a la demanda de cuidados y alimento de las crías. Por ello, la hembra tiene que redirigir sus recursos para satisfacer esta demanda así como sus propias necesidades.

Previamente se ha referido la presencia de neuroprotección ante un daño excitotóxico producido por AK durante la lactancia en ratas hembras madres, con respecto a ratas vírgenes. Por lo cual se planteó la siguiente problemática: ¿Existe un mayor efecto neuroprotector al inicio de la lactancia? ¿Es crucial el establecimiento de la lactancia para que se presente la neuroprotección ante el AK? y ¿De qué manera el efecto protector de la lactancia se regula por la succión y otros estímulos provenientes de las crías?

### **IV JUSTIFICACIÓN**

La experiencia reproductiva ocasiona diversas adaptaciones morfológicas, cognitivas, funcionales y conductuales en el cerebro de la madre. Esta serie de mecanismos necesarios que permiten satisfacer la demanda de la reproducción, preservar a la camada, inducir la expresión de la conducta maternal y la producción de leche representan un modelo natural para el estudio de los procesos de plasticidad neuronal. En los últimos años, se ha documentado acerca de la existencia de un efecto neuroprotector ante la neurodegeneración mediada por la neurotoxicidad del AK en las áreas CA1, CA3 y CA4 en el hipocampo de la rata hembra, por lo cual se buscó investigar con mayor detalle si este efecto neuroprotector se presenta desde los primeros días de la lactancia y si depende del estímulo de succión.

### **V HIPÓTESIS DE TRABAJO**

1. El establecimiento de la lactancia favorecerá la neuroprotección en el hipocampo de la rata madre.
2. El daño inducido por AK será mayor en ratas separadas de sus crías al inicio de la lactancia.

## **VI OBJETIVOS**

### **VI.1 OBJETIVOS GENERALES**

1. Determinar si existe neuroprotección ante la lesión producida por AK en el hipocampo de la rata hembra en lactancia desde su fase inicial (4 días postparto).
2. Determinar si el amamantamiento tiene influencia en la prevención de la neurotoxicidad provocada por el AK.

### **VI.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar los cambios en la morfología y densidad celular en las regiones CA1, CA3 y CA4 del hipocampo de la rata hembra.
2. Evaluar si durante los primeros días de la lactancia existe un efecto neuroprotector ante la neurodegeneración producida por el AK en el hipocampo de las madres.
3. Evaluar si los cambios en la densidad celular se relacionan con mayor neurodegeneración.

## **VII MATERIAL Y MÉTODOS**

### **VII.1 DISEÑO DE ESTUDIO**

Animales: Ratas lactantes en la fase inicial de la lactancia y ratas vírgenes distribuidas en tres grupos experimentales y tres grupos control, con sus respectivos procedimientos (N=6):

1. Ratas Lactantes con crías, a las cuales se les aplica una inyección intraperitoneal de AK al cuarto día post parto.
2. Ratas Lactantes con crías, a las cuales se les aplica una inyección intraperitoneal de solución salina al cuarto día post parto para fungir como grupo control.
3. Ratas Lactantes sin crías, a las cuales se les aplica una inyección intraperitoneal de AK al cuarto día post parto.
4. Ratas Lactantes sin crías, a las cuales se les aplica una inyección intraperitoneal de Solución salina al cuarto día post parto para fungir como grupo control.
5. Ratas vírgenes con administración de AK.
6. Ratas vírgenes con administración de Solución salina.

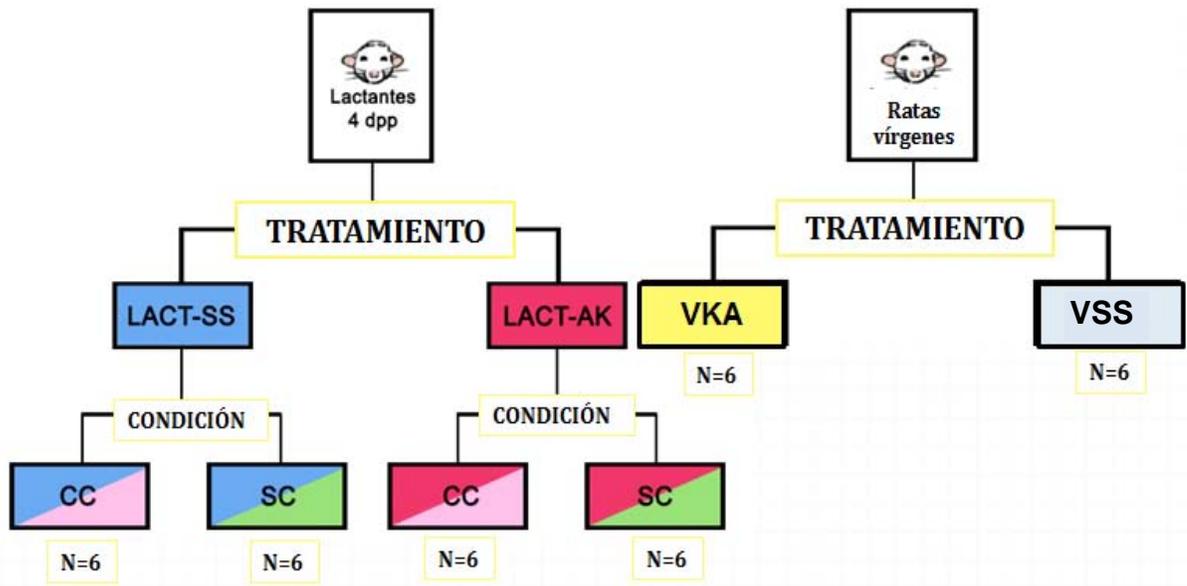


Figura 3. Distribución de las seis condiciones experimentales para los grupos lactantes y vírgenes

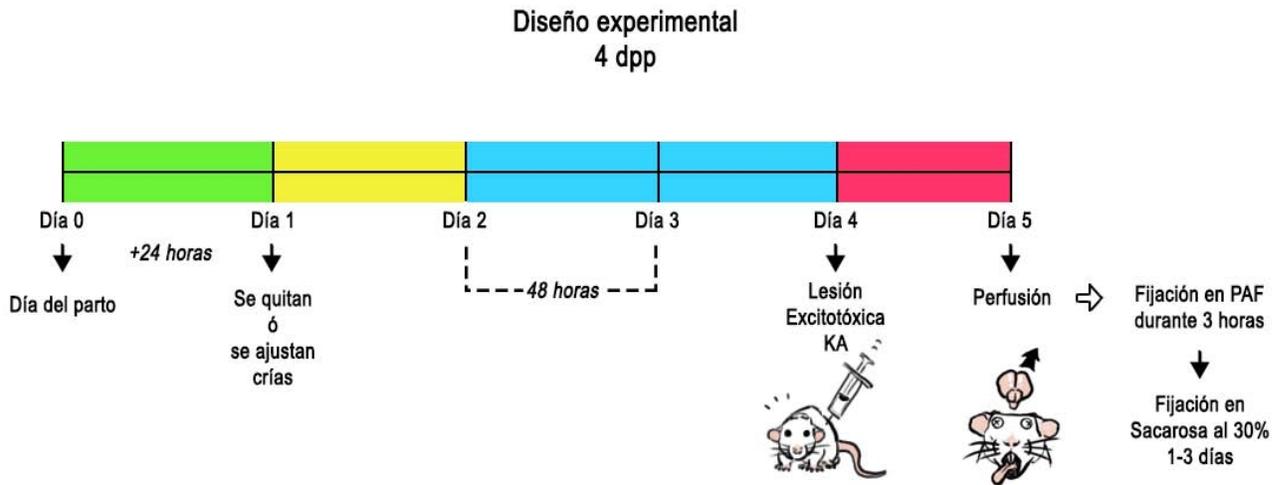


Figura 4. Diseño experimental: Esquema de aplicación de daño excitotóxico así como duración del experimento y día de perfusión

## VII.2 UNIVERSO DE ESTUDIO

Se utilizó un total de 24 ratas hembras lactantes y 12 ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar con un peso aproximado entre 200-250 g, proporcionadas por el bioterio del instituto de Neurobiología, UNAM. Las ratas fueron mantenidas bajo ciclo L:O (12:12), encendido de luces a las 6:00 AM, temperatura ambiente controlada (24±2 °C), extractor de aire las 24 horas y acceso a agua y alimento *ad-libitum* (Rat Chow, Purina). Durante todo el experimento, las ratas fueron alojadas en cajas de acrílico transparente de 47 cm x 25.5 cm x

20 cm (altura). Todo el manejo de los animales y el trabajo experimental fue realizado bajo las estrictas normas aprobadas por el Comité de Bioética del INB, UNAM y regido por las normas internacionales para el manejo y uso de animales de laboratorio de la National Academy of Science, 2003. Se cuenta con la aprobación del protocolo experimental por el Comité de Bioética del INB.

### **VII.3 VARIABLES**

Tratamientos:

1. A los sujetos de los tres grupos experimentales se les administró una inyección intraperitoneal de AK (7.5 mg/kg pc) al cuarto día post parto.
2. A los sujetos de los tres grupos control se les administró una inyección intraperitoneal de solución salina al cuarto día post parto.

Condiciones:

1. Ratas Lactantes con crías
2. Ratas Lactantes sin crías
3. Ratas vírgenes

### **VII.4 TÉCNICAS**

#### **VII.4.1 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE TEJIDO**

Todos los grupos con sus respectivas condiciones y tratamientos pasaron por los siguientes procedimientos para obtener las muestras histológicas necesarias.

##### **VII.4.1.1 PERFUSIÓN**

Después de 24 h de la administración de AK o de solución salina, los animales fueron anestesiados con una dosis letal de uretano y fueron perfundidos. La perfusión se realiza vía intracardiaca, con 250 ml de solución salina isotónica (0.9%) seguido de 250 ml de PBS (buffer fosfato, Sigma) con PAF (paraformaldehído, Sigma) al 4%. Posteriormente se extrajeron los cerebros y se procedió a fijarlos en PAF 4% alrededor de un lapso de 3 h. Para su crioprotección, se suspendió el cerebro en PBS con un gradiente de sacarosa al 30% a lo largo de 2 a 3 días, manteniendo el tejido siempre en refrigeración a 4 °C.

### VII.4.1.2 OBTENCIÓN DE CORTES

Se realizaron cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$  de espesor del hipocampo dorsal. Se colectaron 5 series de tejido en una caja estéril de cultivo (Costar; 5x5 pozos) a modo de tener una serie representativa del hipocampo dorsal en cada hilera de la caja. Los cortes fueron almacenados en una solución crioprotectora (600 ml de etilenglicol, Fisher Scientific; 300 g de sacarosa, Sigma; 500 ml de PBS, y 500 ml de H<sub>2</sub>O desionizada). Los cortes de tejido se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de su utilización para las técnicas de histología (Figura 5).

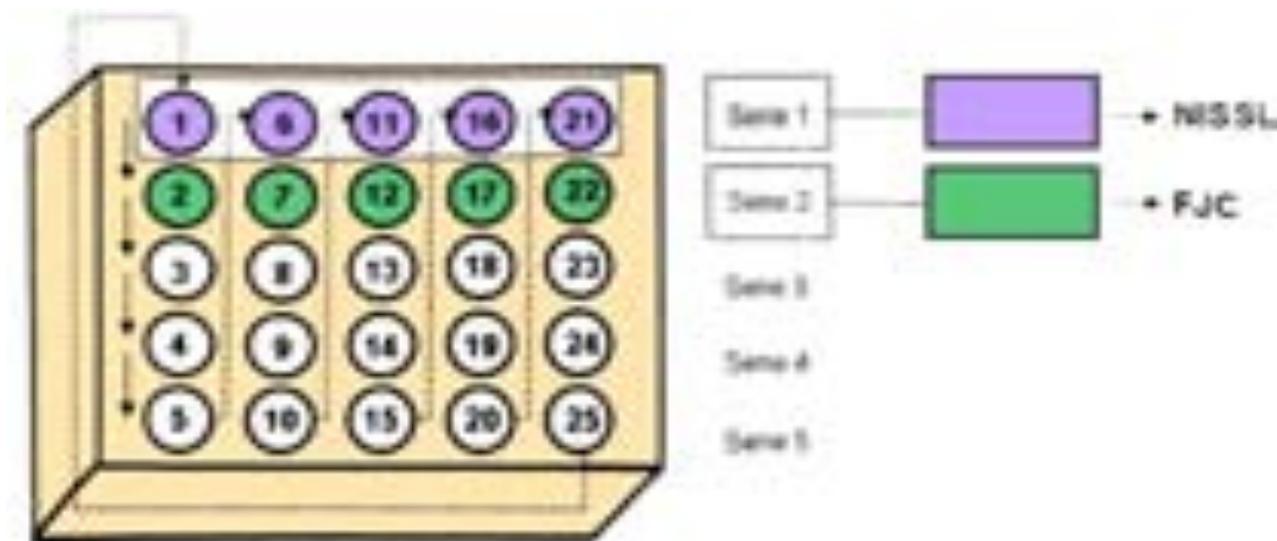


Figura 5. Obtención y almacenamiento del tejido. Orden de colocación de los cortes del hipocampo dorsal en caja de cultivo, luego de colectar los cortes se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento para los diferentes protocolos experimentales: Tinción de Nissl (NISSL) y Floro Jade C (FJC) .

### VII.4.2 PROTOCOLOS DE HISTOLOGÍA

Se empleó la tinción de NISSL ya que el colorante empleado en este método se une a las proteínas de los ribosomas y de esta manera permite la tinción de las células. Esta tinción permite visualizar si las células presentan edema lo que es característico de la lesión con AK, o si hay pérdida celular en las diferentes áreas del hipocampo.

También se empleó el marcaje por Fluoro-Jade C ya que es un colorante derivado de la fluoresceína y permite identificar células en degeneración en tejido nervioso independientemente de que la vía de muerte sea apoptosis o necrosis.

#### **VII.4.2.1 TINCIÓN DE NISSL**

El protocolo consistió en el siguiente tren de tinción: 1) Lavado con PBS. 2) Montaje sobre portaobjetos, 3) Secado a temperatura ambiente, 4) Lavado con H<sub>2</sub>O, 5) Deshidratación paulatina en gradientes de concentración creciente de etanol (50%, 70%, 95%, 100%), 6) Aclarado con xileno, 7) Rehidratación paulatina del tejido en gradiente de concentración decreciente de etanol (100%, 95%, 70% y 50%), 8) Lavado con H<sub>2</sub>O, 9) Teñido en una solución de Violeta de cresilo (tionina) (0.25%) durante 10 minutos en agitador en una velocidad de 90 rpm, 10) Enjuague con H<sub>2</sub>O durante un minuto, 11) Lavado con H<sub>2</sub>O durante 3 minutos, 12) Deshidratación paulatina en gradientes de concentración creciente de etanol (50%, 70%, 95%, 100%), 13) Aclarado con xileno durante 5 minutos, 14) Segundo aclarado en Xileno durante 5 minutos, 15) Aplicación de cubierta de la muestra con resina.

#### **VII.4.2.2 MARCADOR DE MUERTE CELULAR FLUORO JADE C**

De las rebanadas previamente colectadas se usaron las pertenecientes a la 2ª serie de cada sujeto y se seleccionaron sólo las rebanadas con referencia al hipocampo. El protocolo consistió en someter al tejido a los siguientes pasos:

Se realizaron tres lavados en KPBS durante 10 minutos, cada uno para eliminar cualquier exceso de anticongelante. Una vez lavados se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejó secar por un periodo de 7-10 días para dar paso al tren de soluciones el cual consistió en: 1) Deshidratar en NaOH durante 5 minutos, 2) Deshidratar en EtOH al 70% durante 2 minutos, 3) Enjuagar con DH<sub>2</sub>O en 30 segundos, 4) Bloquear con KMn<sub>4</sub> durante 10 minutos en agitación, 5) Enjuagar en DH<sub>2</sub>O durante 2 minutos, 6) Teñir en la solución de trabajo durante 20 minutos en agitación teniendo el recipiente bien tapado (FluoroJade C a una concentración de 0.1 g), 7) Lavar 3 veces en DH<sub>2</sub>O durante 5 minutos por cada lavado, 8) Secar en la parrilla durante un periodo de 1 hora cubriendo con aluminio, 9) Deshidratar en xileno durante 1 minuto, 10) Aplicación de cubierta de la muestra con resina

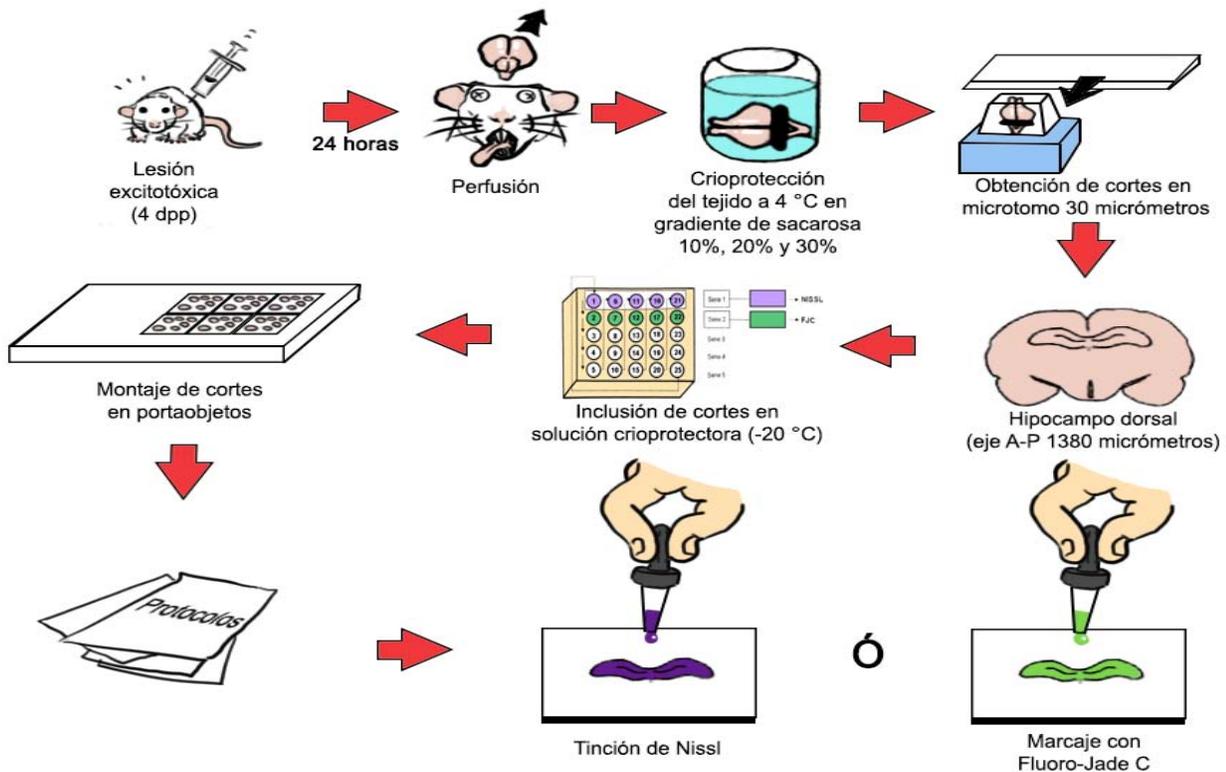


Figura 6. Procesamiento del tejido. Sucesión de pasos a los que se sometió el tejido a partir de la introducción de la lesión excitotóxica hasta la aplicación de la técnica histología de Nissl y la marcación para degeneración de Fluoro Jade C para obtener la cuantificación de células y el conteo de píxeles.

## VIII DISEÑO ESTADÍSTICO

Se empleó el programa estadístico *Graph Pad PRISM* procediendo a aplicar la prueba estadística ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparación múltiple Bonferroni, para cada una de las condiciones experimentales (LACT-SS/SC, LACT-AK/SC, LACT-SS/CC, LACT-AK/CC, VIRG-AK, VIRG-SS). Los resultados graficados representan el promedio  $\pm$  error estándar, tomando en consideración una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.

## VIII.1 OBTENCIÓN DE DATOS

### VIII.2 CUANTIFICACIÓN CELULAR

Se obtuvieron imágenes en microscopio de campo claro de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4 (Larriva, 2002) del tejido sometido a Tinción de Nissl (Figura 7, I). Se digitalizaron las imágenes y se analizaron con el programa *Image-J* para contabilizar el número de células teñidas. Por cada área hipocampal se estableció una región representativa (región de interés= ROI) en donde se cuantificó el número de células teñidas (Figura 7, II). Por cada sujeto se sacaron entre 8 y 10 imágenes, mismas que corresponden a un corte coronal cada una. Esto con el objetivo principal de determinar si el establecimiento de la lactancia favorecerá la existencia de neuroprotección en el hipocampo de la rata hembra en el estadio temprano de la lactancia.

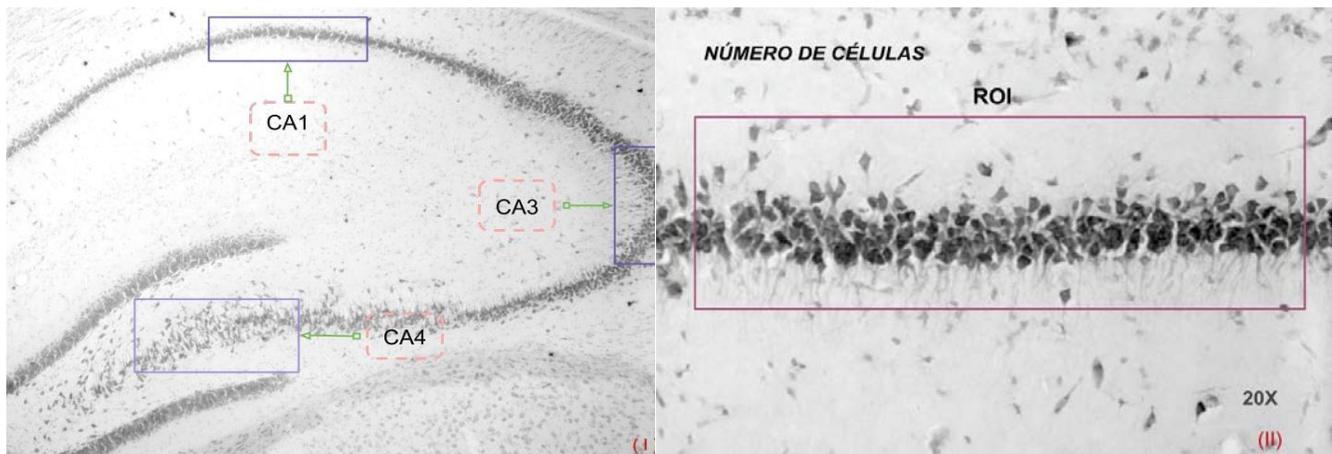


Figura 7. **Áreas hipocampales estudiadas.** (I) Corte coronal del hipocampo dorsal de 30  $\mu\text{m}$  que muestra las tres regiones de interés estudiadas. (II) Ampliación a Campo Claro de una de las tres áreas analizadas, en la cual se observa la dimensión de la región de interés (ROI), en donde se cuantificó el número de células. Todas las imágenes fueron procesadas mediante el software *Image-J*.

### VIII.3 CONTEO DE PÍXELES

En el caso del Fluoro-Jade C, se obtuvieron imágenes en microscopio de fluorescencia de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4. Se digitalizaron las imágenes y se analizaron con el programa *Image-J* para contabilizar en la tinción fluorescente obtenida para este protocolo se obtuvo el número de píxeles por ROI de cada una de las áreas de interés (Figura 8)

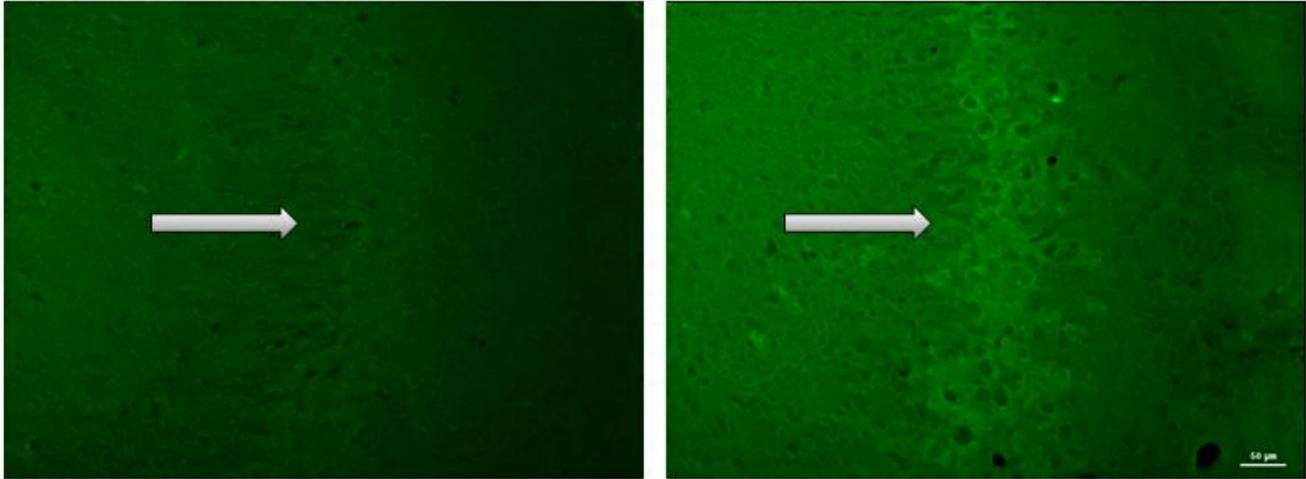


Figura 8. **Ejemplificación de áreas analizadas.** Corte coronal del hipocampo dorsal, fotografía tomada con un objetivo de 20x en la cual se observa el marcaje por Fluoro Jade C (Izq- SS, Der-AK). Todas las imágenes fueron procesadas mediante el software *Image-J*. *La flecha blanca en la imagen de la derecha señala las células teñidas, lo cual representa degeneración neuronal, contrastando con la no tinción de células en la imagen de la izquierda.*

#### **VIII.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos colectados fueron procesados por animal y por grupo experimental. Se utilizó el programa estadístico *Graph Pad PRISM* y se aplicó la prueba estadística ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparación múltiple Bonferroni, para cada una de las condiciones experimentales (LACT-SS/SC, LACT-AK/SC, LACT-SS/CC, LACT-AK/CC, VIRG-AK, VIRG-SS). Las gráficas representan el promedio  $\pm$  error estándar, una  $p < 0.05$  se considera estadísticamente significativa.

## IX. RESULTADOS

### ***IX.1 DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA CELULAR POR TINCIÓN DE NISSL***

El conteo realizado sobre las imágenes obtenidas con la técnica histológica de Nissl reveló que la administración sistémica de AK indujo una clara degeneración en el hipocampo de ratas vírgenes. Este efecto no fue observado en ratas postparto con crías o sin crías (Figura 9), mientras que la comparación del grupo LACT-AK-CC con LACT-AK-SC mostró una diferencia significativa ( $P = 0.04$ ), siendo ésta la única destacable y correspondiente al área CA1 en los grupos con condición lactante. En cuanto a la comparación de los grupos de condición lactante (LACT-SS-CC, LACT-SS-SC, LACT-AK-CC, LACT-AK-SC) con las hembras vírgenes (VKA, VSS), se encontró una presencia mayor del número total de células piramidales en los cuatro grupos de ratas lactantes. También se puede observar que la pérdida de número celular por administración de AK resultó ser mínima en las lactantes, sin significancia estadística entre los grupos LACT-SS-CC con respecto a LACT-AK-CC, y LACT-SS-SC con respecto a LACT-AK-SC (Figura 9).

Por otro lado, se pueden observar diferencias morfológicas en las células piramidales de las áreas CA1, CA3 y CA4 de las ratas hembras lactantes frente a las ratas vírgenes, tanto en aquellas con administración de AK como las administradas con solución salina (Figura 9-12). Estas diferencias nos indican que durante la lactancia temprana, el cerebro materno se encuentra blindado por un efecto de protección neuronal y que en este caso se encuentra ejerciendo su efecto neuroprotector en el hipocampo dorsal, amortiguando el daño excitotóxico de manera independiente de la succión y del establecimiento de la lactancia. (Figuras 10, 11, 12).

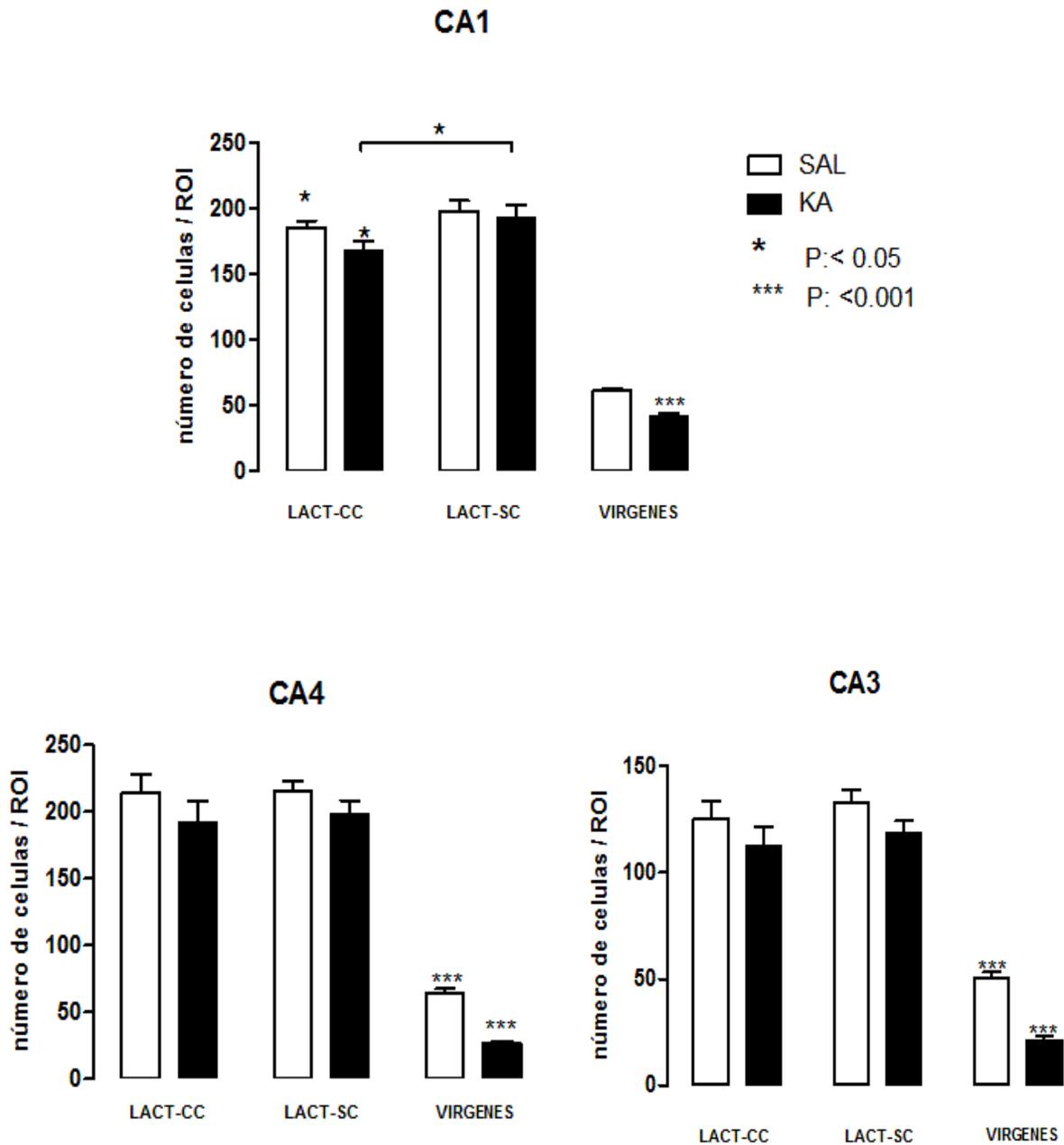


Figura 9. Tinción de Nissl. Cuantificación del número de células por región de interés (ROI) en las áreas hipocámpales CA1, CA3 y CA4 de los tres grupos experimentales y tres grupos control con su respectivo tratamiento (LACT-CC-AK, LACT-CC-SAL, LACT-SC-AK, LACT-SC-SAL, VIRG-AK, VIRG-SAL), en todos los grupos (Lactantes y Vírgenes, N=6). Nivel de significancia: \* P<0.05 y \*\*\* P<0.001.

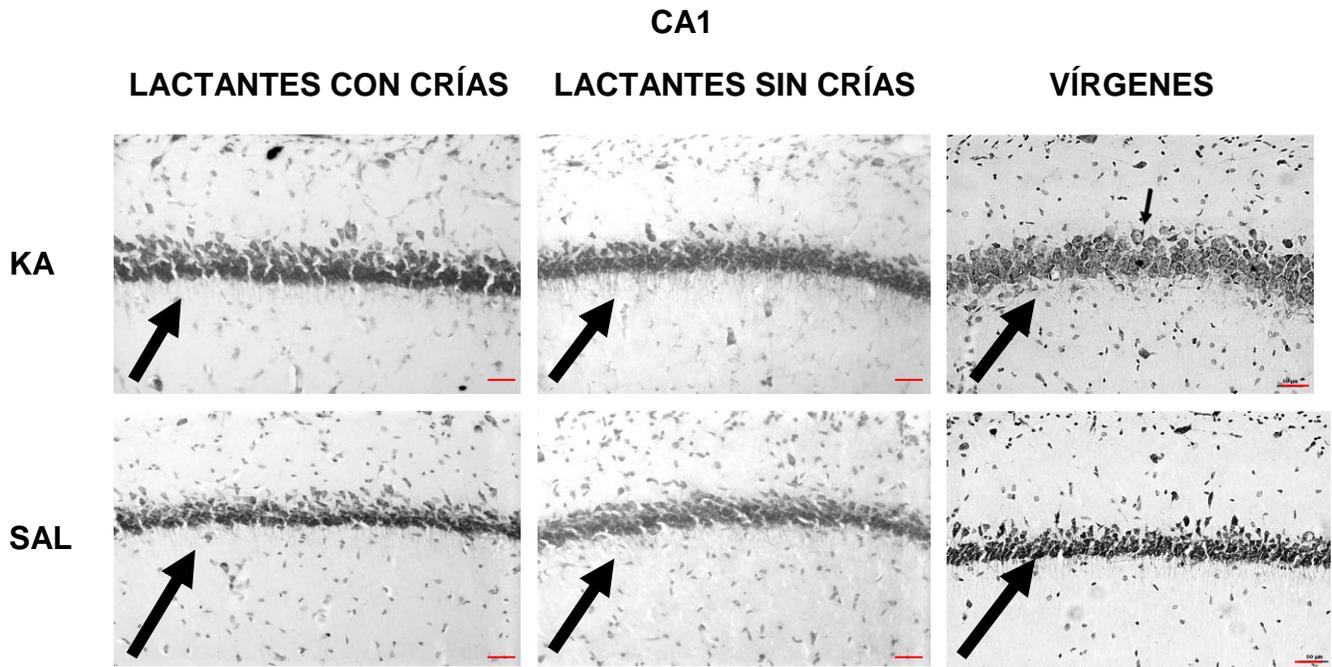


Figura 10 Tinción de Nissl de los grupos Lactantes y Vírgenes con su respectivo tratamiento (AK, SAL). Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro del área hipocampales CA1, que muestra la histología gruesa de las condiciones experimentales y sus controles. Amplificación: 20X. Barra de escala = 50  $\mu$ m. La flecha señalan el cambio morfológico en las células piramidales de las ratas vírgenes contrastando con las de las ratas lactantes, así como el cambio observado entre aquellas tratadas con AK ante las salinas

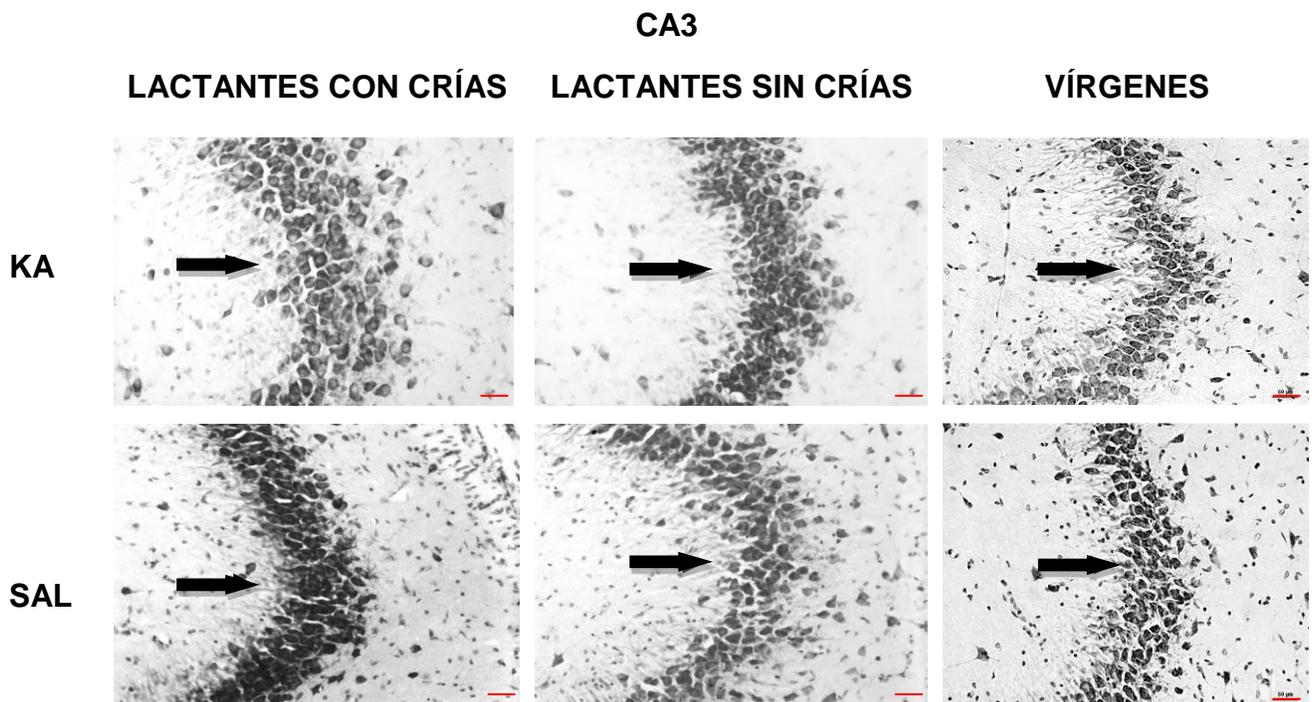


Figura 11 Tinción de Nissl de los grupos "Lactantes" y "Vírgenes" con su respectivo tratamiento (AK, SAL). Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro del área hipocampales CA3, que muestra la histología gruesa de las condiciones experimentales y sus controles. Amplificación: 20X. Barra de escala = 50  $\mu$ m. La flecha señalan el cambio morfológico en las células piramidales de las ratas vírgenes contrastando con las de las ratas lactantes, así como el cambio observado entre aquellas tratadas con AK ante las salinas

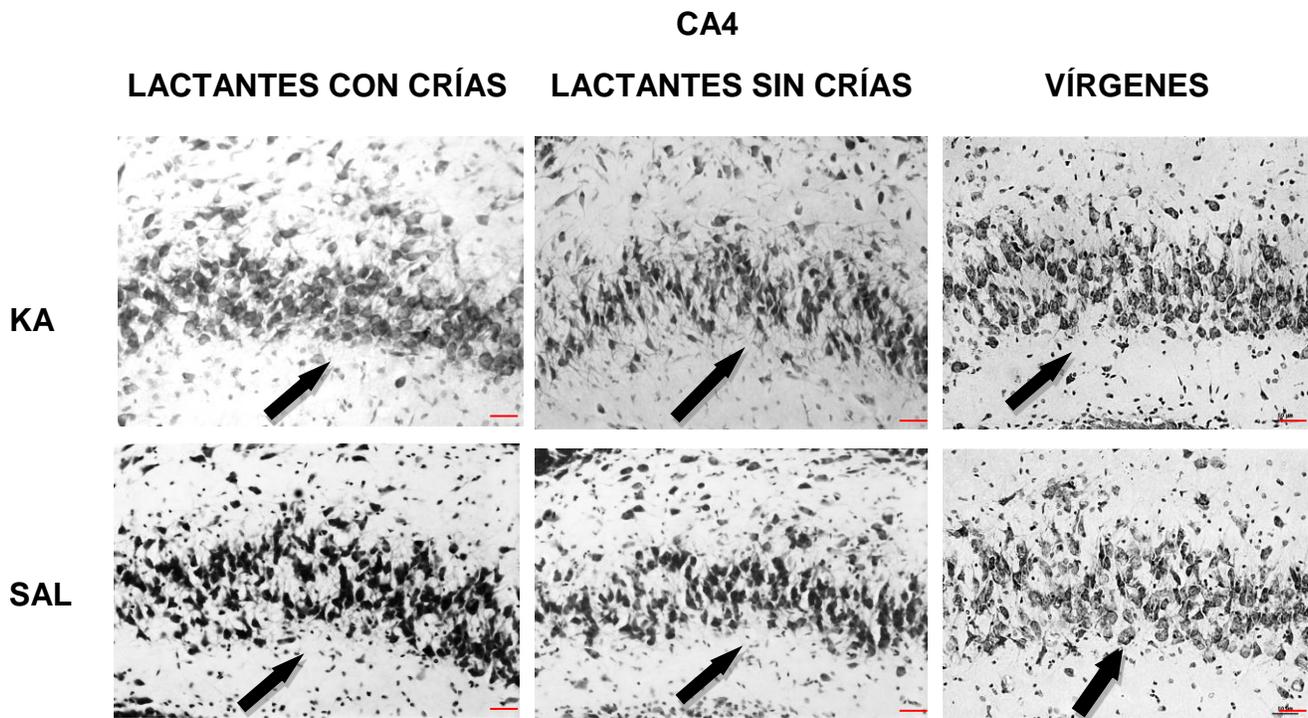


Figura 12. Tinción de Nissl de los grupos Lactantes y Vírgenes con su respectivo tratamiento (AK, SAL). Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro del área hipocampales CA4, que muestra la histología gruesa de las condiciones experimentales y sus controles. Amplificación: 20X. Barra de escala = 50  $\mu$ m. La flecha señala el cambio morfológico en las células piramidales de las ratas vírgenes contrastando con las de las ratas lactantes, así como el cambio observado entre aquellas tratadas con AK ante las salinas

## ***IX.2 MARCAJE DE NEURODEGENERACIÓN CON FLUORO JADE C***

Los resultados de esta técnica histológica mostraron concordancia respecto a los datos obtenidos por Nissl, aunque la administración de AK fue efectiva al inducir neurodegeneración en el hipocampo dorsal en los tres grupos experimentales: LACT-AK-CC, LACT-AK-SC, VAK (Figura 13). Se observó mayor sobrevivencia celular en los grupos de condición lactante en las tres áreas del hipocampo analizadas en: LACT-SS-CC, LACT-SS-SC, LACT-AK-CC, LACT-AK-SC, con respecto a los grupos de ratas hembras vírgenes (VAK, VSS) (Figuras 14, 15, 16). Esto muestra que el efecto de prevención de daño degenerativo en el hipocampo dorsal de la rata hembra es más evidente desde el inicio de la lactancia. Tomando en cuenta las diferencias entre los grupos experimentales (LACT-AK-CC, LACT-AK-SC), los resultados sugieren que no se requiere el establecimiento de la lactancia para la manifestación del efecto neuroprotector de la condición lactante, lo que también sugiere que este efecto de resistencia ante la lesión está presente desde el embarazo.

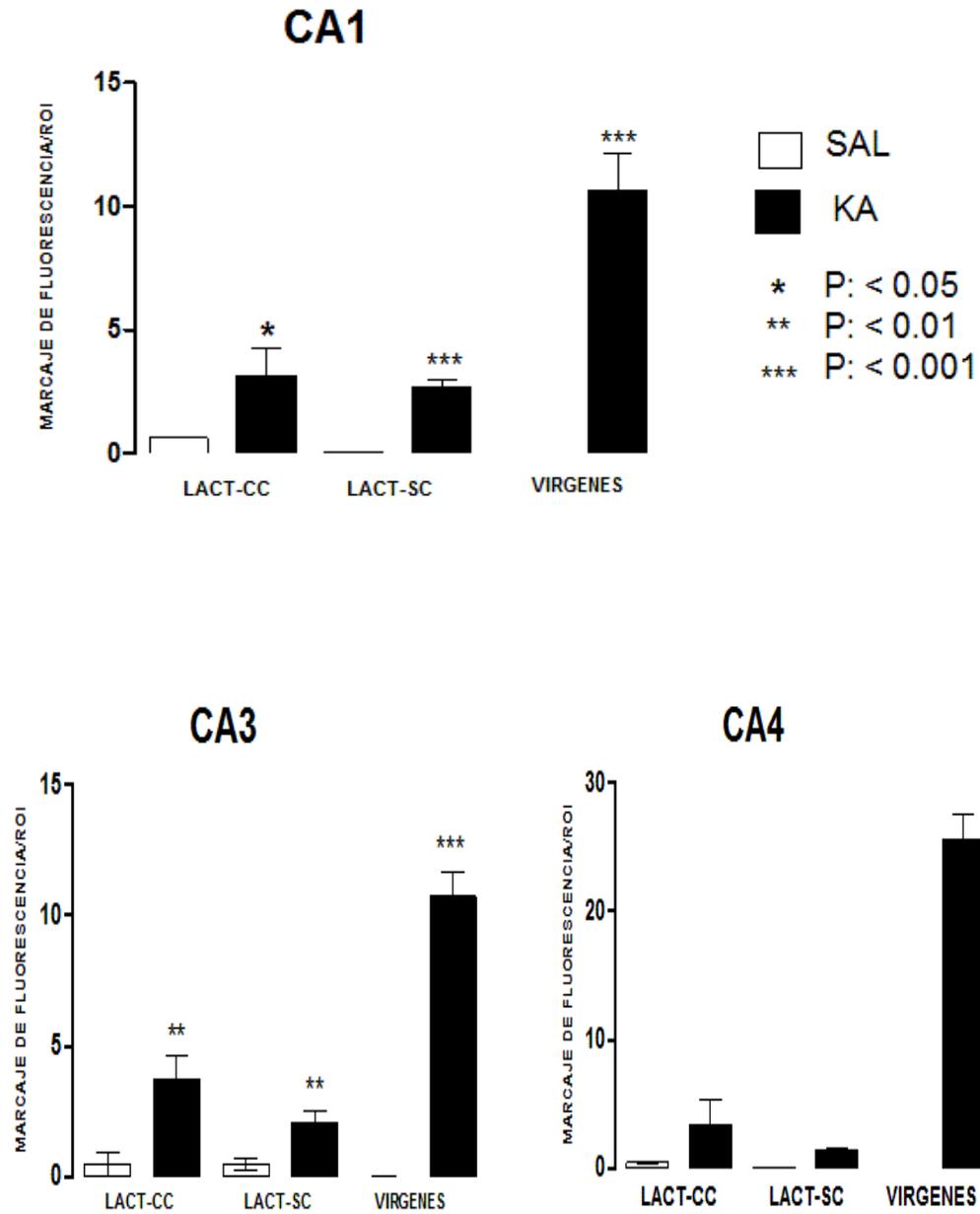


Figura 13. Marcaje con Fluoro-Jade C. Cuantificación del número de pixeles por región de interés (ROI) en las áreas hipocámpales CA1, CA3 y CA4 de los tres grupos experimentales y tres grupos control con su respectivo tratamiento (LACT-CC-AK, LACT-CC-SAL, LACT-SC-AK, LACT-SC-SAL, VIRG-AK, VIRG-SAL), en todos los grupos (Lactantes y Vírgenes). Nivel de significancia: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$ .

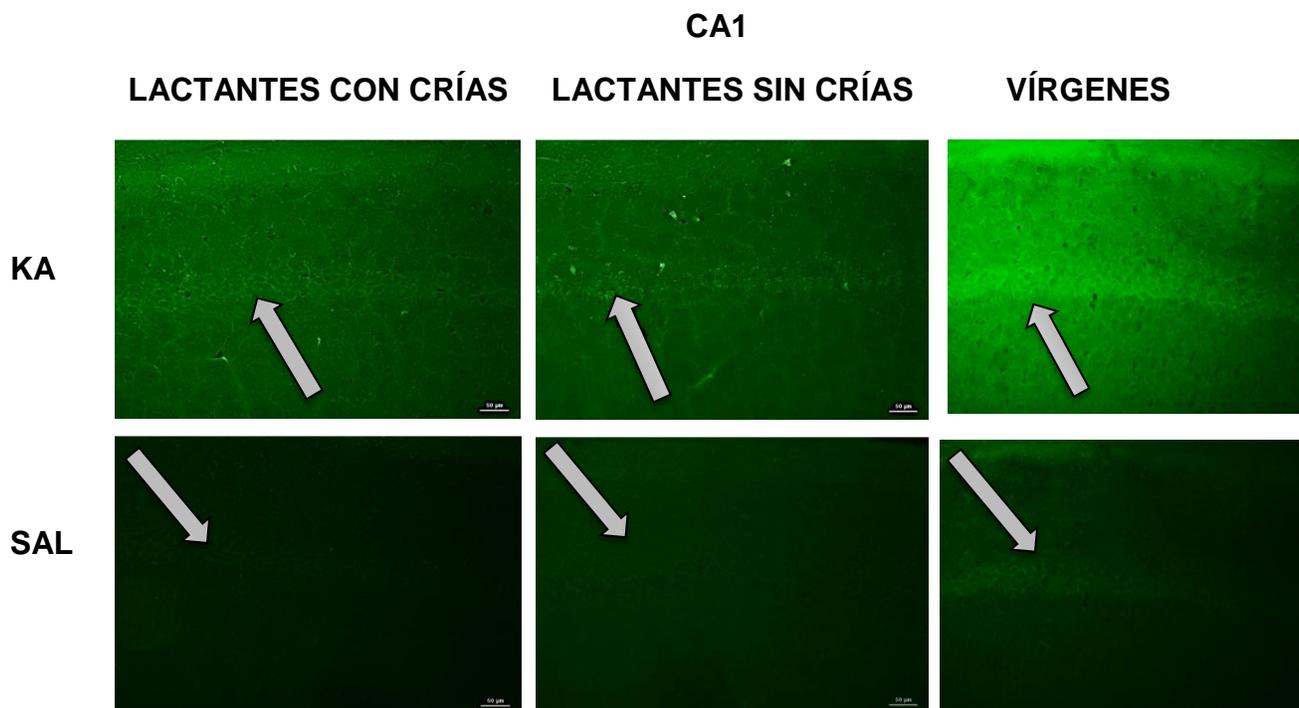


Figura 14. Marcaje con Fluoro-Jade C de los grupos "Lactantes" y "Vírgenes" con su respectivo tratamiento (AK, SAL). Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro del área hipocampales CA1, que muestra células en proceso degenerativo de las condiciones experimentales y sus controles. Amplificación: 20X. Barra de escala = 50  $\mu$ m

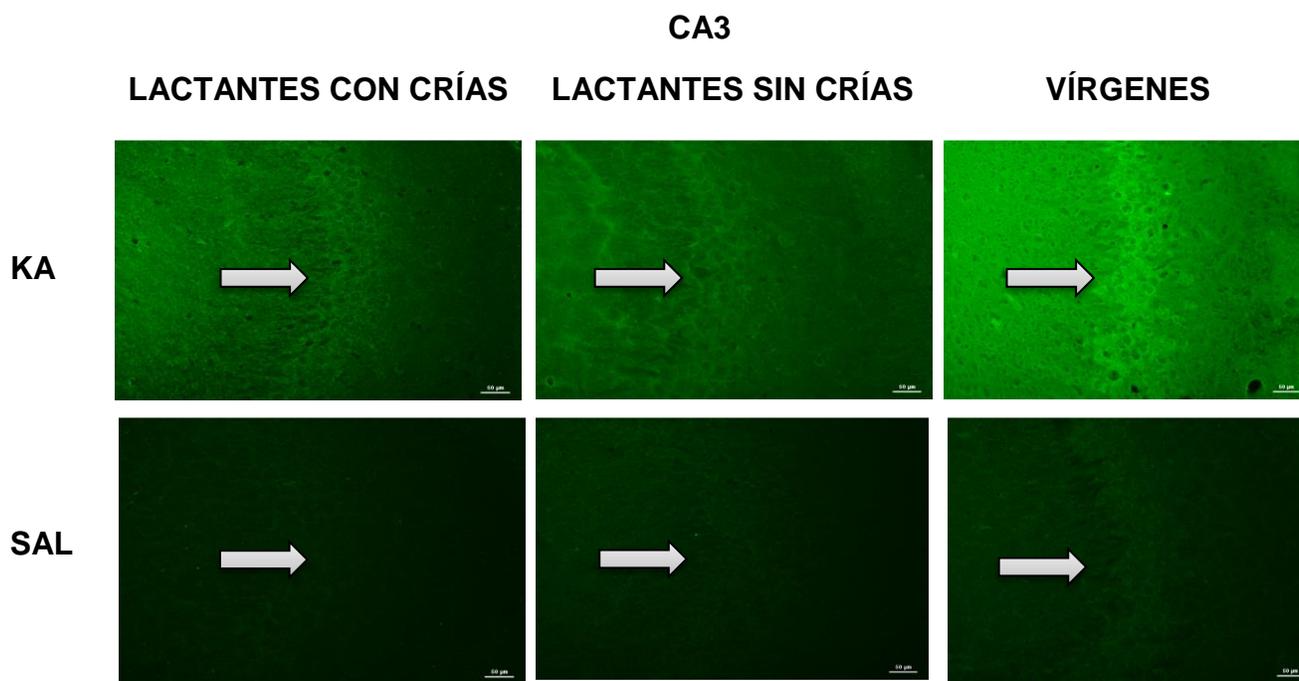


Figura 15. Marcaje con Fluoro-Jade C de los grupos "Lactantes" y "Vírgenes" con su respectivo tratamiento (AK, SAL). Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro del área hipocampales CA3, que muestra células en proceso degenerativo de las condiciones experimentales y sus controles. 20x. Barra de escala = 50  $\mu$ m

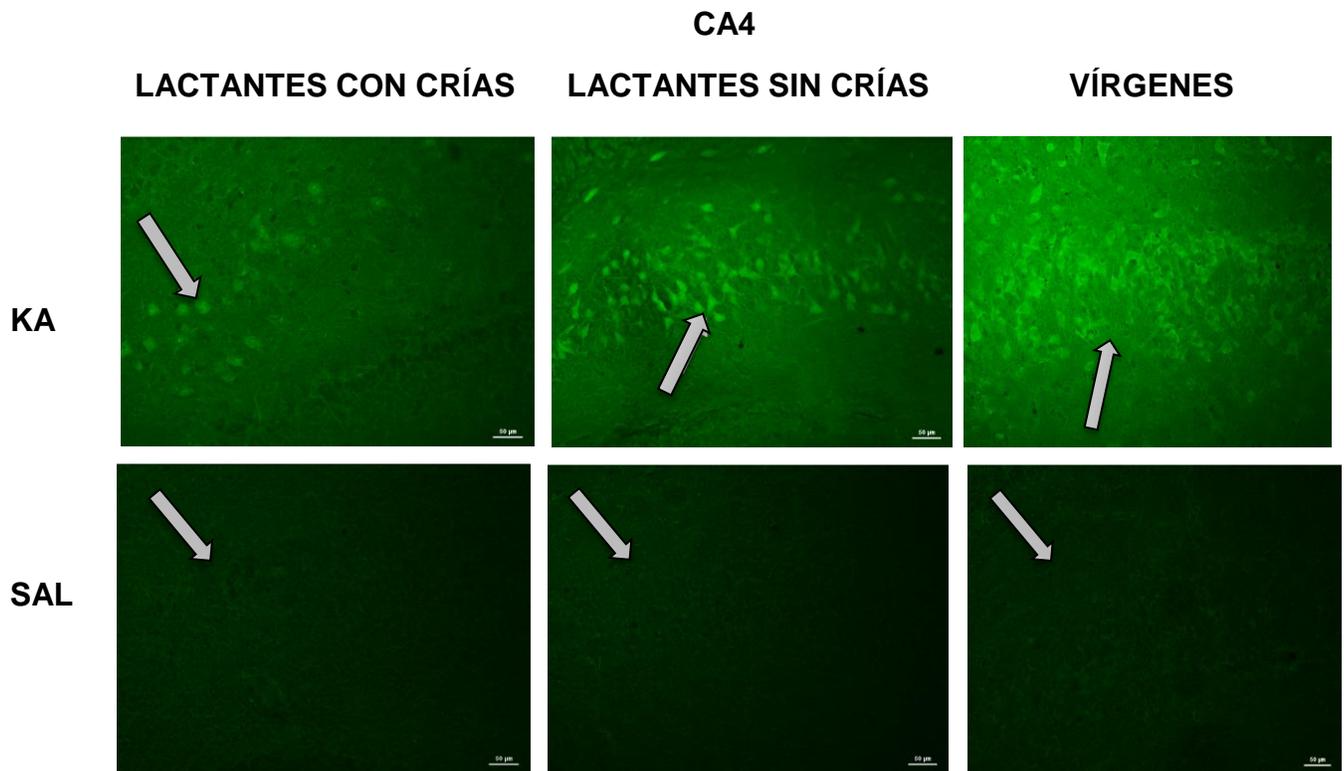


Figura 16. Marcaje con Fluoro-Jade C de los grupos Lactantes y Vírgenes con su respectivo tratamiento (AK, SAL). Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro del área hipocampales CA3, que muestra células en proceso degenerativo de las condiciones experimentales y sus controles. Amplificación: 20x. Barra de escala = 50  $\mu$ m

## X. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó el papel neuroprotector de la lactancia en madres expuestas a agentes neurotóxicos al inicio de la lactancia y se observó que el establecimiento de la lactancia no es necesario para la protección neuronal natural en el hipocampo dorsal por excitotoxicidad mediada por la administración de AK. Durante la lactancia se producen una serie de cambios o adaptaciones en el cerebro de la madre que favorecen su adaptación para poder hacer frente a la demanda que la maternidad representa. Esta adaptación se encuentra mediada por cambios morfológicos y funcionales que indican la plasticidad cerebral de la madre. Se ha observado la presencia de un efecto neuroprotector durante el periodo de lactancia el cual disminuye la sensibilidad en el hipocampo dorsal de la rata hembra a la acción dañina de AK, en comparación con las ratas vírgenes. En el presente trabajo, se amplió el análisis sobre los efectos protectores observados durante la lactancia de la rata, sobre todo, acerca de la protección conferida a la madre en los inicios de la lactancia. Este aspecto es interesante ya que no se conoce si este efecto se presenta desde el embarazo y si es importante el establecimiento de la lactancia. El esquema experimental se eligió tomando en cuenta la experiencia materna más cercana al parto; se estudiaron ratas en los días inmediatos al postparto en dos condiciones diferentes: ratas con el establecimiento de la lactancia y el mantenimiento de las crías, y ratas que tuvieron la separación de las crías al nacer para así evitar la estimulación de la succión y el amamantamiento.

Estudios de nuestro grupo han descrito un efecto neuroprotector demostrando que la lactancia conlleva la protección neuronal del hipocampo dorsal ante el daño selectivo por excitotoxicidad dada por AK (Morales, 2011). Se ha propuesto que son las hormonas las que están ejerciendo un efecto protector ya que durante la lactancia se presentan altos niveles hormonales, principalmente en hormonas como la PRL, OXI, P y estrógenos entre otras. Este complejo hormonal puede generar acciones protectoras actuando a nivel de las neuronas y en general, sus acciones dan como resultado la reestructuración del cerebro materno durante este periodo. Las hormonas que principalmente generan estos efectos neuroprotectores en la lactancia son la prolactina y las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) pues favorecen la supervivencia neuronal. Durante la lactancia se observa que los niveles de

prolactina se mantienen elevados como respuesta a la estimulación de las crías y, a su vez, también ha mostrado tener efectos neuroprotectores contra el daño excitotóxico por AK. En nuestros resultados la neuroprotección está presente desde el día 1 de lactancia y se mantiene aún cuando no hay amamantamiento, por lo que podemos pensar que esta protección está presente desde el embarazo y que la exposición a las hormonas durante el embarazo hacen que se presente este efecto protector. Las hipótesis que planteamos originalmente son que el establecimiento de la lactancia favorecería la neuroprotección en el hipocampo de la rata madre y por ello el daño inducido por AK sería mayor en ratas separadas de sus crías al inicio de la lactancia. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran lo contrario, por lo que al parecer, son las hormonas y no la estimulación dada por la succión la que está favoreciendo la neuroprotección.

Al respecto, se sabe que el tratamiento con PRL, administrada de manera preventiva a una lesión con AK disminuye la magnitud de la lesión y la respuesta glial (Tejadilla et al., 2010). Actualmente, también se sabe que la aplicación de PRL después a la lesión también es efectiva en disminuir el daño pero solamente en el área CA1 (Morales, Reyes-Mendoza J, 2014).

En síntesis, este trabajo de tesis muestra claramente el efecto de neuroprotección que la lactancia confiere a la madre y que la lactancia es un modelo efectivo y natural de resistencia ante la lesión inducida por ácido kaínico, evidenciando que este efecto se presenta desde los primeros días post-parto y de manera independiente del amamantamiento, por lo que podría existir desde el embarazo. Es interesante ahondar en futuras investigaciones más acerca de este mecanismo de neuroprotección que como se ha mencionado es posiblemente mediada por la hormona prolactina y las hormonas ováricas.

## **XI. CONCLUSIONES**

Los resultados presentados en esta tesis muestran que la neuroprotección ante ácido kaínico se presenta desde el inicio de la lactancia. Se observó una disminución a la sensibilidad en el hipocampo de las ratas hembras lactantes ante la acción dañina del ácido kaínico en comparación con las ratas hembras vírgenes. Estas diferencias nos indican que, durante la lactancia temprana, el cerebro de la madre se encuentra blindado por un efecto de protección neuronal en el hipocampo dorsal amortiguando el daño excitotóxico.

Por otro lado, cabe destacar que esta resistencia ante la lesión por excitotoxicidad resultó ser independiente de la succión o el establecimiento de la lactancia. Entonces, este proceso bien puede estar presente desde el embarazo, hecho que resulta interesante y podría ser abordado en investigaciones futuras.

## ANEXO I: ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AK: Ácido Kaínico

Ca<sup>2+</sup>: CALCIO

CA: Cornus Ammonis ó Asta de Ammon

CE: Corteza Entorrinal

CM: Conducta Materna

E: Estradiol

FH: Formación Hipocámpica

GH: Giro Dentado

iGluR: Receptores ionotrópicos de glutamato

KAR: Receptores a Kaínato

LACT-AK-CC: Ratas Lactantes en Condición de Ácido Kaínico con Crías.

LACT-AK-SC: Ratas Lactantes en Condición de Ácido Kaínico sin Crías.

LEC: Corteza Entorrinal Lateral

LACT-SS-CC: Ratas Lactantes en Condición de Solución Salina con Crías.

LACT-SS-SC: Ratas Lactantes en Condición de Solución Salina sin Crías.

MEC: Corteza Entorrinal Medial

O: Oxitocina

P: Progesterona

PPM: Patrón Perforante Medial

PPL: Patrón Perforante Lateral

PRL: Prolactina

SNC: Sistema Nervioso Central

Sub: Subiculum

VAK Ratas: Vírgenes en Condición de Ácido Kaínico con Crías.

VSS Ratas: Vírgenes en Condición de Solución Salina sin Crías.

## XII. REFERENCIAS

1. Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O'keefe, J. 2007. Historical perspective: proposed functions, Biological characteristics, and neurobiological models of the hippocampus. En Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. y O'keefe, J. (Eds.), The hippocampus book. (pp 09-36). USA: Oxford University Press.
2. Anguelova E, Smirnova T. Differential expression of small heat shock protein 27 in the rat hippocampus and septum after fimbria-fornix lesion. *Neurosci Lett*. 2000;280(2):99-102.
3. Berzaghi Mda P, Amado D, Cavalheiro EA. Pregnancy decreases the frequency of spontaneous recurrent seizures in rats with kainic acid lesions of the hippocampus. *Epilepsy Res* 1987; 1: 142-144.
4. Cabrera V, Cantú D, Ramos E, Vanoye-Carlo A, Cerbón M, Morales T. Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity. *Neurosci Lett* 2009; **461**: 136-139.39.
5. Eid T, Williamson A, Lee TS, Petroff OA, de Lanerolle NC. Glutamate and astrocytes-key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia*. 2008;49 Suppl 2:42-52.
6. Gass P, Herdegen T. Neuronal expression of AP1 proteins in excitotoxic neurodegenerative disorders and following nerve fiber lesions. *Progr Neurobiol*. 1995;47(4-5):257-90.
7. Hernandez-Muela S, Mulas F, Mattos L. Functional neuronal plasticity. *REV NEUROL* 2004,38(Supl 1):S58-S68.
8. Hillerer, KM. et al. The maternal brain: an organ with peripartal plasticity. *Neural Plast*. *Neural Plast* 2014 4;2014:574159.
9. Kandel, E.R., Dchwartz, J.M. y Jessell, T.M. 2000. Principles of neural science. Eds. Kandel ER, Dchwartz JM y Jessell TM. Cuarta Edición, McGraw-Hill.
10. Kasof GM, Mandelzys A, Maika SD, Hammer RE, Curran T, Morgan JI. Kainic acid-induced neuronal death is associated with DNA damage and a unique immediate early gene response in c-fos-lacZ transgenic rats. *J Neurosci*. 1995;15(6):4238-49.
11. Kewal K. Jain . The Handbook of Neuroprotection. Totowa, NJ: Humana Press. 2011.
12. Kim P. et al. The Plasticity of Human Maternal Brain: Longitudinal Changes in Brain

- Anatomy During the Early Postpartum Period. Behavioral Neuroscience 2010, Vol. 124, No. 5, 695–700
13. Kinsley CH, Lambert KG. The maternal brain. Sci Am. 2006 Jan;294(1):72-9.
  14. Kinsley CH, Lambert KG. Reproduction-induced neuroplasticity: natural behavioural and neuronal alterations associated with the production and care of offspring. J Neuroendocrinol 2008; **20**: 515-525.
  15. Kinsley CH, Bardi M, Karelina K, Rima B, Christon L, Friedenbergr J, Griffin G. Motherhood induces and maintains behavioral and neural plasticity across the lifespan in the rat. Arch Sex Behav 2008; **37**: 43-56.
  16. Krishnan, N., Thellin, O., Buckley, D.J., Horseman, N.D. y Buckley, A.R. 2003. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. Endocrinology 144(5): 2102-10.
  17. Larriva-Sahd, Jorge. 2002. Some contributions of Rafael Lorente de Nó to neuroscience: A reminiscence. Brain Research Bulletin, Vol. 59, No. 1, pp. 1–11,
  18. Lee, H. y Choi, B.H. 1992. Density and distribution of excitatory amino acid receptors in the developing human fetal brain: a quantitative autoradiographic study. Exp. Neurol. 118(3): 284-90.
  19. Leff, M.A., Buckley, D.J., Krumenacker, J.S., Reed, J.C., Miyashita, T. y Buckley, A.R. 1996. Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. Endocrinology 137(12): 5456-62.
  20. Lerma, J. 1997. Kainate reveals its targets. Neuron 19(6): 1155-8.
  21. Leuner, B., Mirescu, C., Noimain, L., Gould, E., 2007. Maternal experience inhibits the production of immature neurons in the hippocampus during the postpartum period through elevations in adrenal steroids. Hippocampus 17, 434-42.
  22. Lorigados L. et al. Excitotoxicidad y muerte neuronal en epilepsia. Biotecnología aplicada 2013; Vol. 30, No 1
  23. McDonald J.W., Althomsons S.P., Hyrc. K.I., Choi D., Goldberg M.P. 1998. Oligodendrocytes from the forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. Nature med. 4: 291-297.
  24. Melo A. Motivación maternal en mamíferos inferiores y el humano. En Cap 9 de Motivación animal y humana. Ed El Manual Moderno. Universidad de Guadalajara. Instituto de Neurociencias: UNAM. Facultad de Psicología, 2002.
  25. Morales. B, Rozas C., Pancetti F., Kirkwood A. Periodos de plasticidad cortical. REV

- NEUROL 2003;37(8):739-743.
26. Morales T. , Reyes-Mendoza J, et al. Acciones tróficas de la prolactina en el sistema nervioso central. LVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas . Agosto 31 al 4 de Septiembre,2014. Cd. De Oaxaca, Mexico.
  27. Morales T. Maternidad y neuroplasticidad. Revista Digital Universidad. 2001.Vol 12 Numero 3 ISSN: 1067-6079.
  28. Morales T. Recent Findings on Neuroproteccion Against Excitotoxicity in the Hippocampus of Female Rats. 2011. JOURNAL of Neuroendocrinology, 23, 994-1001.
  29. Moratall NG, Genes, brain and maternal behaviour. Humanismo, ciencia y sociedad. ACRE. 2011
  30. Nadler JV, Shelton DL, Perry BW, Cotman CW. Regional distribution of [3H]kainic acid after intraventricular injection. Life Sci. 1980 Jan 14;26(2):133-8.
  31. Pereno GL. Fisiopatología de la epilepsia del lóbulo temporal: revisión del proceso de muerte neuronal a la neuroplasticidad. Rev Argentina Cienc Comportamiento. 2010;2(1):46-57.
  32. Pascual-Leone A, Amedi A, Fregni F, Merabet LB. The plastic human brain cortex. Annu Rev Neurosci. 2005;28:377-401.
  33. Paxinos, G. 1995. The hippocampal formation. En: Paxinos G (Ed), The rat nervous system. USA Academic Press.
  34. Planas AM, Soriano MA, Estrada A, Sanz O, Martin F, Ferrer I. The heat shock stress response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. Prog Neurobiol. 1997;51(6):607-36.
  35. Planas AM, Soriano MA, Ferrer I, Rodriguez Farre E. Kainic acid-induced heat shock protein-70, mRNA and protein expression is inhibited by MK-801 in certain rat brain regions. Eur J Neurosci. 1995;7(2):293-304.
  36. Pozas E, Ballabriga J, Planas AM, Ferrer I. Kainic acid-induced excitotoxicity is associated with a complex c-Fos and c-Jun response which does not preclude either cell death or survival. J Neurobiol. 1997;33(3):232-46.
  37. Rebolledo F. Plasticidad cerebral. Parte 1 y Parte 2. Rev Med IMSS 2003;41 (1):55-64; 41(2) : 133-142.
  38. Rodríguez-Moreno .Función de los receptores de kainato en la regulación de la transmisión sináptica excitadora en el hipocampo. REV NEUROL 2006;42:282-287

39. Sattler R., Tymianski M. 2001. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 24: 107-129.
40. Sperk G, Lassmann H, Baran H, Seitelberger F, Hornykiewicz O. Kainic acid-induced seizures: dose-relationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes. *Brain Res.* 1985;338(2):289-95.
41. Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience.* 1980;5(6):991-1014.
42. Tejadilla D, Cerbón M, Morales T. Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience* 2010; **169**: 1178-1185.
43. Valentim LM, Geyer AB, Tavares A, Cimarosti H, Worm PV, Rodnight R, et al. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein immuncontent and phosphorylation in rat hippocampus. *Neuroscience.* 2001;107(1):43-9.
44. Vanoye-Carlo A, Morales T, Aguilar E, Mendoza Rodríguez A, Cerbón MA. Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Horm Behav* 2008; **53**: 112-123.
45. Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis.* 2010; 15(11):1382-402
46. Woodside B. Morphological plasticity in the maternal brain: comment on Kinsley et al.; motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm Behav* 2006; **49**:129-130
47. Yang JL, Sykora P, Wilson DM, 3rd, Mattson MP, Bohr VA. The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency. *Mech Ageing Dev.* 2011;132(8-9): 405-11
48. Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM, et al. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol.*1998;44(4):584-91.