



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFEITOS DE PROLACTINA SOBRE ESTRUCTURA Y  
FUNCIONALIDAD DEL HIPOCAMPO MEDIAL DE RATA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**NATALIA TERPAN ARENAS**



**DIRECTORES DE TESIS:  
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES  
DRA. ERIKA ALEJANDRA CABRERA REYES  
CIUDAD DE MÉXICO, 2020**



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.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos de la alumna  
Terpan  
Arenas  
Natalia  
55 40395820  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
313513372
2. Datos del tutor 1  
Dr.  
Marco Antonio  
Cerbón  
Cervantes
3. Datos del tutor 2  
Dra.  
Erika Alejandra  
Cabrera  
Reyes
4. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Edgar  
Vergara  
Castañeda
5. Datos del sinodal 2  
Dr.  
Ignacio  
González  
Sánchez
6. Datos del sinodal 3  
Dra.  
María de Lourdes  
Segura  
Valdez
7. Datos del trabajo escrito  
Efectos de prolactina sobre estructura y funcionalidad del  
hipocampo medial de rata  
57 p  
2020

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Endocrinología Molecular de la Facultad de Química de la UNAM en colaboración con el Laboratorio de Nanobiología Celular. Agradezco el apoyo brindado por los equipos de ambos laboratorios durante el procedimiento metodológico y teórico del proyecto. Se agradece de igual manera al equipo del laboratorio de Histología del INER a cargo de Guadalupe Hiriart, que permitió el procesamiento de las muestras utilizadas durante el proyecto.

Agradezco de igual manera al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento otorgado al proyecto IN228420, el cuál apoyó la realización de esta tesis de licenciatura.

Agradezco al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por permitirme desarrollar un proyecto en el laboratorio a su cargo, además de brindar su apoyo y guía durante todo el tiempo que se llevó a cabo el trabajo.

Agradezco, de igual forma, a la Dra. María de Lourdes Segura Valdez y al Dr. Luis Felipe Jiménez García, por brindarme apoyo y abrirme las puertas de su laboratorio en todo el momento que lo requerí para la realización de este proyecto.

*A mis padres.  
Gracias por inspirarme, motivarme  
y hacer que sea la persona que soy hoy.  
Espero poder seguir creciendo con ustedes  
a mi lado por muchos años más.*

## Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias que me brindaron las herramientas, recursos y conocimientos necesarios para poder concluir con mis estudios de licenciatura. Agradezco de la misma manera a los maestros que dedicaron su tiempo y esfuerzo en los cursos a los que asistí, por su dedicación y pasión.

Al doctor Marco Antonio Cerbón Cervantes por su apoyo y atención, por dedicar tiempo al proyecto, a mis preguntas académicas y personales. Le agradezco y admiro de igual manera por ser una persona con gran sentido moral y de lo justo, que lucha por sus ideales en la ciencia y en México. Considero que usted es una persona que puede ser fuente de inspiración en un sentido humano y académico. Espero que sus ideas, teorías y preguntas sigan presentes por mucho tiempo más.

A la doctora Erika Alejandra Cabrera Reyes, por su ayuda en la realización de este escrito y de los procedimientos con animales experimentales que se llevaron a cabo. Me llevo conmigo los consejos que me diste, lo que me enseñaste y tu infinita positividad ante cualquier situación.

A los doctores, Edgar Vergara Castañeda e Ignacio González, por brindarme su apoyo en la revisión de este escrito y durante mi aprendizaje y formación en el laboratorio.

Al doctor Luis Felipe Jiménez García y a la doctora María de Lourdes Segura Valdez, por no solo brindarme ayuda y asesoría académica, sino también por estar abiertos y dispuestos a entablar conmigo y sus alumnos una relación llena de risas y respeto. Gracias por ser personas con excelencia académica y humana. Tienen un grupo de trabajo muy bonito, que se refleja en ustedes y el como se desarrollan las cosas en su laboratorio. Gracias por siempre estar dispuestos a escuchar.

A mi madre, Silvia, por ser una fuente de inspiración, como mujer en la ciencia y como persona. Gracias por tanto cariño, tanta dedicación y tanto esfuerzo. Todos los que estamos contigo sabemos que eres una persona muy valiosa, y puedo decir que eres de las más fuertes que conozco. Te admiro y continuaré la siguiente etapa de mi vida conservando todo lo que me has inculcado.

A mi padre, Leobardo, por siempre brindarme un amor y cariño incondicional que sé que no podré encontrar en nadie más. Gracias por siempre cuidarme, hacerme reír y preocuparte por mí. Es también gracias a ti, de igual manera, que le tenga tanto amor a la vida y los seres (pequeños y grandes) que habitan en este planeta.

A mi hermano, Rodrigo, quien es mi persona favorita. Gracias por siempre estar, por siempre bromear, por entenderme. Gracias por compartir gustos, por permitirme escucharme y también dejarme escucharte. Toda mi vida ha sido más divertida porque estás conmigo. Pierde el miedo a las cosas y crece muy alto, conmigo a tu lado.

A Enrique, por quererme y apoyarme en todo momento. Gracias por estar y haber compartido todo este trayecto conmigo. Gracias por siempre brindarme tu hombro cuando lo necesito y por hacerme reír y sentirme en paz siempre que estoy contigo. Gracias también por darme una perspectiva diferente de las cosas, por ser objetivo ante mis preguntas y miedos, además de siempre impulsarme a ir por más.

A la bióloga Saraí Cruz y la M. en C. Ana Paulina Mendoza, por siempre mover cielo, mar y tierra para conseguir lo que fuese necesario no solo para mí, si no para todo aquel que lo necesitara. Gracias por tu amistad, consejos y apoyo durante el desarrollo del proyecto. Gracias por las comidas y las charlas, los buenos momentos y su cariño.

A mis amigas, Anaiza, Mariana, Alejandra, Karol y Ariana, por quererme y estar ahí, por demostrarme su fuerza y determinación en seguir una carrera en el ámbito

académico y científico, por ser pilares de apoyo durante las clases y los experimentos. Confío podrán desempeñarse como exitosas mujeres en la ciencia.

A mis amigas, Andrea, Sofía, Adriana, Belén, Camila y Laura; por seguir conmigo después de tantos años de amistad. Gracias por las horas de risa y de apoyo, gracias por dejarme compartir tanto con ustedes. Gracias por el intercambio de ideas y perspectivas.

A Diego y a Erick, de nanobiología, por su sincera amistad. Gracias por las bromas, y por escuchar mis opiniones e ideas en el laboratorio. Gracias por aceptar mis críticas y mis comentarios sobre su trabajo, y permitirme recibir las de ustedes de igual manera. Gracias por los cafés de la mañana, las comidas y las pláticas, por los juegos y las caminatas.

A todos los miembros de los laboratorios de Endocrinología Molecular de la Facultad de Química y del laboratorio de Nanobiología Celular de la Facultad de Ciencias, por apoyar en aspectos metodológicos y teóricos del proyecto cuando fue necesario.

Muchas gracias a todos.

## Contenido

Resumen .....	9
Lista de figuras .....	9
Lista de tablas .....	9
Introducción.....	10
Antecedentes .....	12
Objetivo general .....	25
Objetivos particulares .....	25
Metodología.....	26
Resultados .....	33
Discusión.....	41
Conclusiones.....	46
Referencias .....	47

## Resumen

En el presente trabajo se estudió el efecto de la hormona prolactina sobre el hipocampo medial de rata. La prolactina es una hormona peptídica con una amplia variedad de efectos a nivel biológico, teniendo acción sobre diversos sistemas como es el sistema nervioso central; en donde además se ha visto que puede funcionar como agente neuroprotector. Debido a su importancia es de especial interés estudiar el cómo la hormona puede afectar a los tejidos dentro del sistema no solo a un nivel molecular, sino también a un celular. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que prolactina puede modificar la estructura y funcionalidad del hipocampo, ejerciendo cambios en el estrato neuronal y la microglía.

## Lista de figuras

Figura 1. Prolactina modifica del estrato neuronal del hipocampo a tiempos cortos.....	34
Figura 2. Prolactina incrementa el número de nucléolos en células del estrato neuronal del hipocampo medial de <i>Rattus norvegicus</i> .....	36
Figura 3. Incremento en la distancia entre los núcleos de las células del estrato neuronal del hipocampo medial de <i>Rattus norvegicus</i> dado por prolactina.....	38
Figura 4. Cambio de apariencia y tamaño de microglía dado por la adición de prolactina en hipocampo medial de <i>Rattus norvegicus</i> .....	40

## Lista de tablas

Tabla 1. Tratamientos, dosis y vías de administración.....	26
Tabla 2. Pasos seguidos para el procesamiento de los tejidos de acuerdo con el grosor de corte necesitado.....	28

## Introducción

La prolactina es una hormona peptídica sintetizada principalmente en la glándula hipofisaria, cuyas funciones descritas abarcan más de 300 efectos biológicos en los mamíferos que se puede asociar a procesos tales como modulación de respuesta al estrés, la regulación inmune y el transporte de calcio, entre otras (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Ferraris *et al.*, 2013). En años recientes ha recibido especial interés por sus notorios efectos en el sistema nervioso central, al contar con la capacidad de mejorar el rendimiento cognitivo y la memoria espacial al inducir neurogénesis, proliferación celular y sobrevivencia durante el neurodesarrollo, poder promover la neuroplasticidad y la remodelación dendrítica durante el embarazo y post-parto; así como la recuperación y protección neuronal ante el daño excitotóxico inducido con glutamato o ácido kaínico en el hipocampo (Torner, 2016; Vergara-Castañeda *et al.*, 2016; Cabrera-Reyes *et al.*, 2017; Rivero-Segura *et al.*, 2017; Salais-López *et al.*, 2017). Además de lo mencionado con anterioridad, esta hormona cumple papeles clave durante diferentes etapas de vida de los individuos, promoviendo conductas esenciales que se pueden llegar a necesitar por parte de las hembras madres durante los periodos de lactancia y el cuidado de las crías (Bridges y Grattan, 2003; Mak y Weiss, 2010; Cabrera-Reyes *et al.*, 2017).

Entre las regiones del sistema nervioso central que se han estudiado bajo los efectos de la prolactina se encuentra el hipocampo. Esta área del cerebro se caracteriza por llevar a cabo funciones de memoria y aprendizaje, asociándose también a procesos de regulación de comportamiento por parte de los individuos (Hennerici, 2014). Además, se caracteriza por ser uno de los dos sitios donde se ha reportado la existencia de mecanismos de neurogénesis en edad adulta; encontrándose solo en la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Larsen y Grattan, 2010, 2012). Debido a la importancia de las funciones que lleva a cabo el hipocampo diversos estudios se han enfocado a procesos neurodegenerativos en enfermedades donde la pérdida de la memoria y otras funciones cognitivas son los puntos clave, enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Khadrawy y Ezza, 2014). Se

ha visto que la prolactina es un agente efectivo contra el daño causado por procesos de excitotoxicidad, evitando la pérdida neuronal como se ha demostrado en numerosos estudios llevados a cabo tanto *in vivo* como *in vitro* (Vanoye-Carlo *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2009; Tejadilla, Cerbón y Morales, 2010; Vergara-Castañeda *et al.*, 2016; Rivero-Segura *et al.*, 2017). Los mecanismos moleculares por los que la prolactina ejerce un efecto sobre esta región, junto con la efectividad de esta hormona como agente neuroprotector, son un punto de interés para numerosas investigaciones. Sin embargo, existen pocos estudios dirigidos a investigar los efectos propios de la hormona y su efecto fisiológico en el hipocampo a nivel tisular y molecular. Recientemente mediante un estudio de secuenciación (RNASeq), se reveló que al administrar prolactina por vía intraperitoneal en ratas existe un cambio en los transcritos producidos dentro del hipocampo; presentando un incremento en la transcripción en genes clave para el funcionamiento sináptico, la estructura de la matriz extracelular y el funcionamiento neuronal en general, la microglía, dentro otros (Cabrera-Reyes *et al.*, 2019). Es bien sabido que al existir un cambio en la expresión transcripcional se da de igual manera un cambio en la dinámica nuclear y celular, existiendo cambios visibles a nivel morfológico de estructuras celulares nucleares y nucleolares, además de un cambio en la expresión protéica y de marcadores específicos; como ocurre en células estimuladas por algunos factores somatotrópicos o células alteradas por alguna enfermedad como el cáncer (O'Malley y Means, 1974; Tung, Dorrington y Fritz, 1975; Dey, 2010; Kalinin *et al.*, 2018). Estos cambios pueden afectar a su vez células contiguas, tomando esto en el contexto del sistema nervioso central donde no solo puede existir un cambio transcripcional y celular en las neuronas sino también a células de la glía, las cuales en años recientes han ganado importancia en los estudios de diversos procesos y mecanismos neuroendócrinos en el sistema nervioso central. Por estos motivos se consideró estudiar los efectos que ejerce la prolactina sobre la población de neuronas hipocampales a nivel estructural, morfológico y funcional a nivel celular, además de su efecto en la población celular de microglía encontrada en esta región.

## Antecedentes

La prolactina es una hormona de tipo peptídica que se produce principalmente de forma principal en la glándula pituitaria (Torner, 2016), encontrándose presente en todos los grupos de vertebrados. Esta hormona en el humano se encuentra codificada en el cromosoma 6, mientras que en roedores existen múltiples genes relacionados a su producción; codificada en el genoma de ratones dentro del cromosoma 13 y en ratas dentro del cromosoma 17 (Ben-Jonathan y Hugo, 2015). En humanos, el gen de prolactina está formado por 5 exones y 4 intrones, mismo que codificará para un péptido de 199 aminoácidos (Kanyicska *et al.*, 2000). Su peso de forma normal es de 23 kDa, sin embargo se han reportado variantes como resultado de mecanismos de corte y empalme, *splicing* alternativo, degradación proteolítica o modificaciones post-transcripcionales (Kanyicska *et al.*, 2000; Ben-Jonathan y Hugo, 2015). Además, en pacientes con hiperprolactinemia la hormona prolactina puede encontrarse en un complejo heterodimérico con la inmunoglobulina gamma (IgG) llegando a tener un peso de superior a los 100 kDa (Ben-Jonathan y Hugo, 2015).

La prolactina junto con la hormona del crecimiento (GH por sus siglas en inglés) y el lactógeno placentario son conocidos como lactógenos; perteneciendo a la superfamilia de citocinas en la cual existen más de 20 proteínas las que se asemejan entre sí en su estructura (Kanyicska *et al.*, 2000). La prolactina es una hormona pleiotrópica en vertebrados con más de 300 efectos descritos (Diakonova y Hammer, 2015), que se clasifican en cinco categorías principales: reproducción, crecimiento y desarrollo, equilibrio hidroelectrolítico, inmunomodulación, procesos cerebrales y comportamiento (Freeman *et al.*, 2000; Castanho *et al.*, 2014). Como ejemplo, se puede mencionar el papel de la hormona durante la lactancia promoviendo el desarrollo de las glándulas mamarias y lactogénesis, en la función lútea al desempeñarse como un agente luteotrófico o luteolítico dependiendo del estado del organismo, en la regulación del comportamiento parental, en la regulación del sistema inmune, en osmorregulación celular y angiogénesis, entre otros (Carretero *et al.*, 2019). En el sistema nervioso central (SNC), la prolactina destaca por promover neurogénesis tanto en la zona granular del giro dentado del

hipocampo y la zona subventricular del bulbo olfatorio, además de promover la producción de ciertos neurotransmisores y neuropéptidos que permiten un buen funcionamiento, el desarrollo neuronal en organismos neonatales, la mejora en memoria espacial y funcionamiento cognitivo y más recientemente, ha adquirido un papel protagónico como agente neuroprotector (Cabrera-Reyes *et al.*, 2017).

Como fue mencionado con anterioridad, el principal sitio de síntesis de prolactina es la glándula pituitaria en las células lactotróficas, aunque existen otros sitios de producción periféricos como son el hipotálamo, la placenta y el útero, las glándulas mamarias e inclusive células del sistema inmune como linfocitos, entre otros (Gregerson, 2006). Sin embargo, es importante mencionar que la producción dependerá del estado del organismo así como de su sexo y edad, como se ha evidenciado en ratas en las que la producción de prolactina en hembras se da de forma constante por más de la mitad de los lactotropos mientras que en machos dicha producción se da forma intermitente (Booth y Gutierrez-Hartmann, 2014). La secreción de prolactina también está regulada de acuerdo al ciclo circadiano, encontrándose en humanos una mayor concentración de la hormona en sangre durante el sueño teniendo un pico de forma previa a que el individuo despierte, sugiriendo que la hormona puede ser una causa de la alteración en los patrones de reposo de ciertos individuos (Kanyicska *et al.*, 2000). En ratas, se ha reportado que al momento del nacimiento los niveles de prolactina en sangre son bajos y aumentan de forma exponencial hasta la quinta semana de vida, llegando a un nivel estable en la octava semana en machos y oscilando en hembras durante su ciclo estral en concentraciones en suero de entre 68.5 ng/ml y 27.6 ng/ml (Amenomori, Chen y Meites, 1970; Hav'Kins *et al.*, 1975; Tissier *et al.*, 2014). Este incremento es regulado por varios factores, los más importantes siendo el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento tipo insulina 1 y el estradiol (Tissier *et al.*, 2014). Una vez que los individuos llegan a una etapa reproductivamente funcional la prolactina sigue ciclos de regulación con base en la fase del ciclo estral en la que el individuo se encuentre (Ronnekleiv y Kelly, 1988). En ratas no gestantes los niveles de la hormona se mantienen bajos durante las fases del estro, metaestro y diestro; siendo en la tarde del proestro cuando existe un aumento en su secreción (Tissier

*et al.*, 2014). Este aumento se debe principalmente al incremento de los niveles de estrógenos en suero, existiendo estudios que han confirmado que una inyección de prolactina en ratas ovariectomizadas promueve el incremento de prolactina de manera similar a la fase proestro del ciclo estral de la rata (Neill, 1972). Cuando se da un evento de apareamiento entre individuos y entran en gestación, los niveles de prolactina aumentan durante los primeros días del embarazo llegando a una concentración en suero de hasta 30.2 ng/ml, que disminuye conforme progresa el embarazo llegando a niveles de 10.9 ng/ml (Amenomori, Chen y Meites, 1970; Hav'Kins *et al.*, 1975; Tissier *et al.*, 2014). Sin embargo, a partir del día 22 y hasta el término del embarazo estos niveles en suero vuelven a subir llegando a una concentración de aproximadamente 29.2 ng/ml, teniendo en el primer día del postparto una concentración en suero estimada de 65.5 ng/ml (Amenomori, Chen y Meites, 1970; Grattan, 2001; Tissier *et al.*, 2014). Durante el periodo de lactancia se mantiene un nivel alto de la hormona en suero de aproximadamente 25.7 ng/ml debido al estímulo físico dado por la succión de las crías, el cual recae rápidamente una vez que la hembra es destetada llegando a una concentración de 8.3 ng/ml (Amenomori, Chen y Meites, 1970; Hav'Kins *et al.*, 1975; Tissier *et al.*, 2014). Existen ocasiones, sin embargo, en las que las vías de regulación de la secreción de prolactina son alteradas, y por tanto los niveles en suero de la hormona se encuentran en niveles elevados de manera constante (Booth y Gutierrez-Hartmann, 2014; Capozzi *et al.*, 2015). Es en estos casos cuando se dice que se genera un estado patológico de hiperprolactinemia, el cual es comúnmente generado por un grupo de células que sobre producen la hormona y que en conjunto son denominados como adenomas secretores de prolactina o prolactinomas (Booth y Gutierrez-Hartmann, 2014).

Las funciones biológicas de la prolactina se llevan a cabo cuando se une a su receptor, el receptor de prolactina; este receptor estructuralmente se caracteriza por contar con tres dominios característicos: el dominio extracelular, el transmembranal y el intracelular. Al ser miembro de la superfamilia de receptores tipo citocina, este receptor comparte similitudes con los receptores de la hormona del crecimiento y del lactógeno placentario, llevando tras su activación un proceso

de fosforilación en una variedad de proteínas citoplasmáticas (Ben-Jonathan y Hugo, 2015). El gen del receptor de prolactina en humanos se encuentra en el cromosoma 5 conteniendo 11 exones dentro de su secuencia, existiendo al día de hoy una descripción de diversas isoformas obtenidas a partir de procesos de *splicing* alternativo, las cuales difieren principalmente en la longitud del dominio citoplasmático del receptor (Roth y Kramer, 2019). Al igual que su ligando, este receptor se encuentra distribuido a lo largo de diversos tejidos, teniendo como ejemplo al hígado, las glándulas mamarias, la glándula adrenal, el hipocampo y el hipotálamo, entre otros. Sin embargo, es evidente que la expresión de este receptor dependerá de factores fisiológicos, dependiendo directamente de los niveles circulantes de prolactina y otras hormonas esteroideas (Ben-Jonathan y Hugo, 2015).

Los receptores de prolactina cuentan con un dominio extracelular universal de aproximadamente 200 aminoácidos que se conservan entre las diferentes isoformas del receptor, teniendo subdominios D1 y D2 con motivos de fibronectina tipo 3 (Gregerson, 2006). Cabe mencionar que existe una homología del dominio extracelular de estos receptores entre humanos y ratas del 74 %, mientras que entre humanos y ratones el porcentaje de homología es del 71 % (Ben-Jonathan y Hugo, 2015). La diferencia principal entre las isoformas existentes se encuentra en el dominio intracelular, que se puede componer de un número diferente de aminoácidos. Con base en la longitud de este dominio se podrá clasificar el receptor de acuerdo con el tamaño final de este; existiendo de forma clásica el receptor corto de prolactina de 42 kDa (PRLR-S), el receptor mediano de prolactina de 50 kDa (PRLR-M) y receptor largo de prolactina de 90 kDa (PRLR-L). Sin embargo, en los humanos se ha reportado que existen al menos cinco isoformas diferentes, entre las que se pueden encontrar dos variantes de la isoforma corta (PRLR-S1a y S1b) y las isoformas solubles; las que se encuentran de forma extracelular y se originan por medio de la proteólisis del receptor (Ben-Jonathan y Hugo, 2015). La abundancia de una isoforma sobre otra, así como su presencia o ausencia, depende del tejido y el contexto del que se hable, existiendo diferencias a nivel celular y tisular, así como de la especie y el organismo en específico (Cabrera-Reyes *et al.*, 2017). En el SNC de la rata se ha descrito que las tres isoformas clásicas se

encuentran presentes, siendo la isoforma larga la que predomina en estos tejidos (Carretero *et al.*, 2019), reportándose que en el hipocampo predominan las isoformas de PRLR cortas y largas (Cabrera-Reyes *et al.*, 2017; Rivero-Segura *et al.*, 2017).

La activación del receptor se da cuando existe la formación de un complejo trimérico que consiste en dos receptores con un ligando, uniéndose la molécula de prolactina al subdominio D1 del dominio extracelular (Kanyicska *et al.*, 2000). Al formarse el complejo, inicia el proceso de transfosforilación del dominio intracelular del receptor. En este dominio existen regiones conservadas conocidas como Box1, que es una región próxima a la membrana rica en prolina, y Box2, una región menos conservada con abundancia de tirosina ausente en la isoforma corta del receptor. A la región Box1 se asocia de forma constitutiva la tirosina quinasa Janus quinasa 2 (Jak2), la cual es activada una vez que se forma el complejo trimétrico mencionado anteriormente para dar paso a un proceso de transfosforilación, en el cual tanto Jak2 como los residuos de tirosina del receptor son fosforilados (Kanyicska *et al.*, 2000). De igual manera, se da la fosforilación de segundos mensajeros como pueden ser STAT5, MAPK y PI3-K, lo que dará lugar a la activación de genes y procesos específicos en la célula (Rivero-Segura *et al.*, 2017). Finalmente, la regulación se da por medio de la intervención de diversos factores, como puede ser la secreción de dopamina por neuronas dopaminérgicas o los mismos niveles de prolactina a nivel sanguíneo que pueden regular la producción de esta, en un sistema de retroalimentación negativa (Torner, 2016).

En el SNC la prolactina y su receptor tienen una amplia distribución en diferentes regiones, contribuyendo en diversos mecanismos y funciones necesarias para el correcto desarrollo y comportamiento del individuo en diversas etapas de vida (Cabrera-Reyes *et al.*, 2017). La acción de prolactina es tejido específico, pudiendo generar diferentes efectos de acuerdo a la zona e inclusive al tipo celular del que se trate. Es importante mencionar que pese a existir síntesis de la hormona dentro de diferentes regiones cerebrales como el hipotálamo (Grattan, 2015), la prolactina también puede entrar al cerebro atravesando la barrera hematoencefálica por un transportador específico localizado en las membranas del plexo coroideo, ya

que un estudio reciente reportó que el transporte de prolactina al cerebro es independiente del PRLR lo que sugiere la existencia de un transportador que no ha sido aún identificado (Brown *et al.*, 2016). Una vez dentro del SNC la prolactina actúa de diversas maneras, ejemplos siendo como un agente importante en los procesos de lactancia y maternidad, incrementando la expresión del gen de PRLR durante la lactancia en el bulbo olfatorio, la corteza cerebral y el hipotálamo; asociando este fenómeno a un comportamiento materno por parte del individuo (Pi y Grattan, 1998, 1999; de Moura *et al.*, 2015). La hormona también contribuye de forma activa a la regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal durante los periodos de embarazo, con el fin de reducir las respuesta de estrés que pueda presentar el individuo (Parker, Menzies y Douglas, 2011; Torner, 2016). Se ha visto que prolactina puede estar involucrada en mecanismos de neurodesarrollo; al contar con una elevada tasa de producción de su receptor durante etapas tempranas del desarrollo en la zona del bulbo olfatorio (Roselli *et al.*, 2008). Por otro lado, también se sabe que la prolactina puede tener un rol importante en procesos de neurogénesis en la vida adulta de los individuos, tanto en la zona subventricular como en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (Bridges y Grattan, 2003; Larsen y Grattan, 2010, 2012). Estos estudios han atribuido este efecto principalmente a procesos de maternidad y lactancia en los individuos, sugiriendo que la hormona puede llegar a promover de forma positiva los estímulos y comportamientos maternos que los individuos necesitan (Bridges y Grattan, 2003; Shingo *et al.*, 2003; Larsen y Grattan, 2012). El mecanismo de neurogénesis también ha sido visto como un complemento a los efectos neuroprotectores que prolactina ejerce, existiendo en las últimas décadas un gran interés clínico por ambos procesos. De igual forma, se ha demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* que la prolactina puede prevenir y reducir el daño y muerte celular causado por agentes excitotóxicos o de estrés, sin embargo se desconocen los mecanismos de acción utilizados por la hormona para ejercer dicha protección (Vanoye-Carlo *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2009; Tejadilla, Cerbón y Morales, 2010; Vergara-Castañeda *et al.*, 2016; Rivero-Segura *et al.*, 2017).

Una de las zonas más estudiadas en el SNC en referencia al efecto y acción de prolactina es la región del hipocampo. Esta es una estructura neuronal que se caracteriza por llevar a cabo funciones de memoria y aprendizaje que le permiten a los individuos desarrollarse de manera normal en su entorno (Hennerici, 2014). La estructura del hipocampo se puede identificar con facilidad por su forma curva, la cual se encuentra pareada en ambos hemisferios cerebrales en el interior del lóbulo temporal. Para poder estudiarlo se suele referir a la existencia de dos partes principales con base en sus estructuras laminares: una conocida como *Cornu Ammonis* que está envuelta por otra denominada giro dentado (Duvernoy *et al.*, 2013). El *Cornu Ammonis* se puede dividir en 6 capas diferentes, sin embargo, es la capa piramidal que se caracteriza por su composición de neuronas de tipo piramidal y que ha sido ampliamente estudiada. Esta se puede dividir a su vez en diferentes campos que facilitan su estudio conocidos como CA1, CA2, CA3 y CA4; clasificando estos con base en las características de las neuronas piramidales que lo componen. Por un lado, la región de CA1 se caracteriza por poseer un abundante número de neuronas con soma triangular y pequeño; las cuales varían entre los ejes transversales y rostrocaudales dividiéndose entonces entre el estrato profundo (mayor cantidad de neuronas) y el estrato superficial (menor cantidad de neuronas) (Schultz y Engelhardt, 2014). La región de CA2, por otro lado, se compone de células con somas de un tamaño más grande y forma más ovaladas (pese a ser de tipo piramidal), formando un estrato más delgado que el encontrado en CA1 (Watts, 2005; Duvernoy *et al.*, 2013). La región de CA3 se encuentra en una posición curvada, lo que es en primera instancia la característica más notoria de esta región en relación al resto; teniendo somas celulares parecidos a aquellos encontrados en CA2 pero en una menor densidad a CA2 y presenta una “fibra musgosa” proveniente de los axones de las neuronas encontradas en el giro dentado (Watts, 2005). Finalmente, la región de CA4 se encuentra envuelto por la curvatura del giro dentado, caracterizado por células piramidales con forma ovoide y grande, las cuales se encuentran dispersas y rodeadas de fibras mielinizadas que una vez más son denominadas como “musgosas” (Duvernoy *et al.*, 2013). El otro componente del hipocampo, el giro dentado, es una lámina delgada que cubre de forma cóncava

el segmento del CA4. Esta estructura cuenta con tres capas fáciles de diferenciar: el estrato granuloso, el estrato polimórfico y el estrato molecular. El estrato granuloso se podría definir como el principal, y cuenta con neuronas con soma redondo y pequeño cuyos axones de forma “musgosa” rodean a las células de CA3 y CA4. Este se interconecta por medio de dendritas con los otros dos estratos, el estrato molecular que también está interconectado con fibras de la vía de señalización prefrontal y el estrato polimórfico (o capa polimórfica) que permite la unión del estrato granular con la región del CA4 (Watts, 2005; Duvernoy *et al.*, 2013; Szabo y Hennerici, 2014).

Todos estos conjuntos neuronales trabajan a la par para llevar a cabo diferentes funciones asociadas al hipocampo; teniendo el aprendizaje y la memoria en un primer plano; además de la regulación del eje hipotálamo-hipofisial que puede disminuir la producción de la hormona adrenocorticotropa (Watts, 2005; Schultz y Engelhardt, 2014; Wingefeld y Wolf, 2014). En caso de fallar o dañarse esta estructura, se ha documentado que puede llevar a condiciones de pérdida de memoria a corto y largo plazo, tanto en casos con daño por hipoxia así como en aquellos que fueron resultado de efectos excitotóxicos de las células glutamatérgicas encontradas en CA3 y CA1; asociándose de esta manera a enfermedades como Alzheimer, Parkinson o secuelas tras un episodio de isquemia (Ikonomidou y Turski, 1995; Henschcliffe y Beal, 2007). Considerando esta frecuente problemática se ha propuesto a la prolactina como un agente clave para confrontar esta situación, ya que se ha visto en múltiples estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que al ser administrada puede contribuir a la disminución del daño producido a nivel celular por efectos excitotóxicos y de isquemia en esta región del cerebro (Vanoye-Carlo *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2009; Tejadilla, Cerbón y Morales, 2010; Jain, 2011; Vergara-Castañeda *et al.*, 2016). Si bien los mecanismos moleculares por los que la prolactina lleva a cabo este mecanismo neuroprotector aún no son bien conocidos, el estudio de estos sigue en pie con la intención de tener un mejor entendimiento de estos mecanismos ante daño excitotóxico y poder tener un mejor pronóstico ante este tipo de enfermedades (Cabrera-Reyes *et al.*, 2017; Rivero-Segura *et al.*, 2017). Dentro de las funciones que prolactina ejerce en el hipocampo

se sabe puede promover neurogénesis en la zona subgranular de la capa granular del giro dentado, relacionando este mecanismo como un efecto más del proceso de neuroprotección (Fester y Rune, 2015). De igual manera, existen estudios que asocian a prolactina con una mejoría en procesos cognitivos y de memoria espacial, teniendo un mejor desempeño en pruebas de laberinto aquellos individuos en estado de lactancia (Love *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2016); sin embargo hay también resultados que contradicen esto al demostrar que altos niveles de prolactina pueden provocar bajo desempeño cognitivo (Henry y Sherwin, 2012; Castanho *et al.*, 2014).

En un estudio reciente, se analizó el transcriptoma de hipocampos de ratas ovariectomizadas tratados con prolactina por vía exógena. Este estudio mostró cambios en la expresión de 162 genes involucrados en múltiples procesos biológicos, celulares, moleculares y de manera interesante el 37.65 % de los genes que presentaron diferencias de expresión están relacionados con 32 procesos cerebrales, tales como son axogénesis, migración neuronal y de glía, diferenciación celular y apoptosis, entre otros (Cabrera-Reyes *et al.*, 2019). Este cambio en la producción de transcritos inducidos por prolactina pueden sugerir a su vez un cambio en la dinámica nuclear y nucleolar de la célula, ya que se ha visto en varias ocasiones que la adición de diversas hormonas pueden alterar la dinámica transcripcional celular y, por tanto, una modificación en el número de nucléolos y tamaño nuclear (O'Malley y Means, 1974; Tung, Dorrington y Fritz, 1975; Kalinin *et al.*, 2018). Es importante mencionar que este cambio y dinámica no se espera únicamente en la población de neuronas piramidales y granulares del hipocampo, sino también para toda la población de glía que se encuentra en la región. Entre los transcritos cuyo número aumentó de forma significativa, se pueden encontrar aquellos relacionados con la mielinización de los axones y la producción de elementos de matriz extracelular (Col1a2), por lo que se puede sugerir que elementos gliales son también afectados por prolactina siendo promovidos o inactivados (Cabrera-Reyes *et al.*, 2019).

La glía cumple varias funciones, como pueden ser la mielinización de axones o la formación de la barrera hematoencefálica; promoviendo de esta manera el buen mantenimiento de la homeostasis en el sistema (York, Bernier y MacVicar, 2017).

Debido a su importancia a nivel regulatorio en el sistema nervioso central, se ha sugerido y estudiado que una disrupción en su funcionamiento puede llevar a diversos daños en el mismo; por lo que los mecanismos implicados en diversas enfermedades y su implicación con la glía han brindado interés en años recientes. Entre las células cuyo estudio se ha visto incrementado bajo esta perspectiva ha sido la microglía. Esta estirpe celular, a diferencia del resto de células encontradas en el sistema nervioso central, se caracteriza por tener un origen embrionario de tipo mesodérmico, que difiere del resto de las células en esta región que tienen un origen embrionario de tipo ectodérmico (Saijo y Glass, 2011). Esta diferencia les brinda características y marcadores celulares específicos, tales como: TMEM119, CD11b/c o Iba1; fungiendo entonces un papel de macrófago residente del tejido (Tremblay y Sierra, 2014). En años recientes, sin embargo, se han descrito más funciones para la microglía, como la modulación de la actividad neuronal por medio de la producción y recepción de moléculas que funcionan como neurotransmisores o activadores celulares (por ejemplo, glutamato o ATP), como un elemento clave para el desarrollo temprano del sistema nervioso central al promover un mecanismo de 'recorte sináptico' el cual permite un buen funcionamiento del sistema nervioso en años posteriores (York, Bernier y MacVicar, 2017).

Durante etapas tempranas del desarrollo las células progenitoras de la microglía se separan del cuerpo embrionario, con el fin de reintegrarse nuevamente a este en etapas avanzadas y así poder diferenciarse a este tipo celular (Saijo y Glass, 2011). Una vez ahí, permanecen en un constante estado de quiescencia siempre y cuando las condiciones microambientales lo permitan. Este estado de 'inactividad' se da principalmente por factores endógenos a las células, excretados por las neuronas y otras células residentes como astrocitos (Subramaniam y Federoff, 2017). Es importante mencionar que en el estado quiescente, la microglía no se encuentra en pausa total; debido a que se ha reportado que dichas células se encuentran vigilando de forma constante sus alrededores, evaluado por medio sus receptores de superficie (Savage, Carrier y Tremblay, 2019). Entre los diferentes estímulos que promueven este estado tenemos como ejemplo a las quimiocinas CX<sub>3</sub>CL1 que al unirse con su receptor (CX<sub>3</sub>CR1) ubicado en la

membrana celular de la microglía promueven un estado de inactividad celular (Tremblay y Sierra, 2014). Otras moléculas que contribuyen a este estado se encuentran en el soma de neuronas y otros tipos celulares, como son los marcadores protéticos CD200 y CD22 que interactúan con la membrana celular de la microglía (célula-célula). Además, dentro de la microglía se expresan niveles elevados de microRNA-124, el cual reduce la producción de marcadores típicos de un estado activado como son CD46, CD11b/c y el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) (Kierdorf y Prinz, 2013).

Ante un estímulo la microglía pasa a un estado de 'actividad', en el cual producirá y expresará diferentes citosinas, proteínas y quimosinas de acuerdo con lo que se requiera en la situación. De forma clásica se puede clasificar la activación de la microglía en dos tipos diferentes dependiendo de los mecanismos que ejercen sobre el tejido, presentando en ambos tipos de activación una morfología similar con un aspecto de tipo ameboide que parece haber perdido las largas prolongaciones que caracterizaban a su estado en quiescencia. La primera clasificación se caracteriza por ser de tipo proinflamatorio y se denomina como un estado polarizado de tipo M1 (Subramaniam y Federoff, 2017). En ese estado las células cuentan con una producción principal de citocinas que promueven la inflamación del tejido como son IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ; en conjunto con marcadores que permiten una adecuada comunicación con células del sistema inmune como CD86 y MHC-II; además de enzimas metabólicas que permiten la producción de otros compuestos que incrementan la reacción como la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Gaikwad y Heneka, 2013). A esta activación se le considera, entonces, como una respuesta o barrera inmediata ante alguna amenaza que pueda presentarse en el SNC, ya que se ha visto que se puede inducir empleando moléculas asociadas a microorganismos (MAMPS) como lipopolisacáridos (LPS) que puedan activar los receptores de tipo TLR4 en la superficie de la microglía, produciendo por tanto una respuesta de tipo inmune innata que lleva al reclutamiento de más elementos por medio de la producción y secreción de los elementos mencionados con anterioridad (Liu *et al.*, 2019). Este tipo de respuesta,

la M1, suele fomentar un mecanismo de defensa de emergencia, llevando generalmente a la célula a una vía apoptótica.

El segundo tipo de polarización que se puede dar al activarse las células de la microglía es denominado como M2, de tipo antiinflamatorio. Este se adquiere cuando existe un ambiente de citocinas como son IL-4, IL-10 e IL-13 en el medio, obteniendo en respuesta por parte de la célula un aumento en la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ , marcadores de membrana como el receptor a manosa CD206, proteínas y enzimas que benefician la reparación y protección celular y de la matriz extracelular como Ym1 y Arginasa 1 (Cherry, Olschowka y O'Banion, 2014). Se sabe, sin embargo, que existe más de un tipo de activación de tipo M2 en las células, clasificándose entonces como M2a, M2b y M2c. El tipo que se obtendrá dependerá de los estímulos obtenidos por la célula; por ejemplo, el tipo M2a que es el más estudiado se activa en presencia de IL-4 e IL-13 y adquiere funciones de fagocitos y reparación celular, mientras que el tipo M2b se puede activar gracias a la unión de inmunoglobulinas IgG a la membrana y se asocian sus funciones al reclutamiento de células T-Reg (Subramaniam y Federoff, 2017). Pese a esto, a esta activación se le considera como un mecanismo destinado a proteger a la célula, asociado entonces como un mecanismo en la neuroprotección del SNC. Es importante destacar, que las dos polarizaciones principales (sean M1 y M2) no son formas definitivas, ya que estas pueden pasar nuevamente a una forma quiescente o alternar a la otra de acuerdo con como el organismo lo vaya requiriendo.

En mecanismos asociados con neuroprotección y daño neuronal se ha estudiado a la microglía en diferentes casos. Se sabe, en primera instancia, que la microglía es activada cuando hay un daño y que se ve implicada por la acción de los diferentes mecanismos mencionados anteriormente, principalmente con la polarización de tipo M2 (Masuch *et al.*, 2016). Estudios con adición de estrógenos como agente neuroprotector han demostrado que estos no poseen un efecto de activación en la microglía por sí sola. Sin embargo, en presencia de una inducción o estímulo de daño puede provocar que las células pasen a un estado polarizado M2 (Benedek *et al.*, 2016; Thakkar *et al.*, 2018). Por otro lado, mediante diversas

pruebas tanto *in vivo* como *in vitro* se ha comprobado que la prolactina en microglía actúa promoviendo la proliferación celular y la diferenciación a células maduras junto con el aumento de viabilidad en condiciones de hipoxia e isquemia (T. A.E. Mödersheim *et al.*, 2007; Anagnostou, Reyes-Mendoza y Morales, 2018).

Existen diversos estudios que demuestran la función de la prolactina en la estructura y función celular en tejidos como el glandular mamario y en la glándula hipofisiaria. En el primero se sabe que promueve la proliferación celular, la hipertrofia glandular y la secreción de proteínas durante la producción de la leche y en el segundo también promueve la proliferación de lactotrofos; durante el ciclo estral regulando el recambio celular y también participa en los grandes cambios celulares durante la gestación y la lactancia, en donde se requiere una gran síntesis de prolactina. Existen un gran número de reportes que describen estos fenómenos de manera muy detallada, sin embargo, en el sistema nervioso central este tipo de estudios son muy escasos y todavía representan un área abierta de estudio (Freeman *et al.*, 2000; Ferraris *et al.*, 2012; Weaver y Hernandez, 2016).

## Objetivo general

Determinar el efecto de prolactina sobre el fenotipo y función celular en el hipocampo de ratas hembra ovariectomizadas a las 24 h post-tratamiento.

## Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de prolactina en la morfología de neuronas hipocampales.
2. Identificar los cambios en la estructura celular y nuclear de las neuronas hipocampales.
3. Evaluar el efecto de prolactina sobre la microglía de hipocampos de ratas ovariectomizadas.

## Metodología

### 1. Animales experimentales

Ratas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) fueron mantenidas en el Bioterio del conjunto "E" de la Facultad de Química. Los animales fueron mantenidos bajo lo estipulado en la norma "Especificaciones, técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (NOM-062-ZOO-1999), con periodos de luz y oscuridad de 12 h cada uno, disponibilidad de alimento y agua *ad libitum*, temperatura regulada entre 18 - 26 °C y humedad relativa de entre 40 - 70 %. El trato y manipulación de los animales fue realizado bajo lo establecido en la norma antes indicada, minimizando el número de animales utilizados y el sufrimiento de estos.

#### 1.1. Procedimiento quirúrgico para la ovariectomía

Se ovariectomizó a los animales de estudio por medio de un proceso quirúrgico en el cual se aplicó anestesia general por vía intraperitoneal, Xilacina (dosis de 8 mg/kg, PROCIN PISA ® AGROPECUARIA) y Ketamina (dosis de 70 mg/kg, ANESKET PISA ® AGROPECUARIA) de acuerdo al peso del individuo. Las cirugías se realizaron en condiciones asépticas, usando material estéril y nuevo para cada individuo. Posterior a la intervención quirúrgica los individuos fueron mantenidos en observación y cuidados durante un periodo de 21 días naturales.

#### 1.2. Tratamientos

Se eligieron aleatoriamente a los individuos para formar cuatro grupos de tratamiento con una n = 4, realizando la aplicación de tratamientos estipulados en la tabla 1. La dosis de prolactina ovina (Sigma-Aldrich ®, L6520) se administró vía intraperitoneal una dosis única y se utilizó como vehículo solución salina estéril al 0.9 %. Los grupos en los que se dividieron a los individuos se hicieron con base en los procesamientos de los tejidos obtenidos dadas las técnicas necesarias para cada uno.

*Tabla 1. Tratamientos, dosis y vías de administración*

<i>Grupo</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Vía de administración</i>	<i>Dosis</i>
1 y 2	<i>Solución salina (Vehículo)</i>	<i>Intraperitoneal</i>	<i>100 µl</i>
3 y 4	<i>Prolactina (PRL)</i>	<i>Intraperitoneal</i>	<i>500 µg/kg</i>

### 1.3. Perfusiones cardiacas

Pasado un periodo de 24 h posteriores al tratamiento, los animales fueron sacrificados llevando a cabo una perfusión cardiaca; para lo cual cada uno fue anestesiado por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico a una dosis de 0.1 ml de 15 mg/ml (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO). Una vez anestesiados y montado el sistema de perfusión para cada individuo se usaron 250 ml de un amortiguador de fosfatos (PBS, 0.1 M con pH 7.4) con el fin de limpiar el torrente sanguíneo; pasando después 250 ml de paraformaldehido al 4 % (PFA, pH 9.5) para poder fijar el tejido. A partir de esta perfusión se extrajo el cerebro de cada uno de los individuos, almacenándolos a una temperatura de 4 °C para su posterior procesamiento.

### 1.4. Procesamiento de tejidos

Los tejidos fueron procesados de forma diferente de acuerdo con los cortes requeridos para su análisis; los pasos realizados para cada uno se pueden encontrar descritos en la Tabla 2.

Aquellos encontrados en los grupos 1 y 3 permanecieron 48 h en la solución de PFA 4 %. Posteriormente, los tejidos pasaron por un proceso de deshidratación con un gradiente de sacarosa que duró un total de 96 h, tras el cual fueron congelados con isopentano previamente enfriado con hielo seco (a una temperatura de -78.5 °C) y almacenados a una temperatura de -20 °C. Seguido de esto fueron cortados con un criostato a un grosor de 30 µm por corte y almacenados en una solución crio preservativa para luego llevar a cabo una técnica de inmunohistoquímica por flotación.

Por otra parte, los tejidos de los grupos 2 y 4 fueron incluidos en parafina. Para esto pasaron por un tren de deshidratación compuesto de etanoles en un gradiente de concentración ascendente, hasta llegar a xilol y finalmente fueron incluidos en parafina. Los bloques obtenidos fueron cortados en microtomo para obtener un grosor de 3 a 5 µm por corte; siendo montados en portaobjetos previamente recubiertos con Poly-L Lisina al 0.1 % para su posterior tinción.

*Tabla 2. Pasos seguidos para el procesamiento de los tejidos de acuerdo con el grosor de corte necesitado.*

Procesamiento Grupos 1 y 3	Procesamiento Grupos 2 y 4
1. PFA 4 % por 48 h	1. PFA 4 % por 24 h
2. Sacarosa 20 % por 48 h	2. Inclusión en formol por 1 h
3. Sacarosa 30 % por 48 h	3. Lavado en etanol al 70 % por 1 h
4. Congelación en isopentano a una temperatura de -78.5 °C	4. Dos lavados en etanol al 96 % de 1 h cada uno
5. Cortes en criostato de 30 µm	5. Tres lavados en etanol al 100 % de 1 h cada uno
	6. Dos inclusiones en xilol de una 1 h cada una
	7. Pre-inclusión en parafina por 1.5 h
	8. Cambio de parafina, pre-inclusión por 1.5 h
	9. Inclusión en parafina (bloques)
	10. Corte en microtomo de 3 a 5 µm

## 2. Análisis estructural

Con el fin de poder evaluar un posible cambio a nivel histológico en el tejido se realizaron tinciones histológicas con Hematoxilina-Eosina y Azul de Toluidina (tinción de Karel Smetana), además de realizar una tinción con DAPI con el objetivo de evaluar un posible cambio en la distancia de los núcleos de las diversas regiones del hipocampo.

### 2.1. Desparafinación y rehidratación de tejidos

Para poder realizar las tinciones requeridas para el análisis se retiró la parafina encontrada en las laminillas y los cortes. Se dejaron incubar a una temperatura de 60 °C por 45 min, tras los cuales fueron inmediatamente sumergidas en Xilol puro por un tiempo de 10 min. Pasado este periodo, las muestras se rehidrataron mediante un tren de rehidratación compuesto por un lavado de 30 s en xilol puro, seguido por dos lavados de 30 s cada uno en etanol al 100 % y finalmente dos lavados de 30 s cada uno en etanol al 96 %. Finalmente, las muestras fueron enjuagadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente para su posterior tinción.

### 2.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina (HE)

Las muestras de entre 3 y 5 µm se tiñeron con una tinción clásica de Hematoxilina de Harris y Eosina. Las laminillas fueron sumergidas en hematoxilina de Harris (solución de Alumbre de Potasio en agua destilada, 10 %) por 10 min, tras lo cuales

fueron lavadas durante 5 min con agua destilada. A continuación, las muestras fueron diferenciadas con alcohol ácido 1 % (Ácido clorhídrico en etanol al 70 %) y viradas con una solución de carbonato de litio al 1 % (Carbonato de litio en agua destilada). Posteriormente, las muestras se tiñeron por 5 min con Eosina, tras lo cual fueron deshidratadas con etanol en concentración ascendente y aclaradas con xilol puro. Se montaron con resina Entelan (Sigma Aldrich ®, 107961) y se dejaron secar por 24 h a temperatura ambiente.

### 2.3. Tinción con Azul de Toluidina

Con el fin de observar RNA se realizó una tinción con Azul de Toluidina a pH 4.9 (Smetana y Busch, 1966). Las muestras de entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  se incluyeron por 30 min con el colorante, el cual fue retirado posteriormente por medio de la agitación mecánica de las laminillas para finalmente montarlas con resina Entelan (Sigma Aldrich ®, 107961); dejándolas secar por 24 h a temperatura ambiente.

### 2.4. Tinción con DAPI

Usando un compuesto de DAPI (Sigma-Aldrich ®, 329748990) se llevó a cabo una tinción con muestras de entre 3 y 5  $\mu\text{m}$ . El reactivo fue diluido en una relación 1:10000, colocando 40  $\mu\text{l}$  por tejido en cada laminilla. Se procedió a dejar incubar por un tiempo de 4 min, retirando el compuesto por medio de dos lavados de 10 min con PBS a pH.7. Las muestras fueron montadas con una resina para fluorescencia VECTASHIELD (Vector Laboratories ®, h-1000) y almacenadas en oscuridad a una temperatura de 4 °C.

### 2.5. Captura de Imágenes

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio óptico (Nikon E-800) con un objetivo 20X usando el programa NIS Elements (Nikon), enfocándose en las regiones del hipocampo CA1, CA3, CA4 y giro dentado para cada una de las tinciones. Todas las imágenes fueron adquiridas usando las mismas condiciones de apertura y ganancia de la cámara con el fin de tener reproducibilidad.

### 2.6. Análisis Cuantitativo (Nucléolos)

A partir de las imágenes obtenidas de la tinción de Azul de Toluidina se evaluó el número de nucléolos presentes en las células de los distintos campos de acuerdo con el tratamiento de los sujetos de estudio. Para esto, con ayuda del programa de

uso libre ImageJ (ImageJ ® 1.52a, National Institute of health, EUA), se escogieron en cada una de las fotos obtenidas tres recuadros de 80 x 80 µm, de forma que estos se encontraran en los extremos y en el centro de los campos evaluados. En cada uno de los recuadros se contó de forma manual los nucléolos encontradas en las células, los cuales destacaron gracias a la tinción utilizada. Una vez obtenidos los datos se analizaron y graficaron con un ANOVA de dos vías en el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software ®, Inc., La Jolla, CA, EUA).

### 2.7. Análisis Cualitativo (Núcleos)

Con las imágenes obtenidas de la tinción con DAPI se contabilizó la cantidad total de núcleos encontrados en la lámina neuronal encontrada en CA1, CA3, CA4 y el giro dentado, el área de estos y la separación existente entre ellos; evaluando cada uno de los campos de los distintos individuos de los tratamientos administrados. Para realizar dichos conteos se utilizó el programa de uso libre ImageJ, realizando un análisis general de las imágenes para el recuento nuclear y una selección específica para la toma de medias del área y las distancias entre núcleos. Para el análisis posterior de los datos se llevó a cabo un ANOVA de dos vías para cada uno de los parámetros en el programa de análisis GraphPad Prism 7.

### 3. Análisis de activación de microglía

Con cortes de 30 µm se llevaron a cabo inmunohistoquímicas con el fin de poder analizar la actividad de la microglía ante un estímulo aportado por prolactina.

### 3.1. Inmunohistoquímica por flotación

Los cortes fueron retirados de la solución criopreservadora y fueron lavados tres veces en periodos de 10 min con PBS 1X, para después permanecer durante 10 min en una solución de bromohidruro de sodio al 1 % en PBS 1X. Se utilizó el bromohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) de forma previa a la aplicación de los anticuerpos con el fin de reducir la fluorescencia del fondo de la muestra cuando fuera evaluada. (Clancy y Cauller, 1998). Los tejidos fueron nuevamente lavados tres veces por 10 min con PBS 1X y después inmersos en Tritón X-100 al 1 % por 30 min. Se repitió el proceso de lavado previamente descrito usando PBS 1X, seguido por la inmersión de los tejidos en solución de bloqueo por 1 h ( $\text{H}_2\text{O}$  1 %, Suero Normal de Cabra 2 %, Albúmina (BSA) 5 %, Tritón X-100 0.1 %, Tween-20 0.05 % en PBS 1X). Una vez retirados de la solución de bloqueo, los tejidos fueron incubados por 12 h en el anticuerpo primario, el cual fue Ab-1211 OX-42 (CD11b/c) producido en ratón, en una dilución 1:500. Después de las 12 h se dejaron incubar nuevamente a los tejidos por 1 h en oscuridad con el anticuerpo secundario (Ab Anti-Mouse biotinilado), diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Se llevaron a cabo tres lavados de 10 min con PBST 0.1 % (PBS 1X con Tween-20), dejando incubar con el complejo AB (Avidina Biotina) por 30 min y lavando nuevamente con PBST 0.1 % durante 10 min. De forma posterior, se revelaron los tejidos con diaminobencidina (DAB), para terminar con una tinción de Nissl con el fin de contrastar estructuras nucleares de neuronas y poder ubicar los campos con mayor facilidad. Finalmente, las laminillas fueron montadas con resina DPX y se dejaron secar.

### 3.2. Captura de Imágenes de tinciones de H.E., Azul de Toluidina y DAPI por 24 h.

Con el programa MicroFIRE<sup>®</sup> fueron tomadas imágenes de las regiones del hipocampo CA1, CA3, CA4 y giro dentado en ambos hemisferios cerebrales con un objetivo 20X. Todas las imágenes fueron adquiridas usando las mismas condiciones de apertura y ganancia de la cámara con el fin de tener reproducibilidad. Se tomaron en total 96 imágenes, que correspondían a 4 animales tratados con solución salina y a otros 4 tratados con prolactina a las 24 h post-tratamiento.

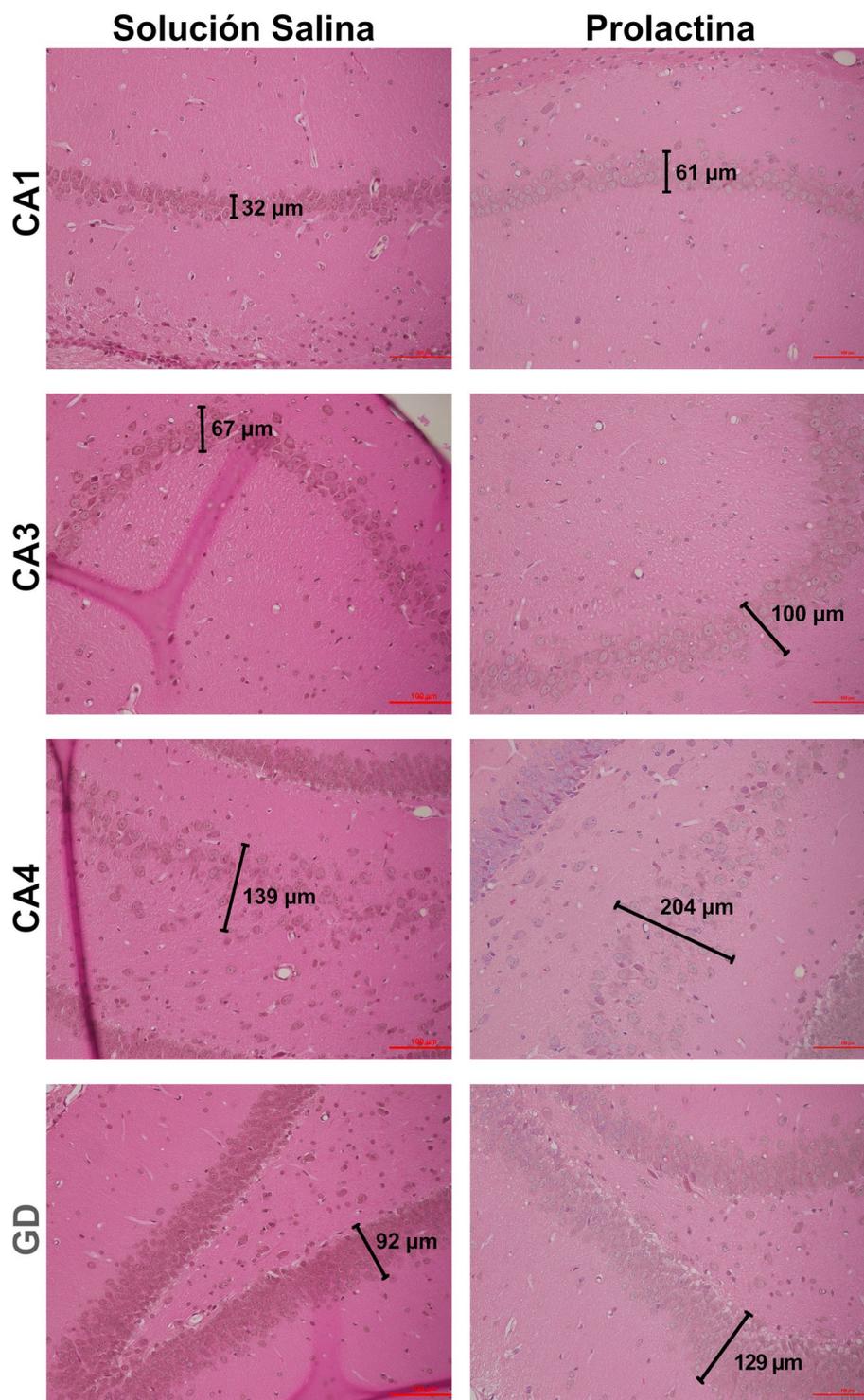
### 3.3. Análisis de imágenes y obtención de resultados

Las imágenes fueron evaluadas con el software libre ImageJ (ImageJ ® 1.52a, National Institute of health, EUA) con el fin de obtener valores correspondientes a la intensidad de expresión de la microglía; interpretando a un mayor valor una mayor intensidad de la marca y, por tanto, una activación más elevada. Los datos de ambos grupos fueron posteriormente evaluados con el programa estadístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software ®, Inc., La Jolla, CA, EUA) con el que se llevó a cabo un ANOVA de dos vías con el fin de comparar cada una de las áreas capturadas y los dos grupos experimentales. Finalmente, con el mismo programa se graficó los resultados obtenidos.

## Resultados

### Análisis estructural

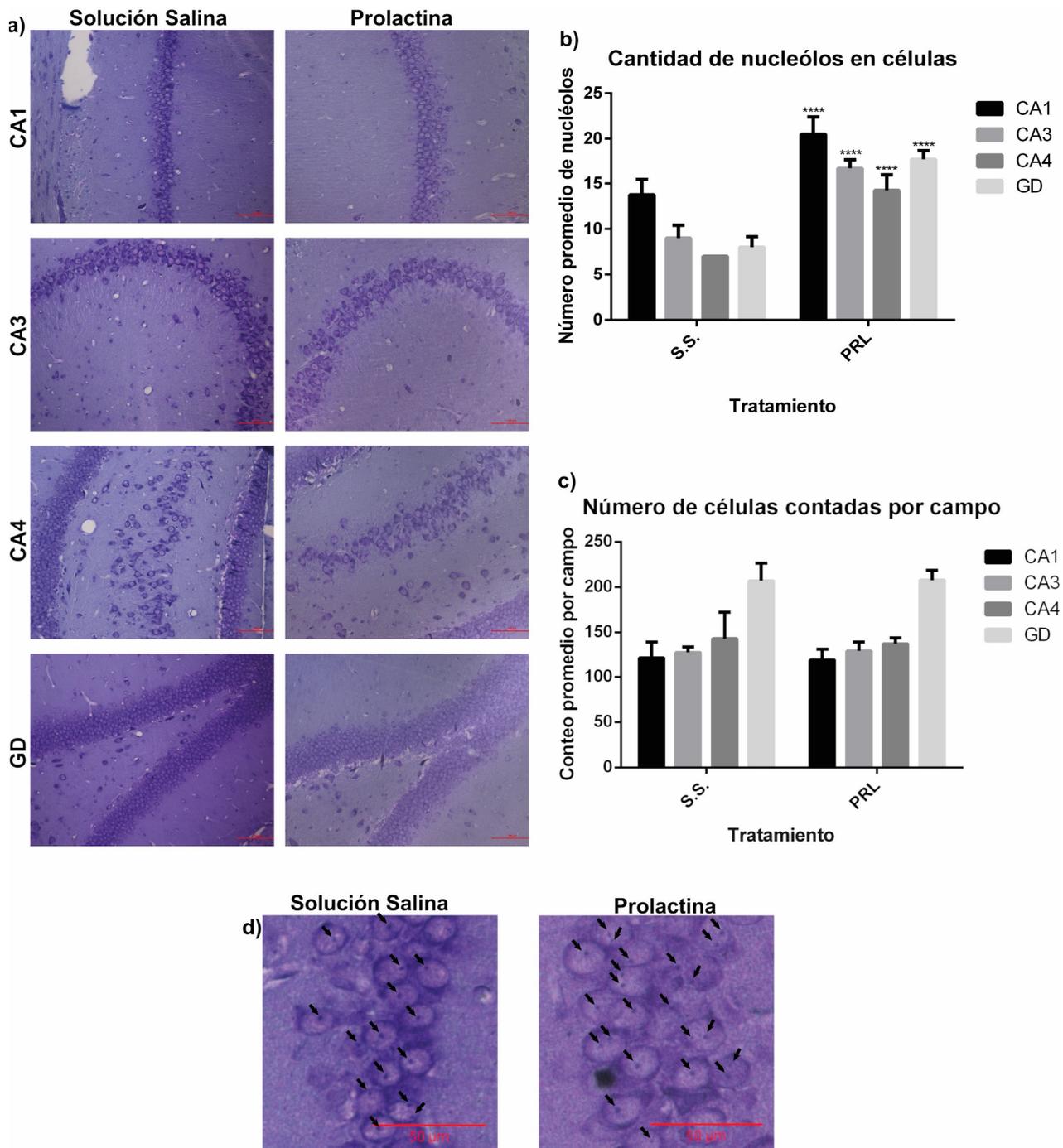
Con el fin de obtener una imagen general de la estructura hipocampal bajo los tratamientos se llevó a cabo una tinción de Hematoxilina-Eosina (Figura 1). En estas tinciones se observó la estructura de los estratos de neuronas piramidales y granulares de ambas secciones del hipocampo (*Cornu Ammonis* y giro dentado), en la que se puede observar un mayor grosor del estrato neuronal en los tejidos obtenidos de los individuos tratados con prolactina en dosis de 500 µg/kg en comparación a los tratados con solución salina. Existe una mayor dispersión de las células de la lámina neuronal en aquellos individuos tratados con prolactina en comparación a los sujetos control; teniendo como resultado que existe un mayor grosor en la apariencia y tamaño de la lámina (Figura 1). Con el fin de confirmar estas observaciones y confirmar dichas diferencias debido al tratamiento con prolactina, se llevó a cabo el análisis de las tinciones con azul de toluidina (Figura 2a) y con DAPI (Figura 3a), buscando discernir en primer lugar el cambio de actividad transcripcional de las células con base en un posible cambio de conteo nucleolar y nuclear (Figura 2) y, posteriormente, el cambio de la disposición de la lámina al medir el área de los núcleos neuronales y la separación entre estos (Figura 3).



**Figura 1. Prolactina modifica del estrato neuronal del hipocampo a tiempos cortos.** Se muestran los campos de CA1, CA3, CA4 y giro dentado (GD) bajo los tratamientos. Las barras negras representan la distancia entre la primera y la última célula de la lámina neuronal en cada región, expresando la medida de dicha distancia en  $\mu\text{m}$ . La barra de escala representa una distancia de  $100 \mu\text{m}$ .

S.S.: Individuos tratados con  $100 \mu\text{l}$  de solución salina estéril. PRL: Individuos tratados con una dosis de prolactina de  $500 \mu\text{g/kg}$

En el conteo nucleolar elaborado en las tinciones de azul de toluidina (Figura 2a) se encontró un mayor número de cuerpos nucleolares en las células de individuos sometidos a tratamiento de prolactina en comparación con aquellos con solución salina (Figura 2b). El aumento más notorio en el conteo se dio en las áreas de CA4 y del giro dentado, en donde el conteo nuclear promedio por campo se vio duplicado en las imágenes de los tejidos obtenidos de los individuos tratados con prolactina 500 como se muestra en la figura 2a,b. Se contabilizó un mayor número de nucléolos por núcleo celular en las imágenes obtenidas del tratamiento con prolactina, como se encuentra ilustrado por medio de flechas en la figura 2d. Con el fin de determinar si este conteo se debió a un aumento en la transcripción nucleolar en vez de un aumento en el número de células por campo se evaluó el número de núcleos encontrados por foto, mostrando en la figura 2c que no existen diferencias significativas en el número de células presentes en ambos tratamientos y descartando por lo tanto la posibilidad de un conteo mayor debido a un mayor número de células en el tejido.



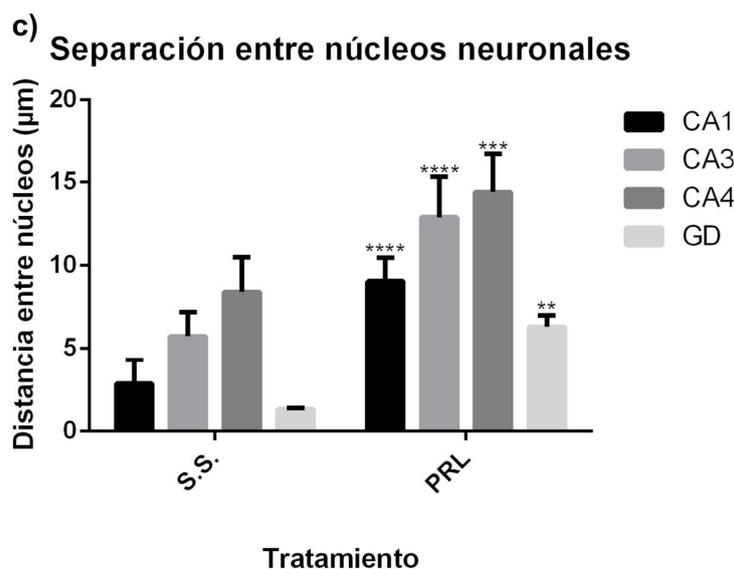
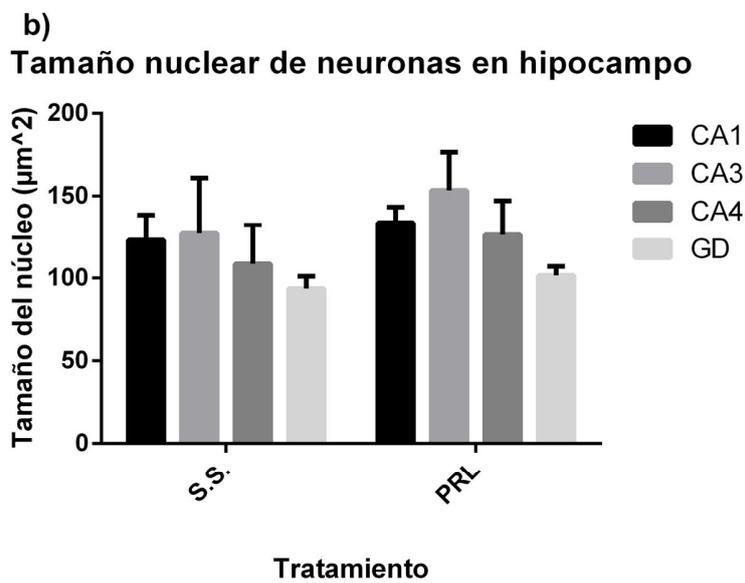
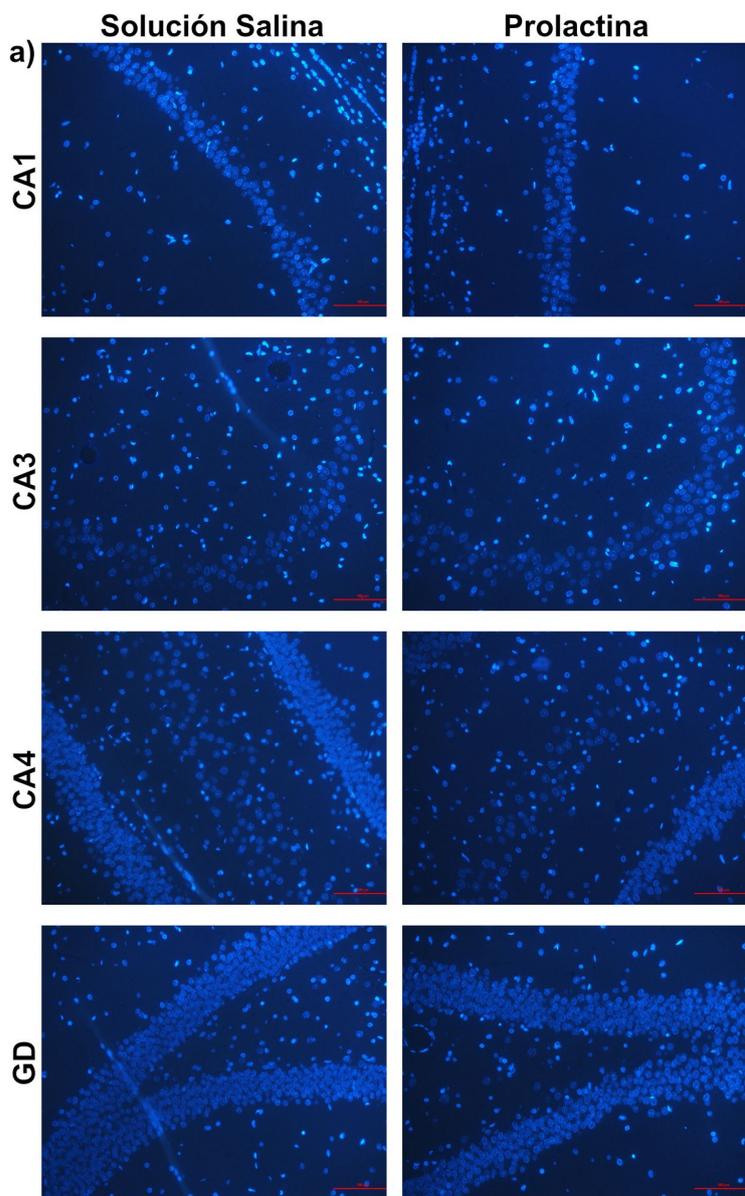
**Figura 2.** Prolactina incrementa el número de nucleólos en células del estrato neuronal del hipocampo medial de *Rattus norvegicus*. **a)** Tinción de Azul de Toluidina en hipocampo medial de *Rattus norvegicus*. Se muestran los campos de CA1, CA3, CA4 y giro dentado (GD) bajo los tratamientos. La barra de escala representa una distancia de 100 µm.

**b)** Promedio de conteo de nucleólos visibles por campo respecto al tratamiento. **c)** Número de células en la lámina neuronal por campo. **d)** Nucleólos encontrados en células de la lámina neuronal de CA1 en ambos tratamientos.

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías \*\*\*\* $p < 0.0001$

S.S.: Individuos tratados con 100 µl de solución salina estéril. PRL: Individuos tratados con una dosis de prolactina de 500 µg/kg

Por otra parte, la evaluación del área ocupada por los núcleos y la separación entre éstos se llevó a cabo en el estrato neuronal en las imágenes obtenidas con la tinción de DAPI (Figura 3a). No se presentó un aumento en el tamaño nuclear de las células al no encontrar diferencias estadísticamente significativas en el área de los núcleos neuronales presentes en tejidos de individuos tratados con prolactina y los encontrados en los tejidos tratados con solución salina, como se muestra en la figura 3b. Por otro lado, al analizar la separación existente entre dichos núcleos, se encontró una mayor separación de los núcleos de las neuronas de la lámina neuronal en los tejidos de los individuos tratados con prolactina en comparación con el grupo control (Figura 3c). Esta diferencia en la separación de los núcleos se puede encontrar en todas las regiones analizadas, sin embargo, es en la región del giro dentado en donde se encontró una mayor diferencia al tener una distancia promedio de 1  $\mu\text{m}$  en los individuos tratados con solución salina y una distancia promedio de 7  $\mu\text{m}$  en los individuos tratados con prolactina, indicando cambios en la lámina neuronal del hipocampo (Figura 3c).



**Figura 3. Incremento en la distancia entre los núcleos de las células del estrato neuronal del hipocampo medial de *Rattus norvegicus* dado por prolactina** a) Tinción de DAPI en hipocampo medial de *Rattus norvegicus*. Se muestran los campos de CA1, CA3, CA4 y giro dentado (GD) bajo los tratamientos. La barra de escala representa una distancia de 100 µm. b) Promedio del valor del área de los núcleos de células encontradas en el estrato neuronal del hipocampo bajo los tratamientos. c) Promedio del valor de la distancia entre núcleos de células encontradas en la lámina neuronal del hipocampo bajo los tratamientos.

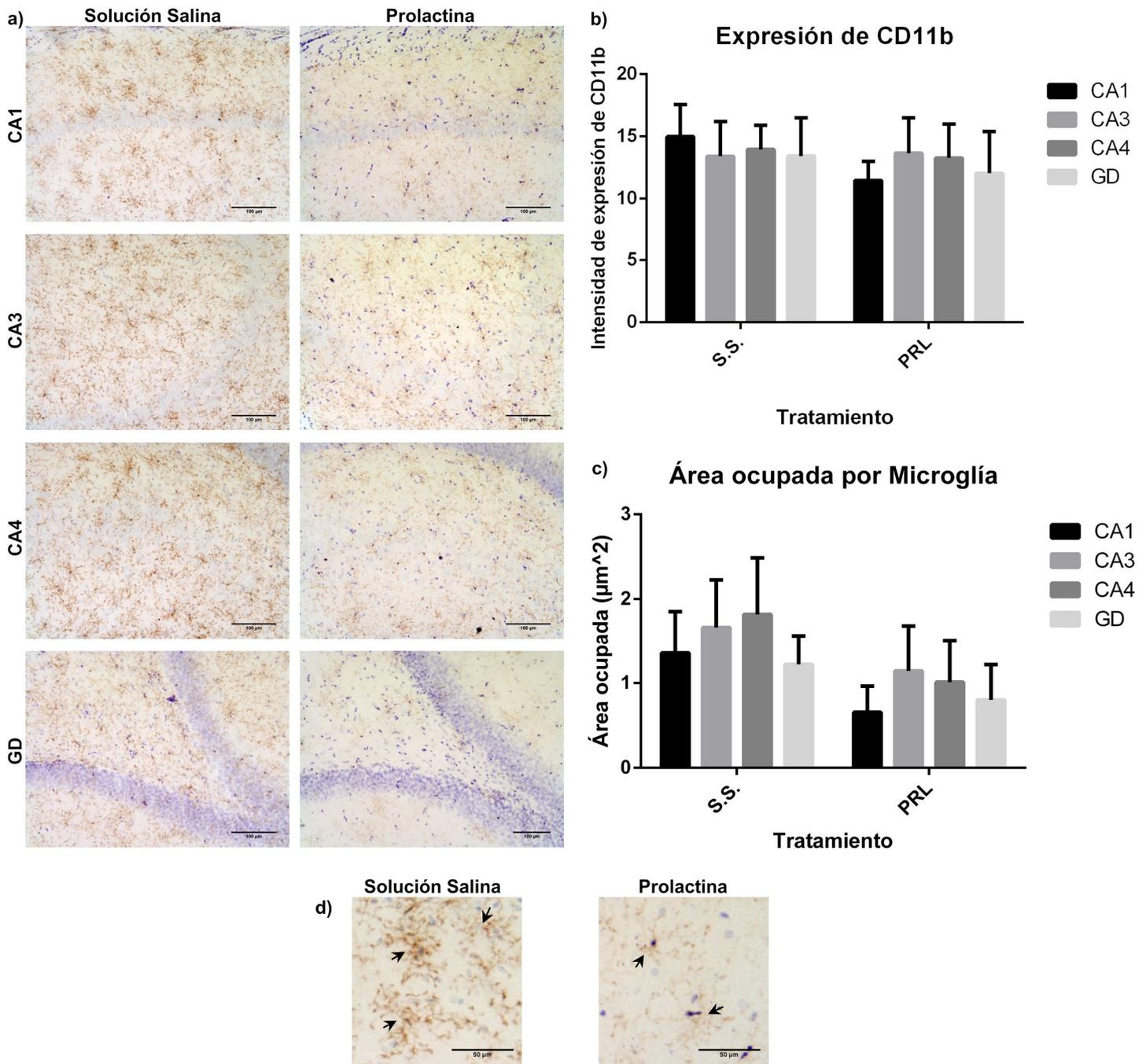
Análisis de los datos realizado mediante ANOVA de dos vías \*\*\*\*p<0.0001, \*\*\*p=0.0001, \*\*p=0.0012

S.S.: Individuos tratados con 100 µl de solución salina estéril. PRL: Individuos tratados con una dosis de prolactina de 500 µg/kg.

## Análisis de Microglía

Para el análisis del cambio en la microglía se realizaron inmunohistoquímicas usando el marcador de superficie CD11b/c para así facilitar la identificación y análisis de la microglía dentro de la región del hipocampo (Figura 4). Las imágenes obtenidas de este tratamiento presentan una coloración café dada por el proceso de oxidación que sufre la DAB tras el tratamiento, obteniendo una mayor presencia de la marca en los tejidos de los individuos tratados con solución salina en comparación a la obtenida en los individuos tratados con prolactina 500 µg/kg (Figura 4a). Los cuerpos celulares, de igual manera, presentan diferencias notorias, teniendo un mayor grosor y tamaño tanto en el soma como en las proyecciones celulares en aquellos de los individuos tratados con solución salina en comparación a aquellos tratados con prolactina (Figura 4d).

Con el fin de analizar las diferencias existentes entre estas células en los dos tratamientos se evaluó el área total ocupada por las células de microglía en las regiones de CA1, CA3, CA4 y GD, además de llevarse a cabo una cuantificación de la intensidad de la marca dada por el marcador CD11b/c. Los resultados obtenidos para la intensidad, así como para la cobertura del área, no presentaron diferencias significativas como se muestra en la figura 4b,c. La expresión de la intensidad de la marca de CD11b/c, por un lado, se encontró con medidas similares en los diferentes campos, presentando una menor intensidad en los campos de CA1 y GD de los tratamientos de prolactina 500 µg/kg de aproximadamente 2 unidades (Figura 4b). El área ocupada por la microglía, por el otro lado, presentó una ligera reducción en todos los campos bajo el tratamiento de prolactina 500, presentando valores promedio menores a los encontrados en los cuantificados en el vehículo (Figura 4c).



**Figura 4.** Cambio de apariencia y tamaño de microglía dado por la adición de prolactina en hipocampo medial de *Rattus norvegicus* **a)** Inmunohistoquímica para el marcador CD11b/c en los campos de CA1, CA3, CA4 y Giro Dentado (GD) bajo los tratamientos. La barra de escala representa una distancia de 100  $\mu\text{m}$ , **b)** Promedio de la expresión del marcador de microglía CD11b en diferentes campos del hipocampo media bajo los tratamientos. **c)** Promedio del área ocupada por la microglía en diferentes campos del hipocampo medial bajo los tratamientos **d)** Células de microglía en CA1. Las flechas indican una célula de microglía. La barra de escala representa una distancia de 50  $\mu\text{m}$ . Los datos fueron analizados mediante un estudio de ANOVA de dos vías. S.S.: Individuos tratados con 100  $\mu\text{l}$  de solución salina estéril. PRL: Individuos tratados con una dosis de prolactina de 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

## Discusión

Dentro de las imágenes y resultados obtenidos se pueden encontrar diferencias importantes a nivel morfológico en el hipocampo de animales tratados con prolactina, sugiriendo un cambio simultáneo al transcripcional encontrado en estudios anteriores (Cabrera-Reyes *et al.*, 2019). Se sabe por estudios previos que esta región en el cerebro puede cambiar morfológicamente a nivel celular ante la aplicación o ausencia de distintos estímulos, provocando, en la mayoría de los casos, la formación o recorte de espinas dendríticas que pueden alterar la morfología del acomodo neuronal (Ichikawa, 1965; Segal, 1983; Brusco *et al.*, 2008). Sin embargo, la mayoría de estos cambios se ha reportado que son generados a partir de haber existido un periodo largo de exposición al estímulo, tiempo suficiente para que este pueda ejercer acción sobre el tejido y promover diferentes características que pueden presentar una alta discrepancia con respecto al tejido en condiciones control (Woolley, Gould y Mcewen, 1990; Kinsley *et al.*, 2006). Dicho esto, es importante considerar que existen casos en los que las modificaciones se pueden dar en periodos cortos de tiempo, como es el caso del recorte de espinas dendríticas durante el ciclo estral al aumentar la progesterona tras la caída de los estrógenos, mecanismo que toma aproximadamente 12 h en llevarse a cabo (McEwen, 2010). Esto podría explicar los resultados de las micrografías teñidas con Hematoxilina-Eosina (Figura 1), donde se aprecia una clara diferencia entre los tejidos obtenidos de los diferentes tratamientos a pesar del corto periodo de tiempo al que las ratas fueron expuestas. Por otra parte, es evidente que estas dinámicas no se presentan únicamente en la población de neuronas; ya que pueden afectar a células de la glía como son los astrocitos o la microglía, repercutiendo en cómo se distribuyen en el espacio y los mecanismos que pueden efectuar (Viola *et al.*, 2009; Savage, Carrier y Tremblay, 2019). En el caso de la prolactina en el hipocampo se sabe que el estímulo dado por esta fomenta el incremento y decremento del mRNA de un gran número de genes que se encuentran involucrados en procesos como neurogénesis y proliferación (entre muchos más), ejerciendo un efecto significativo inclusive con solo tres horas de haber sido administrada (Cabrera-Reyes *et al.*, 2019). En todas las imágenes

obtenidas se perciben diferencias en la distribución espacial de las células que si bien no implican la formación y consolidación de nuevas espinas detriticas o comunicaciones neuronales sí podrían sugerir un sutil cambio morfológico en las células a partir del estímulo dado. Encontramos en todos los campos evaluados una aparente mayor dispersión celular con respecto a la lámina neuronal de los individuos control, lo que puede sugerir que se presentan células de mayor tamaño o inclusive un mayor número de estas en la estructura hipocampal. Además, dentro de los campos de CA4 y giro dentado es posible la detección mayor 'dispersión' de las células en comparación a los tejidos con solución salina, surgiendo un cambio no solo de las neuronas sino también de las fibras 'musgosas' que se proyectan en estas regiones e implicando, por tanto, un cambio en la disposición del espacio celular.

Lo que se observó en las muestras teñidas con Hematoxilina-Eosina sugiere y apoya el hecho de que la prolactina induce cambios estructurales a nivel del hipocampo, por lo cual la evaluación de parámetros que puedan describir a las células a nivel transcripcional y morfológico fueron modificados. Se sabe que el aumento de la actividad transcripcional provoca que las células presenten un n abundante número y tamaño de nucléolos, los cuales se relacionan con la biogénesis ribosomal y por tanto la producción de más maquinaria para este proceso (Hernandez-Verdun, 2006; Sirri *et al.*, 2008). Este mecanismo, sin embargo, no solo se ve cuando existe alta producción de mRNA dado un estímulo, sino también de forma previa a un proceso de división celular para garantizar el éxito de este proceso (Cooper, 2000; DiMario, 2004). En los datos obtenidos tras el análisis de conteo nucleolar (Figura 2) se encontró que después de 24 h aquellos individuos tratados con prolactina presentaron un mayor número de nucléolos promedio por cada uno de los campos analizados en comparación a aquellos individuos que solo recibieron un tratamiento de solución salina (Figura 2b). Esto se puede relacionar con el incremento en la tasa transcripcional reportada con anterioridad, implicando que el aumento de los nucléolos se encuentra estrechamente relacionado con el incremento de este proceso (Cabrera-Reyes *et al.*, 2019). Si bien existen en los datos reportados que la estimulación de genes

relacionado a neurogénesis aumenta con la implementación de prolactina, este mecanismo y efecto pasadas 24 h de la administración del tratamiento es descartado al existir un número igual de células en todos los campos en ambos tratamientos (Figura 2c). No se descarta la posible existencia de un proceso de neurogénesis de forma posterior a las 24 h en la zona del giro dentado, sin embargo este proceso debe de ser estudiado bajo un nuevo análisis experimental (Bridges y Grattan, 2003; Cabrera-Reyes *et al.*, 2017, 2019).

Se tienen, por otra parte, los resultados obtenidos tras la evaluación del área ocupada por núcleos y la distancia existente entre estos. Debido a la aparente diferencia en la distribución de las células en los tejidos de los individuos tratados con prolactina, como se describió en párrafos anteriores (Figura 1), se evaluaron estos dos parámetros (área ocupada por núcleos y distancia entre núcleos) con el propósito de discernir sobre sus posibles causas. Cabe destacar que las diferencias encontradas en la figura 1 podrían deberse a cambios en los núcleos, el soma celular o la matriz extracelular; por lo que la evaluación de los parámetros ya mencionados puede servir para determinar las causas de los cambios encontrados. En las diferentes especies animales y sus estirpes celulares existentes, el tamaño nuclear se encuentra bien definido; dado por el acomodamiento de la cromatina en este y su distribución en el interior de la célula (Vuković *et al.*, 2016). Sin embargo, este tamaño suele cambiar solo en ocasiones excepcionales, cuando se presenta alguna patología o trastorno que modifique la dinámica celular y de sus organelos (Edens *et al.*, 2013; Jevtić *et al.*, 2014). Como se mostró en los resultados, el tamaño nuclear de las células no cambió en ninguno de los campos observados bajo los dos tratamientos (Figura 3b); indicando que la adición de la hormona a las 24 h no provoca un cambio de morfología nuclear dentro de las células pese a los cambios transcripcionales existentes evidenciados con los resultados anteriores y los mencionados en la literatura (Cabrera-Reyes *et al.*, 2019). A pesar de esto se encontró un incremento en la distancia que separa a los núcleos de las células al ser tratadas con prolactina, encontrando un incremento de esta en todos los campos (Figura 3c). El aumento en la distancia que separa los núcleos puede sugerir dos posibles explicaciones, que están implicadas con el efecto del aumento

transcripcional por parte de la prolactina. En primer lugar, se podría sugerir un cambio en el volumen celular, siendo dado por un cambio en la dinámica celular y la presencia de organelos dentro de las células. Existen reportes que indican que bajo la presencia de algún estímulo las células tienden a incrementar el número de organelos como las mitocondrias y ribosomas, esto en respuesta a su necesidad energética y de producción proteica, por lo que esta posibilidad no se puede descartar (Kitami *et al.*, 2012; Marée, Grieneisen y Edelstein-Keshet, 2012; Sun *et al.*, 2020). Por otro lado, el aumento en las distancias nucleares puede también sugerir un cambio en la separación extracelular dado por el depósito y el comportamiento de la matriz extracelular. De acuerdo con lo reportado en la literatura, después del estímulo de prolactina existe un incremento importante en transcritos de genes relacionados con la matriz extracelular y su composición, como son diferentes colágenas (Col1a2, Col3a1, Col6a3), pudiendo repercutir directamente en como la matriz se encuentra en el tejido y los campos estudiados (Cabrera-Reyes *et al.*, 2019). Además, estas modificaciones a la matriz extracelular pueden repercutir de la misma manera en las células gliales, causando que pueda existir una modificación en su dinámica dentro del medio trayendo como consecuencia una modificación mayor en el microambiente (Walker *et al.*, 2019). Con el fin de determinar estas posibles relaciones al incremento de la separación celular es necesario un nuevo análisis experimental que permita evaluar estos distintos parámetros, ya sea el contenido del volumen celular o un cambio en la matriz.

La otra población celular analizada dentro del estudio fue la microglía, la cual es bien conocida por ser el estirpe celular encargado de llevar a cabo respuestas de tipo inmune dentro del sistema nervioso central, aunque también cumple con funciones vitales para la regulación y homeostasis del sistema (Garaschuk y Verkhratskiĭ, 2019). Su estudio en relación con prolactina es clave, principalmente debido a que el papel de la última mencionada como un agente neuroprotector ha sido punto de interés y partida para un gran número de estudios previos (T.A.E. Mödersheim *et al.*, 2007; Anagnostou, Reyes-Mendoza y Morales, 2018). Debido a esto, surgió el interés por ver el efecto de la hormona a nivel morfológico no solo

en la población neuronal, sino también sobre algún componente glial. Como es posible observar en el estudio (Figura 4), el tratamiento con prolactina a cortos plazo en ratas ovariectomizadas redujo la activación de la microglía, lo que puede estar relacionado con la inducción a un estado de reposo bajo el estímulo de prolactina (Figura 4a). De igual forma, se puede ver a las células de la microglía con prolongaciones más delgadas y largas en los tejidos de los individuos tratados con prolactina; una característica morfológica clásica de una célula de microglía en estado de reposo (Figura 4d). A pesar de esto, en los resultados del análisis estadístico no se demostró la existencia de diferencias significativas en relación al tamaño de la superficie abarcado por las células ni la intensidad dada por la marca; sugiriendo entonces que las diferencias del estado de la microglía bajo estos tratamientos son mínimas. Sin embargo, cabe mencionar que existe una tendencia a presentar un menor tamaño de las células en el grupo tratado con prolactina (Figura 4c), sugiriendo que estas se encuentren en un estado 'inactivado' en comparación a las otras. En estudios anteriores se ha reportado el efecto de otros compuestos neuroprotectores sobre estas células en la región del hipocampo, teniendo en el caso del estradiol un mecanismo de inactivación de la microglía al actuar por sí solo (Thakkar *et al.*, 2018). De manera contrastante, durante este mismo estudio se encontró que al adicionar estrógenos con un agente de daño la microglía presentaba un nivel de activación inclusive superior al que hubiese tenido si se tratase únicamente con el agente de daño; poseyendo una activación de tipo M2 (antiinflamatorio). En estudios recientes de 2019 se reportó que la prolactina en conjunto con un daño neuronal provocan la sobre activación de la microglía, con valores mucho más altos a aquellos presentados en el vehículo (Cabrera-Reyes *et al.*, 2019). Con base en los efectos que se vieron de prolactina sobre la microglía, y considerando los registros de estudios previos, sería interesante considerar el evaluar el tipo de activación sobre la microglía que puede tener esta hormona sobre la población celular ante un daño neuronal; con el fin de determinar los mecanismos y vías por los cuales lleva a cabo esta acción.

## Conclusiones

La prolactina modifica la estructura y funcionalidad neuronal en el hipocampo medial de *Rattus norvegicus* después de su administración a tiempos cortos sugiriendo un aumento transcripcional reflejado en un incremento en el número de nucléolos y un cambio en la disposición del tejido al aumentar la distancia entre células neuronales. De igual manera, esta hormona ejerce un efecto sobre otras células del microambiente como son las de la microglía, teniendo en este caso particular un efecto de regulador de su actividad.

## Referencias

- Amenomori, Y., Chen, C. L. y Meites, J. (1970) "Serum Prolactin Levels in Rats During Different Reproductive States", *Endocrinology*. Oxford Academic, 86(3), pp. 506–510. doi: 10.1210/endo-86-3-506.
- Anagnostou, I., Reyes-Mendoza, J. y Morales, T. (2018) "Glial cells as mediators of protective actions of prolactin (PRL) in the CNS", *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier Inc., 265, pp. 106–110. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.01.024.
- Ben-Jonathan, N. y Hugo, E. (2015) "Prolactin (prl) in adipose tissue: Regulation and functions", *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, 846, pp. 1–35. doi: 10.1007/978-3-319-12114-7\_1.
- Benedek, G. *et al.* (2016) "Estrogen induces multiple regulatory B cell subtypes and promotes M2 microglia and neuroprotection during experimental autoimmune encephalomyelitis", *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier B.V., 293, pp. 45–53. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.02.009.
- Bole-Feysot, C. *et al.* (1998) "Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice", *Endocrine Reviews*. Endocrine Society, pp. 225–268. doi: 10.1210/edrv.19.3.0334.
- Booth, A. K. y Gutierrez-Hartmann, A. (2014) "Signaling pathways regulating pituitary lactotrope homeostasis and tumorigenesis", *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, 846, pp. 37–59. doi: 10.1007/978-3-319-12114-7\_2.
- Bridges, R. S. y Grattan, D. R. (2003) "Prolactin-induced neurogenesis in the maternal brain", *Trends in Endocrinology and Metabolism*, pp. 199–201. doi: 10.1016/S1043-2760(03)00082-1.
- Brown, R. S. E. *et al.* (2016) "Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor", *FASEB Journal*. FASEB, 30(2), pp. 1002–1010. doi: 10.1096/fj.15-276519.

- Brusco, J. *et al.* (2008) “Plasma hormonal profiles and dendritic spine density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats”, *Neuroscience Letters*. Elsevier, 438(3), pp. 346–350. doi: 10.1016/j.neulet.2008.04.063.
- Cabrera-Reyes, E. A. *et al.* (2017) “Prolactin function and putative expression in the brain”, *Endocrine*. Springer US, 57(2), pp. 199–213. doi: 10.1007/s12020-017-1346-x.
- Cabrera-Reyes, E. A. *et al.* (2019) “Transcriptomic analysis reveals new hippocampal gene networks induced by prolactin”, *Scientific Reports*. Springer Science and Business Media LLC, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-50228-7.
- Cabrera, V. *et al.* (2009) “Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity”, *Neuroscience Letters*, 461(2), pp. 136–139. doi: 10.1016/j.neulet.2009.06.017.
- Capozzi, A. *et al.* (2015) “Hyperprolactinemia: pathophysiology and therapeutic approach”, *Gynecol Endocrinol*. Informa UK Ltd, 31(7), pp. 506–510. doi: 10.3109/09513590.2015.1017810.
- Carretero, J. *et al.* (2019) “Prolactin system in the hippocampus”, *Cell and Tissue Research*. Cell and Tissue Research, 375(1), pp. 193–199. doi: 10.1007/s00441-018-2858-2.
- Castanho, T. C. *et al.* (2014) “The role of sex and sex-related hormones in cognition, mood and well-being in older men and women”, *Biological Psychology*, 103, pp. 158–166. doi: 10.1016/j.biopsycho.2014.08.015.
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A. y O’Banion, M. K. (2014) “Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed”, *Journal of Neuroinflammation*. BioMed Central, 11, p. 98. doi: 10.1186/1742-2094-11-98.
- Cooper, G. M. (2000) “The Nucleus during Mitosis”, en *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd Editio. Sinauer Associates. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9890/> (Consultado: el 24 de febrero de 2020).

- Dey, P. (2010) "Cancer nucleus: Morphology and beyond", *Diagnostic Cytopathology*, pp. 382–390. doi: 10.1002/dc.21234.
- Diakonova, M. y Hammer, A. (2015) *Tyrosyl Phosphorylated Serine-Threonine Kinase PAK1 is a Novel Regulator of Prolactin-Dependent Breast Cancer Cell Motility and Invasion*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-3-319-12114-7.
- DiMario, P. J. (2004) "Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly", *International Review of Cytology*. Academic Press Inc., 239, pp. 99–178. doi: 10.1016/S0074-7696(04)39003-0.
- Duvernoy, H. M. *et al.* (2013) "Introduction", en *The Human Hippocampus*, pp. 1–1. doi: 10.1007/978-3-642-33603-4\_1.
- Edens, L. J. *et al.* (2013) "Nuclear size regulation: From single cells to development and disease", *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, pp. 151–159. doi: 10.1016/j.tcb.2012.11.004.
- Ferraris, J. *et al.* (2012) "Prolactin receptor antagonism in mouse anterior pituitary: Effects on cell turnover and prolactin receptor expression", *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 302(3), pp. 356–364. doi: 10.1152/ajpendo.00333.2011.
- Ferraris, J. *et al.* (2013) "Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis", *Neuroendocrinology*. doi: 10.1159/000354701.
- Fester, L. y Rune, G. M. (2015) "Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus", *Brain Research*, pp. 162–169. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.033.
- Freeman, M. E. *et al.* (2000) "Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion", *Physiological Reviews*. American Physiological Society, pp. 1523–1631. doi: 10.1152/physrev.2000.80.4.1523.

- Gaikwad, S. M. y Heneka, M. T. (2013) “Studying M1 and M2 states in adult microglia”, *Methods in Molecular Biology*, 1041, pp. 185–197. doi: 10.1007/978-1-62703-520-0\_18.
- Garaschuk, O. y Verkhratskiĭ, A. (2019) *Microglia : methods and protocols*. Manchester, UK: Humana Press. doi: doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2.
- Grattan, D. R. (2001) “The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation”, en *Progress in Brain Research*, pp. 153–171. doi: 10.1016/S0079-6123(01)33012-1.
- Grattan, D. R. (2015) “The hypothalamo-prolactin axis”, *Journal of Endocrinology*. BioScientifica Ltd., pp. T101–T122. doi: 10.1530/JOE-15-0213.
- Gregerson, K. A. (2006) “Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion”, en *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction*. doi: 10.1016/B978-012515400-0/50037-3.
- Hav’Kins, R. A. *et al.* (1975) “Oestradiol-17 $\beta$  and prolactin levels in rat peripheral plasma”, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 32(2), pp. 179–185. doi: 10.1038/bjc.1975.147.
- Henchcliffe, C. y Beal, M. F. (2007) “Excitotoxicity”, *Handbook of Clinical Neurology*, 83, pp. 553–569. doi: 10.1016/S0072-9752(07)83027-2.
- Hennerici, M. G. (2014) “Introduction”, *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 23 abril, pp. 1–5. doi: 10.1159/000361068.
- Henry, J. F. y Sherwin, B. B. (2012) “Hormones and cognitive functioning during late pregnancy and postpartum: A longitudinal study”, *Behavioral Neuroscience*. doi: 10.1037/a0025540.
- Hernandez-Verdun, D. (2006) “Nucleolus: From structure to dynamics”, *Histochemistry and Cell Biology*. Springer, 125(1–2), pp. 127–137. doi: 10.1007/s00418-005-0046-4.

- Ichikawa, A. (1965) "Fine structural changes in response to hormonal stimulation of the perfused canine pancreas", *The Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 24(3), pp. 369–385. doi: 10.1083/jcb.24.3.369.
- Ikonomidou, C. y Turski, L. (1995) "Excitotoxicity and neurodegenerative diseases", *Current Opinion in Neurology*, pp. 487–497. doi: 10.1097/00019052-199512000-00017.
- Jain, K. K. (2011) *The handbook of neuroprotection, The Handbook of Neuroprotection*. doi: 10.1007/978-1-61779-049-2.
- Jevtić, P. *et al.* (2014) "Sizing and shaping the nucleus: Mechanisms and significance", *Current Opinion in Cell Biology*. NIH Public Access, pp. 16–27. doi: 10.1016/j.ceb.2014.01.003.
- Kalinin, A. A. *et al.* (2018) "3D Shape Modeling for Cell Nuclear Morphological Analysis and Classification", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-31924-2.
- Kanyicska, L. a *et al.* (2000) "Prolactin : Structure , Function , and Regulation of Secretion MOLECULAR BIOLOGY", *Physiological Reviews*, 80(4), pp. 1523–1631. doi: 10.1016/B978-0-12-515400-0.50037-3.
- Khadrawy, Y. y Ezza, H. (2014) "Glutamate Excitotoxicity and Neurodegeneration", *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 08(04). doi: 10.4172/1747-0862.1000141.
- Kierdorf, K. y Prinz, M. (2013) "Factors regulating microglia activation.", *Frontiers in cellular neuroscience*. Frontiers Media SA, 7, p. 44. doi: 10.3389/fncel.2013.00044.
- Kinsley, C. H. *et al.* (2006) "Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines", *Hormones and Behavior*. Academic Press, 49(2), pp. 131–142. doi: 10.1016/j.yhbeh.2005.05.017.
- Kitami, T. *et al.* (2012) "A Chemical Screen Probing the Relationship between Mitochondrial Content and Cell Size", *PLoS ONE*. Editado por Y. Bai. Public Library of Science, 7(3), p. e33755. doi: 10.1371/journal.pone.0033755.

- Larsen, C. M. y Grattan, D. R. (2010) "Prolactin-induced mitogenesis in the subventricular zone of the maternal brain during early pregnancy is essential for normal postpartum behavioral responses in the mother", *Endocrinology*. doi: 10.1210/en.2009-1385.
- Larsen, C. M. y Grattan, D. R. (2012) "Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors", *Brain, Behavior, and Immunity*. doi: 10.1016/j.bbi.2011.07.233.
- Liu, Q. *et al.* (2019) "Cathepsin C promotes microglia M1 polarization and aggravates neuroinflammation via activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent PKC/p38MAPK/NF- $\kappa$ B pathway", *Journal of Neuroinflammation*. doi: 10.1186/s12974-019-1398-3.
- Love, G. *et al.* (2005) "Maternal experience produces long-lasting behavioral modifications in the rat", *Behavioral Neuroscience*. doi: 10.1037/0735-7044.119.4.1084.
- Mak, G. K. y Weiss, S. (2010) "Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons", *Nature Neuroscience*. doi: 10.1038/nn.2550.
- Marée, A. F. M., Grieneisen, V. A. y Edelstein-Keshet, L. (2012) "How cells integrate complex stimuli: The effect of feedback from phosphoinositides and cell shape on cell polarization and motility", *PLoS Computational Biology*. Public Library of Science, 8(3), p. e1002402. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002402.
- Masuch, A. *et al.* (2016) "Mechanism of microglia neuroprotection: Involvement of P2X7, TNF $\alpha$ , and valproic acid", *GLIA*. John Wiley and Sons Inc., 64(1), pp. 76–89. doi: 10.1002/glia.22904.
- McEwen, B. S. (2010) "Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: Mechanisms of neuronal remodeling", *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc., 1204(SUPPL.1), pp. 38–59. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05568.x.
- Mödersheim, T. A.E. *et al.* (2007) "Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain", *Neuroscience*, 145(3), pp. 963–973. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.12.053.

- De Moura, A. C. *et al.* (2015) "Gene expression in the CNS of lactating rats with different patterns of maternal behavior", *Neuroscience Research*, 99, pp. 8–15. doi: 10.1016/j.neures.2015.05.003.
- Neill, J. D. (1972) "Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion", *Endocrinology*. doi: 10.1210/endo-90-5-1154.
- O'Malley, B. W. y Means, A. R. (1974) "Female steroid hormones and target cell nuclei", *Science*, 183(4125), pp. 610–620. doi: 10.1126/science.183.4125.610.
- Pardo, G. V. E. *et al.* (2016) "Effects of sleep restriction during pregnancy on the mother and fetuses in rats", *Physiology and Behavior*. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.11.037.
- Parker, V. J., Menzies, J. R. W. y Douglas, A. J. (2011) "Differential changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and prolactin responses to stress in early pregnant mice", *Journal of Neuroendocrinology*, 23(11), pp. 1066–1078. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02204.x.
- Pi, X. J. y Grattan, D. R. (1998) "Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat", *Molecular Brain Research*. doi: 10.1016/S0169-328X(98)00109-0.
- Pi, X. J. y Grattan, D. R. (1999) "Increased expression of both short and long forms of prolactin receptor mRNA in hypothalamic nuclei of lactating rats", *Journal of Molecular Endocrinology*. doi: 10.1677/jme.0.0230013.
- Rivero-Segura, N. A. *et al.* (2017) "Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> overload and NF-κB activation", *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0176910.
- Ronnekleiv, O. K. y Kelly, M. J. (1988) "Plasma prolactin and luteinizing hormone profiles during the estrous cycle of the female rat: Effects of surgically induced persistent estrus", *Neuroendocrinology*, 47(2), pp. 133–141. doi: 10.1159/000124903.
- Roselli, C. E. *et al.* (2008) "Prolactin expression in the sheep brain", *Neuroendocrinology*. doi: 10.1159/000114643.

Roth, T. y Kramer, M. (2019) "Prolactin Binding Sites in the Rat Brain Author ( s ): Raymond J . Walsh , Barry I . Posner , Beatrix M . Kopriwa and James R . Brawer Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/1746845> dig", 201(4360), pp. 1041–1043.

Saijo, K. y Glass, C. K. (2011) "Microglial cell origin and phenotypes in health and disease", *Nature Reviews Immunology*. doi: 10.1038/nri3086.

Salais-López, H. *et al.* (2017) "Tuning the brain for motherhood: prolactin-like central signalling in virgin, pregnant, and lactating female mice", *Brain Structure and Function*, 222(2), pp. 895–921. doi: 10.1007/s00429-016-1254-5.

Savage, J. C., Carrier, M. y Tremblay, M.-È. (2019) "Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease", en, pp. 13–26. doi: 10.1007/978-1-4939-9658-2\_2.

Schultz, C. y Engelhardt, M. (2014) "Anatomy of the hippocampal formation", en *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. S. Karger AG, pp. 6–17. doi: 10.1159/000360925.

Segal, M. (1983) "Rat hippocampal neurons in culture: Responses to electrical and chemical stimuli", *Journal of Neurophysiology*, 50(6), pp. 1249–1264. doi: 10.1152/jn.1983.50.6.1249.

Shingo, T. *et al.* (2003) "Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin", *Science*. doi: 10.1126/science.1076647.

Sirri, V. *et al.* (2008) "Nucleolus: The fascinating nuclear body", *Histochemistry and Cell Biology*. Springer, pp. 13–31. doi: 10.1007/s00418-007-0359-6.

Smetana, K. y Busch, H. (1966) "Studies on Staining and Localization of Acidic Nuclear Proteins in the Walker 256 Carcinosarcoma", *Cancer Research*, 26(February), pp. 331–337. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/0756/3c1c1016a5e9765b80ce4ffb7139a996e142.pdf> (Consultado: el 25 de septiembre de 2019).

- Subramaniam, S. R. y Federoff, H. J. (2017) "Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease", *Frontiers in Aging Neuroscience*. Frontiers, 9, p. 176. doi: 10.3389/fnagi.2017.00176.
- Sun, X.-M. *et al.* (2020) "Size-Dependent Increase in RNA Polymerase II Initiation Rates Mediates Gene Expression Scaling with Cell Size", *Current Biology*. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.cub.2020.01.053.
- Szabo, K. y Hennerici, M. G. (2014) "The hippocampus in clinical neuroscience", en *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, pp. 1–161. doi: 10.1159/isbn.978-3-318-02568-2.
- 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*. Elsevier Inc., 169(3), pp. 1178–1185. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.074.
- Thakkar, R. *et al.* (2018) "17  $\beta$  -Estradiol Regulates Microglia Activation and Polarization in the Hippocampus Following Global Cerebral Ischemia", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi, 2018, pp. 1–19. doi: 10.1155/2018/4248526.
- Tissier, L. R. *et al.* (2014) "Chapter 6: Plasticity of the prolactin (prl) axis: Mechanisms underlying regulation of output in female mice", *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, 846, pp. 139–162. doi: 10.1007/978-3-319-12114-7\_6.
- Torner, L. (2016) "Actions of prolactin in the brain: From physiological adaptations to stress and neurogenesis to psychopathology", *Frontiers in Endocrinology*, 7(MAR), pp. 1–6. doi: 10.3389/fendo.2016.00025.
- Tremblay, M. È. y Sierra, A. (2014) *Microglia in health and disease, Microglia in Health and Disease*. doi: 10.1007/978-1-4939-1429-6.

- Tung, P. S., Dorrington, J. H. y Fritz, I. B. (1975) "Structural changes induced by follicle stimulating hormone or dibutyryl cyclic AMP on presumptive Sertoli cells in culture", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), pp. 1838–1842. doi: 10.1073/pnas.72.5.1838.
- Vanoye-Carlo, A. *et al.* (2008) "Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat", *Hormones and Behavior*, 53(1), pp. 112–123. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.09.004.
- Vergara-Castañeda, E. *et al.* (2016) "Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor", *Brain Research*, 1636, pp. 192–199. doi: 10.1016/j.brainres.2016.02.011.
- Viola, G. G. *et al.* (2009) "Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice", *Brain Research*, 1274, pp. 47–54. doi: 10.1016/j.brainres.2009.04.007.
- Vuković, L. D. *et al.* (2016) "New Insights into Mechanisms and Functions of Nuclear Size Regulation", en *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc., pp. 1–59. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.11.001.
- Walker, A. *et al.* (2019) "Repeated In Vitro Impact Conditioning of Astrocytes Decreases the Expression and Accumulation of Extracellular Matrix", *Annals of Biomedical Engineering*. Springer New York LLC, 47(4), pp. 967–979. doi: 10.1007/s10439-019-02219-y.
- Watts, C. (2005) "The Human Hippocampus", *Acta Neurochirurgica*. doi: 10.1007/s00701-005-0629-9.
- Weaver, S. R. y Hernandez, L. L. (2016) "Autocrine-paracrine regulation of the mammary gland", *Journal of Dairy Science*. Elsevier Inc., 99(1), pp. 842–853. doi: 10.3168/jds.2015-9828.
- Wingenfeld, K. y Wolf, O. T. (2014) "Stress, memory, and the hippocampus", en *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. S. Karger AG, pp. 109–120. doi: 10.1159/000356423.

Woolley, C. S., Gould, E. y McEwen, B. S. (1990) *Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons*, *Brain Research*.

York, E. M., Bernier, L.-P. y MacVicar, B. A. (2017) "Microglial modulation of neuronal activity in the healthy brain", *Developmental Neurobiology*, (2011). doi: 10.1002/dneu.22571.