



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

SUSCEPTIBILIDAD A DAÑO NEURONAL POR  
ÁCIDO KAÍNICO EN CA1 Y CA3 DEL  
HIPOCAMPO DURANTE LA LACTANCIA EN  
*RATTUS NORVEGICUS*

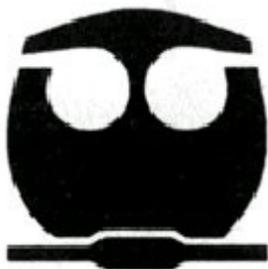
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

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

**BIÓL. AMÉRICA VANOYE CARLO**



TUTOR: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

2006



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.

# Susceptibilidad a daño neuronal por ácido kaínico en CA1 y CA3 del hipocampo durante la lactancia en *Rattus norvegicus*

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes en el laboratorio de Biología Molecular, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Dr. Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina	IIBB, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Teresa Morales del Instituto de Neurobiología por su participación en la estructuración del proyecto y diseño de experimentos.

Se reconoce la colaboración de la Dra. Sumiko Morimoto y del QFB Roberto Chavira del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de determinación de concentración de hormonas esteroideas en suero.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Adriana Mendoza en los experimentos de TUNEL e inmunohistoquímica y de la Dra. Andrea Reyna en el procesamiento del material biológico.

Se reconoce la asesoría de la MVZ Lucía Macías del Bioterio de la Facultad de Química en el mantenimiento del material biológico.

El proyecto fue apoyado parcialmente por Facultad de Química (PAIP).

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Clorinda Arias Alvarez	IIBB, UNAM
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Todas las voces muertas,  
hacen un ruido de alas,  
de hojas,  
de arena,  
de hojas  
hablan por todas a la vez,  
cada cual para sí,  
más bien cuchichean,  
murmuran,  
susurran,  
murmuran  
¿qué dicen?,  
hablan de su vida,  
no les basta haber vivido,  
necesitan hablar de ella,  
no les basta con estar muertas,  
no es suficiente,  
producen un ruido como de plumas,  
de hoja,  
de ceniza,  
de hojas...

Samuel Beckett  
(Esperando a Godot)

## **Agradecimientos**

Agradezco a quien rige nuestro destino por permitirme llegar a este punto

A mi madre, por ayudarme a ser lo mucho o poco que soy

A mi familia: mis hermanas y mis niños, por ser parte de mi vida

A Marco Cerbón por la oportunidad, por su tiempo, apoyo y confianza

A quienes contribuyeron a la realización de este trabajo por permitirme aprender un poco de ellos

A mis amigos, por compartir mi alegría y tristeza, por estar conmigo cuando más los necesité, porque aún sin entenderme no me han dejado caer y me han tendido siempre su mano con una sonrisa...gracias

A Sonia por compartir todo lo bueno y lo malo de este viaje y a Omar por el cariño y la amistad de siempre

A quien de una u otra forma me ha enseñado algo de lo que ahora sé....

**GRACIAS**

*...A la vida, a la muerte, a los que están, a los que no*

# Indice

<b>Resumen</b>	<b>I</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>II</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Glutamato y excitotoxicidad .....	1
1.2 Receptores kainato .....	4
1.3 Hormonas esteroides y excitotoxicidad .....	10
1.3.1 Estrógenos .....	12
1.3.2 Progesterona .....	14
1.3.3 Corticoesteroides .....	17
1.4 Ciclo estral .....	19
1.5 Periodo de lactancia .....	21
<b>2 Planteamiento del Problema</b>	<b>25</b>
<b>3 Hipótesis</b>	<b>26</b>
<b>4 Objetivos</b>	<b>26</b>
4.1 Objetivo general .....	26
4.2 Objetivos particulares .....	26
<b>5 Materiales y Métodos</b>	<b>27</b>
5.1 Animales .....	27
5.1.1 Ratas lactantes .....	27
5.1.2 Ratas en diestro .....	27
5.2 Tratamientos .....	27

5.3 Concentraciones séricas de hormonas .....	28
5.4 Obtención del tejido .....	28
5.5 Tinción con Violeta de Cresilo .....	29
5.6 Inmunohistoquímica por fluorescencia .....	30
5.7 Inmunohistoquímica .....	30
5.8 TUNEL .....	31
5.9 Fluoro-Jade .....	31
5.10 Cuantificación celular y densitometría .....	32
5.11 Análisis estadístico .....	32
<b>6 Resultados</b>	<b>33</b>
6.1 Concentración de hormonas esteroides al final de la lactancia .....	34
6.2 Daño celular por ácido kaínico .....	36
6.2.1 Morfología del hipocampo .....	36
6.2.2 Activación de caspasa-3 por ácido kaínico .....	38
6.2.3 Detección de muerte celular por TUNEL .....	40
6.2.4 Daño neuronal detectado por Fluoro-Jade .....	43
6.3 Distribución del receptor a estrógenos alfa en el hipocampo .....	45
6.4 Expresión de Bcl-2 .....	46
<b>7 Discusión</b>	<b>50</b>
7.1 Hormonas esteroides y excitotoxicidad .....	50
7.2 Daño celular en hipocampo .....	51
7.3 Neuroprotección durante la lactancia .....	55
<b>8 Conclusiones</b>	<b>59</b>
<b>9 Perspectivas</b>	<b>60</b>
<b>10 Bibliografía</b>	<b>61</b>

## Resumen

El glutamato es el principal neurotransmisor de efecto rápido de tipo excitador en el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos. Se conoce que el glutamato posee también propiedades neurotóxicas y produce varias formas de neurodegeneración. Por otro lado, se ha demostrado que, en el SNC, las hormonas esteroides sexuales tienen un papel neuroprotector ante la excitotoxicidad, mientras que los glucocorticoides incrementan la vulnerabilidad celular ante este tipo de estímulos tóxicos.

En este estudio se evaluó el efecto del ácido kaínico en el hipocampo de *Rattus norvegicus* durante la lactancia y metaestro. La primera, se caracteriza por una alta concentración en sangre de corticosterona y el metaestro es la etapa del ciclo estral que presenta niveles más bajos de hormonas esteroides ováricas, similares a los que se observan en lactancia.

A través del uso de diferentes marcadores de muerte celular como son, caspasa-3 activada, TUNEL y Fluoro-Jade; se demostró que durante la lactancia hay menor daño neuronal en el hipocampo ante la administración de kainato, en comparación con el daño celular observado en metaestro. Por otro lado, usando la técnica de inmunohistoquímica para localizar y cuantificar el receptor a estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) en las diferentes zonas del hipocampo, no se detectaron diferencias importantes en las condiciones estudiadas, sin embargo, se observó una mayor expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 durante la lactancia. Los resultados obtenidos sugieren que la lactancia es una situación fisiológica en la que existe un mecanismo neuroprotector en el hipocampo ante excitotoxicidad por kainato y representa un modelo fisiológico adecuado para el estudio de neuroprotección.

# 1 Introducción

## *1.1 Glutamato y excitotoxicidad*

El Glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor de tipo excitador en el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos y se encuentra presente en neuronas en concentraciones milimolares en la terminal sináptica. La participación del glu en el SNC incluye varias formas de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo (LTP), respuesta que ha sido considerada como el posible mecanismo involucrado en el aprendizaje y la memoria. El glu juega también un papel importante durante la ontogenia del SNC por su participación en la determinación de la morfología de las neuronas mediante la alteración de las ramificaciones y nacimiento de neuritas, la formación y eliminación de sinapsis y el establecimiento de patrones precisos de conectividad neuronal en varias áreas del cerebro [5,77]

Actualmente, se conoce que el glu interactúa con proteínas receptoras responsables de la neurotransmisión en contactos sinápticos excitadores, mismas que pueden ser clasificadas en dos grandes clases. La primera de estas clases incluye a los receptores que se encuentran acoplados a sistemas de señalización mediante proteínas G y que se denominan metabotrópicos. La segunda clase está formada por receptores acoplados a canales catiónicos denominados ionotrópicos (iGluRs), y su activación conlleva a un rápido aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática a iones de sodio, potasio y calcio [6,85]

Estudios farmacológicos, biofísicos y moleculares sustentan la existencia de tres familias diferentes de iGluRs que han sido nombradas de acuerdo al agonista que induce su activación, a saber: receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) y kainato. Estas proteínas comparten un diseño estructural consistente en un gran dominio amino terminal que se dispone de modo extracelular y cuatro dominios membranales que dan paso a una asa intracelular carboxilo

terminal. Los segmentos membranales 1, 3 y 4 atraviesan la membrana mientras que el segmento 2 forma una horquilla sin cruzarla, siendo parte del canal iónico con propiedades importantes en la permeabilidad iónica. Entre los segmentos 2 y 3 se presenta una región que, junto con el extremo amino terminal, forma el sitio de reconocimiento al agonista [86].

Aunado a las funciones ya descritas, el glutamato posee también propiedades neurotóxicas y produce varias formas de neurodegeneración. Alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica han sido relacionadas con el daño neuronal observable después de episodios de isquemia e hipoglucemia así como en la etiología de una serie de condiciones neuropatológicas entre las que se encuentran la epilepsia, la corea de Huntington y la esclerosis amiotrófica lateral [2,66]

Los experimentos realizados a fines de la década de los 50s por Lucas y Newhouse demostraron la destrucción de las capas internas de la retina en ratones por inyecciones de L-glutamato, sugiriendo el potencial tóxico de este neurotransmisor. Posteriormente los estudios realizados por Olney indicaron que la retinotoxicidad se encuentra acompañada por una expansión del volumen celular principalmente cerca de los componentes dendrosomales los cuales expresan receptores a aminoácidos excitadores (EAAs). Hacia 1969, Olney propuso la idea de que la neurotoxicidad por glu y compuestos relacionados es una consecuencia directa de la neuroexcitación producida ya que la despolarización continua, generada por la exposición a glutamato, es letal *per se* y se asocia a una expansión del volumen celular y al agotamiento de las reservas energéticas celulares [63,78,162].

Los estudios de Choi y colaboradores demostraron en cultivos hipocampales que el influjo celular de sodio y cloro, ante la activación de los receptores a glutamato, induce la expansión del volumen celular, mientras que la entrada de  $Ca^{+2}$  es el evento más importante que conduce a la muerte celular [32,33]. Aún cuando las altas concentraciones de calcio no son la única causa de muerte neuronal por activación de receptores a glutamato, varias líneas de investigación sustentan una estrecha relación entre el influjo

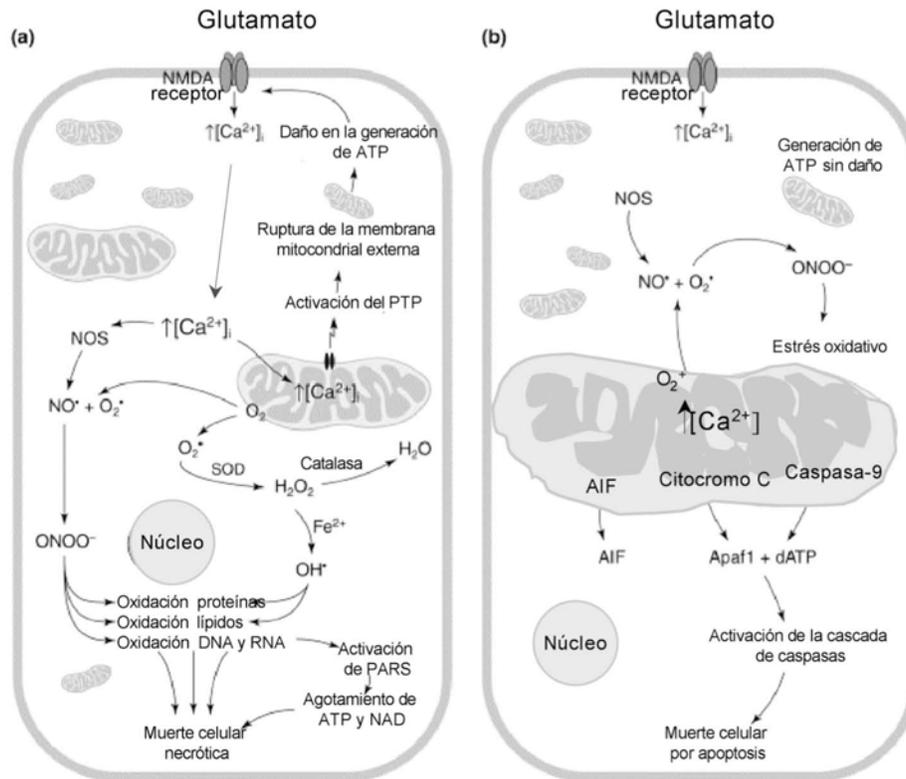
excesivo de calcio y el daño neuronal. Comenzando con el trabajo realizado por Bunge en 1985, el cual indica que la degeneración de axones seccionados involucra iones extracelulares de calcio [13], mucha de la investigación se ha enfocado en el estudio de las implicaciones de un incremento intracelular de iones de  $\text{Ca}^{+2}$  y ha dado lugar a la formulación de la hipótesis de calcio, de acuerdo a la cual una sobrecarga celular de calcio induce neurodegeneración.

Los iones de calcio son mensajeros intracelulares importantes que participan en procesos celulares como diferenciación, crecimiento, excitabilidad membranal, exocitosis y actividad sináptica. Un influjo excesivo de calcio o liberación de los reservorios celulares de este elemento puede elevar la concentración intracelular a niveles que exceden la capacidad de contención celular, lo que lleva a la activación de procesos dependientes de calcio como la activación de diferentes proteasas, lipasas, fosfatasas y endonucleasas [139].

Por otro lado, la pérdida de la homeostasis de calcio ejerce un daño importante sobre la mitocondria ya que una sobrecarga de calcio en la mitocondria favoreciendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de la sintasa de óxido nítrico (NOS) y la generación del ión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y por tanto el daño celular por estrés oxidativo a través de oxidación de macromoléculas esenciales, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [4]. Aunado a ello, la disfunción mitocondrial tiene un efecto negativo sobre los procesos celulares dependientes de energía, ya que en ella se llevan a cabo las reacciones bioquímicas responsables de la generación de ATP [11](fig. 1a).

La función mitocondrial participa también en forma importante en el control de rutas de muerte celular programada, en este sentido, se sabe que el poro de transición de permeabilidad (PTP) es crucial tanto en procesos necróticos como apoptóticos. La proteína proapoptótica Bax parece acelerar la apertura del PTP al interactuar con canales aniónicos dependientes de voltaje, de igual forma un incremento en los niveles intracelulares calcio y los agentes oxidantes parecen favorecer la apertura del PTP

permitiendo la salida de citocromo C y el ensamblaje y activación del apoptosoma, desencadenando una muerte celular de tipo apoptótica a través de la vía mitocondrial [11](fig. 1b).



**Figura 1. Mecanismos de muerte neuronal por glutamato.** a) Estímulos excitotóxicos severos conducen a muerte neuronal por necrosis, b) Estímulos excitotóxicos moderados pueden activar mecanismos de muerte celular por apoptosis. En ambos casos el incremento en las concentraciones intracelulares de calcio afecta la homeostasis de la mitocondria desencadenando la pérdida de la regulación de las funciones mitocondriales. Tomado de ref. [11] (modificado).

## 1.2 Receptores a Kainato

Los (iGLURs) mantienen una topología y estequiometría transmembranal. Los iGluRs son tetrámeros en los que cada monómero posee un sitio de unión a ligando y contribuye con una secuencia específica de aa hidrofóbicos al lumen del canal (M2), además de tres

segmentos transmembranales (M1, M3 y M4) cuyos extremos  $\text{NH}_3^+$  son extracelulares y los extremos  $\text{COO}^-$  intracelulares [86].

La distribución de las subunidades que conforman los receptores a kainato ha sido dilucidada a través de la localización del mRNA de cada subunidad por hibridación in situ debido a la falta de anticuerpos específicos. Las subunidades de los receptores a kainato fueron identificadas por homología a las ya conocidas de receptores a NMDA y AMPA, con las que comparten una homología del 20 y 40% respectivamente. Con base en la secuencia de aminoácidos, las subunidades identificadas han sido divididas en dos familias, la primera de ellas incluye a las subunidades Glu5, Glu6 y Glu7, las cuales comparten una homología del 75-80%, mientras que la segunda familia agrupa las subunidades KA1 y KA2 con una similitud del 45% [42,125].

La subunidad Glu5 puede formar receptores sensibles a AMPA y domoato además de kainato [12], mientras que Glu6 se ubica en canales homoméricos no sensibles a AMPA [104] y Glu7 conforma receptores funcionales homoméricos con baja sensibilidad a glutamato e insensibles a domoato y AMPA [125]. La formación de canales heteroméricos tipo iónicos es posible a través de la interacción entre las subunidades Glu5-7 con las subunidades KA1 y KA2. En los receptores a kainato el sitio de unión a glutamato está formado por residuos del extremo amino terminal (S1) y el linker entre M3 y M4 (S2) [141] siendo en este último sitio donde reside la sensibilidad a diferentes agonistas y por tanto la permeabilidad a  $\text{Ca}^{+2}$  [44,144].

Las subunidades de los receptores a kainato presentan variaciones debidas a ediciones del pre-mRNA en el sitio Q/R del dominio transmembranal M2. Se ha visto que tanto en Glu5 como Glu6 la sustitución de una glutamina por arginina disminuye la permeabilidad a  $\text{Ca}^{+2}$  y aumenta la permeabilidad a  $\text{Cl}^-$  [62,137]. Así mismo se han identificado dos posiciones en el dominio M1 en Glu6 que son susceptible a ediciones, el sitio I/V donde se da el cambio de una valina por una isoleucina y el sitio Y/C donde existe el reemplazo de una tirosina por una cisteína, la edición de estas posiciones tiene un efecto importante

sobre el sitio Q/R en el flujo de  $\text{Ca}^{+2}$ , de modo que la edición de ambas posiciones en M1 impide el paso de este ión [70].

Las subunidades de receptores a kainato muestran una gran variabilidad debida también a splicing alternativo, se ha identificado que la subunidad GluR-5 puede generar formas estructurales diferentes a través de este mecanismo, la subunidad GluR5-1a presenta un inserto de 15 aa en el extremo amino y un codón prematuro de paro en el extremo carboxilo; GluR5-1b posee además una inserción de 49 aa en el extremo carboxilo terminal; GluR5-2c, presenta la pérdida de 14 aa en el extremo  $\text{NH}^{3+}$  y un inserto de 29 aa en el extremo carboxilo; GluR5d presenta además un extremo carboxilo no homólogo a las subunidades anteriores [14,56,137]. Con respecto a la subunidad GluR6, se conoce que es un polipéptido de 889 aa y la forma alternativa, GluR6-2, carece de los últimos 15 aa [14,154]; así mismo, GluR-7 presenta 919 aa y GluR-7b presenta 13 aa más en el extremo carboxilo terminal (Schiffer, 1997; Bettler, 1992). En las subunidades KA 1 y KA2 no se han identificado variantes por splicing alternativo ni por edición [61].

El análisis de la distribución de los receptores a kainato por hibridación in situ ha señalado que el transcrito de GluR5 está presente principalmente en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG), subiculum, núcleo septal y corteza piriforme y del cíngulo además de células de Purkinje en el cerebelo. La subunidad GluR-6 se localiza abundantemente en células granulares del cerebelo, giro dentado y CA3 del hipocampo y en el estriado. El transcrito de GluR-7 se ha detectado en bajos niveles principalmente en capas profundas de la corteza cerebral, el estriado y en neuronas inhibitorias de la capa molecular del cerebelo [8,158,159].

La distribución de KA1 parece estar restringida a la región CA3 del hipocampo y se ha detectado en bajos niveles en el giro dentado, la amígdala y corteza entorrinal. El mRNA de KA2 se encuentra en cualquier región del SNC. A través de los anticuerpos anti-GluR5/6/7 y anti-GluR6/7, se ha detectado la presencia de estos receptores tanto en dendritas como en membranas postsinápticas [52,65,109].

Se ha establecido que las regiones CA1 y CA3 del hipocampo son altamente sensibles a despolarización por kainato y que muchas de las células hipocámpales en cultivo expresan GluR6. La respuesta sináptica mediada por receptores a kainato fue encontrada en sinapsis de fibras musgosas y las células piramidales de CA3 en hipocampo. La activación de receptores a kainato en otras conexiones a CA3 no ha sido observada y se ha establecido que los receptores que median esta comunicación son heteroligoméricos, conformados por GluR5 y GluR6 [17,29,37,106,153]. Con respecto a la importancia de estos procesos sinápticos se ha encontrado que la vía de las fibras musgosas a CA3 es bloqueada en presencia de altas concentraciones de kainato, mientras que a bajas concentraciones se induce la liberación de glutamato, por lo que se ha propuesto que los receptores a kainato controlan de manera bidireccional la liberación de glutamato contribuyendo a la plasticidad de corta duración.

La respuesta sináptica mediada por receptores a kainato fue encontrada también en los contactos entre las colaterales de Schaffer y las interneuronas de CA1. Se ha demostrado la presencia de receptores a kainato en el stratum oriens y radiatum de la región hipocámpal CA1, en este caso la activación de los receptores de interneuronas no requiere la estimulación de axones aferentes y su activación se ha asociado con una sobreinhibición de las células piramidales de CA1. Receptores postsinápticos a kainato han sido identificados en regiones diferentes al hipocampo tales como el cerebelo, el estriado, la médula espinal y la amígdala [24,30,79].

El descubrimiento de los antagonistas específicos para receptores AMPA, las 2-3 benzodiazepinas, GYKI 52466 y GYKI 53655 [105,157], las cuales afectan poco o nada la respuesta inducida por kainato sobre los receptores a kainato, ha permitido separar farmacológicamente las respuestas provocadas por los agonistas mixtos contribuyendo al estudio de los receptores a kainato en la transmisión y plasticidad sinápticas. Varios estudios han demostrado que los receptores a kainato se encuentran en la zona de terminales postsinápticas de conexiones específicas mediando parte de la señal sináptica y que estos receptores se localizan también en terminales presinápticas de sinapsis excitadoras e inhibitoras regulando la liberación de neurotransmisor [29,153].

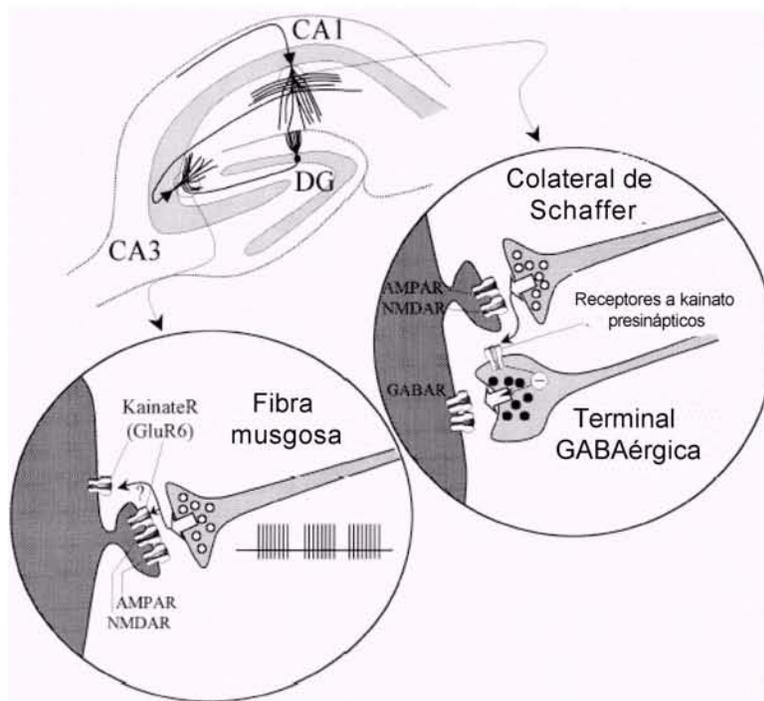
Diversos estudios sugieren una localización presináptica de los receptores a kainato ya que se ha encontrado que modulan la liberación del neurotransmisor. A este respecto se ha reportado un efecto del kainato sobre la liberación de aspartato en sinaptosomas de la región CA1 y un incremento en la liberación de transmisor en sinaptosomas corticales resistente a la aplicación del inhibidor de receptores AMPA 2-3, benzodiazepina (GYKI 52466). Adicionalmente, se ha visto un decremento en el flujo de calcio en la región CA3 mediado por kainato y un decremento en la liberación de glutamato en sinaptosomas hipocámpales [34,38,69] .

También, se ha reportado la modulación de la liberación de GABA por la actividad de receptores a kainato en el hipocampo e hipotálamo. Se ha postulado que los receptores a kainato deprimen la liberación de GABA por lo que la activación de los receptores a kainato produce la desinhibición de las células principales al producir una disminución del nivel de inhibición de estas células. Recientemente, algunos estudios indican que receptores a kainato situados en terminales gabaérgicas que hacen sinapsis sobre interneuronas inhibitoras de la capa CA1 del hipocampo facilitan la liberación de GABA. Esto sugiere la existencia de receptores a kainato presinápticos que modulan la actividad sináptica mediada por GABA entre interneuronas y muestran que la modulación de la liberación de GABA por receptores a kainato es un fenómeno heterogéneo que depende de las propiedades de la sinapsis gabaérgica (fig. 2).

Se ha hipotetizado que el resultado de la sobreliberación de GABA en el sistema causaría una sobreinhibición de las interneuronas gabaérgicas lo que daría como resultado un mecanismo desinhibidor que, sumado a la depresión de la liberación de GABA inducida por kainato en las terminales gabaérgicas que contactan sobre células piramidales, podrían producir un aumento en la excitabilidad poblacional que puede desembocar en actividad epiléptica [82,83]. Esta hipótesis es apoyada por estudios recientes en los que la aplicación de kainato en CA1 generó un aumento en la actividad de las neuronas en CA1 y una inhibición de la actividad gabaérgica de interneuronas de la misma región, rompiendo de este modo la regulación inhibitoria que ejercen las interneuronas sobre la

capa piramidal de CA1, a través de la liberación de GABA, es decir la administración de kainato *in vivo* redujo la inhibición recurrente e incrementó la actividad epileptiforme en el hipocampo [69,73,76,83,116].

Se sabe que los receptores de tipo metabotrópicos, es decir acoplados a una proteína G, modulan finamente la liberación de neurotransmisores. Los trabajos de Lerma (1998) y colaboradores señalan que la regulación de la liberación de GABA a través de receptores a kainato involucra una cascada de segundos mensajeros al interior de la célula, mismos que inducen la activación de fosfolipasa C y proteína cinasa C. La naturaleza metabotrópica de esta regulación fue dilucidada a través del uso de una toxina denominada toxina pertúsica, la cual inhibe la función de proteínas G. La aplicación de esta toxina en cultivos de neuronas hipocampales en ausencia de calcio extracelular inhibe los niveles de IP3, y por tanto, la liberación de  $Ca^{+2}$  intracelular, además de la activación de proteína cinasa C inducida por diacilglicerol y la regulación de liberación de GABA en presencia de kainato .



**Figura 2. Funciones de los receptores a kainato en el hipocampo.** En la región CA1 la activación por glutamato de las colaterales de Schaffer puede influir terminales GABAérgicas mediante la activación de receptores a kainato presinápticos. La estimulación de las fibras musgosas permite la activación de receptores postsinápticos a kainato en la región CA3 del hipocampo. Tomado de ref.[75](modificado).

La actividad metabotrópica independiente de la actividad ionotrópica propuesta para los receptores a kainato ha sido apoyada y sustentada por investigaciones hechas en sistemas experimentales como sinaptosomas, sinapsis excitadoras, neuronas piramidales de CA1 y fibras musgosas del hipocampo. Sin embargo, el estudio de ratones KO para la subunidad GluR5 muestra que esta subunidad es importante en la actividad metabotrópica de los receptores a kainato en forma independiente a su importancia en la formación del canal ionotrópico, por lo que se ha propuesto que esta subunidad se requiere para acoplar los receptores a kainato al sistema de segundos mensajeros [117-119,121,122].

La administración sistémica de ácido kaínico en roedores incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno y genera disfunción mitocondrial induciendo muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis en diferentes regiones del cerebro, particularmente en las subregiones CA1 y CA3 y en el hilus del GD. Aunado a lo anterior, el kainato activa las células gliales, y desencadena una respuesta de tipo inflamatorio características de enfermedades neurodegenerativas. La vulnerabilidad celular inducida por kainato en la región hipocampal se encuentra relacionada a la distribución y composición de los receptores AMPA/kainato en dicha área del cerebro. Estudios recientes han demostrado que la administración sistémica de kainato altera diversas funciones celulares como son el procesamiento del precursor de la proteína amiloide, la acumulación de sustancias tipo lipofuscina, la inducción de proteínas complementarias y alteraciones en la expresión de la proteína tau. Estos estudios sugieren que la inducción de excitotoxicidad por la administración sistémicas de ácido kaínico puede ser utilizada como un modelo para indagar sobre los mecanismos que subyacen la muerte y sobrevivencia celular en el SNC ante estímulos dañinos.

### ***1.3 Hormonas esteroides y excitotoxicidad***

Las hormonas esteroides son bien conocidas por generar un amplio espectro de respuestas celulares y fisiológicas esenciales, resultado de su producción endócrina y subsecuente función como mensajeros químicos a través de los dominios de sistemas endócrinos relacionados[102].

Estudios a nivel celular y molecular han permitido conocer que la acción de estas hormonas se lleva a cabo a través de la formación de complejos con proteínas receptoras que funcionan en el núcleo celular modulando la transcripción génica. Actualmente, se sabe que en forma adicional a este mecanismo denominado tradicional o genómico, las hormonas esteroides presentan un tipo de acción referido como de acción rápida o no genómico, que depende de diferentes sistemas de mensajeros secundarios como son las vías de transducción de proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAP), fosfatidil inositol 3 cinasa, el transductor de señal y activador de transcripción (STAT), cinasa y fosfatasa de tirosinas, sintasas de óxido nítrico (NOS), metaloproteasas, Shc cinasa, proteína cinasa C (PKC), adenilato ciclasa y proteínas G. Estos sistemas de señalización se encuentran presentes en citoplasma y producen cambios a nivel de membrana plasmática o enlazan con sistemas nucleares [23,60,134,138,151,160].

La síntesis de hormonas esteroides adrenal y gonadal, así como en el sistema nervioso, depende del arreglo tejido específico y celular de enzimas esteroidogénicas. Las enzimas neurosteroidogénicas pueden ser clasificadas como enzimas citocromo P450 y enzimas no P450. La presencia de estas enzimas en el sistema nervioso central ha sido documentada por análisis de RNA mensajero y proteína en una amplia variedad de especies. Las enzimas esteroidogénicas P450 se encuentran como genes simples en diferentes especies pero pueden mediar múltiples pasos enzimáticos. Por otro lado, las enzimas no P450 tales como 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD), 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ HSD) y 3- $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, se localizan en genes múltiples y cada una de ella interviene en reacciones específicas [49,91,107].

El sistema nervioso de mamíferos puede sintetizar neuroesteroides, es decir esteroides capaces de modificar la actividad neuronal [89,90,142]. En este sentido y dentro de la familia de los receptores a glutamato, los receptores a NMDA, AMPA y kainato han mostrado ser un blanco de la modulación por esteroides. Diversos estudios señalan que las hormonas sexuales contribuyen a la organización cerebral en áreas ligadas a la reproducción, sus efectos son mediados principalmente por un mecanismo de acción genómico regulado a través de sus interacciones con receptores a estrógenos y andrógenos, sin embargo, los esteroides pueden también unirse a receptores de membrana plasmática tales como los receptores a GABA<sub>A</sub> y NMDA, modulando su actividad. Aunado a esto, se sabe que tanto la inducción de LTP como de LTD en las sinápsis de CA1 y CA3 del hipocampo se encuentran influenciadas por los niveles circulantes de estradiol [27,39-41,130,132].

### 1.3.1 Estrógenos

Desde su descubrimiento como una hormona sexual femenina, el estradiol ha sido motivo de diversos estudios por sus efectos en tejidos reproductivos femeninos, así como en el sistema neuroendócrino reproductivo y más recientemente por su habilidad de afectar otras funciones del cerebro relacionadas a la cognición y otras funciones no relacionadas con la reproducción. Estos estudios han revelado que los estrógenos actúan sobre varios sistemas de neurotransmisión y áreas cerebrales relacionadas a funciones cognitivas, emocionales y vegetativas, así mismo ha sido demostrado que participan en forma importante en el desarrollo del cerebro y ejercen un efecto protector en células nerviosas ante daño por excitotoxicidad [123,136].

Se conocen dos subtipos de receptor a estrógenos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , mismos que presentan una distribución celular y tisular diferencial. El receptor a estrógenos alfa se expresa abundantemente en tejidos blanco clásicos de estrógenos tales como útero, glándula mamaria, hueso y sistema cardiovascular, mientras que el receptor a estrógenos tipo beta se expresa principalmente en tejidos no clásicos como próstata, ovario y tracto urinario.

En el SNC, los receptores son coexpresados en niveles similares en algunas regiones del cerebro, incluyendo el área preóptica, el núcleo basal de la estria terminalis y el núcleo amigdalino. Algunas regiones del cerebro exhiben una expresión más selectiva de estos receptores tal como el núcleo ventromedial hipotalámico y el órgano subfornical, en las que se presenta sólo ER $\alpha$ . En forma contrastante, se ha observado que ER $\beta$  es predominante en la corteza cerebral y en el hipocampo del cerebro de rata, mientras que ER $\alpha$  es predominante en el hipocampo de ratón y en cerebro humano, indicando que la expresión de ERs puede ser especie-específica [84,93,133].

El 17- $\beta$  estradiol es una hormona con diversos efectos celulares en tejido neuronal. Es producida por los ovarios y el cerebro, así como por tejido adiposo por la aromatización de testosterona, por lo que el estradiol es una hormona presente en machos y hembras. Los efectos neuronales de los estrógenos incluyen un papel neurotrófico en procesos como proliferación y diferenciación celular, sobrevivencia neuronal y sinaptogénesis durante un periodo sensible del desarrollo. Se conoce que los estrógenos en el cerebro adulto también juegan un importante papel neurotrófico al promover el crecimiento colateral axonal en el hipotálamo desaferentado y la sinaptogénesis en el hipocampo femenino. El estradiol también presenta efectos neuroprotectores, mismos que se hacen evidentes en padecimientos como Alzheimer y daño cerebral por isquemia. En general, se conoce que el estradiol en SNC: (a) activa ERs nucleares, (b) interactúa con sistemas de segundos mensajeros, (c) induce la expresión de genes antiapoptóticos, (d) mantiene la homeostasis de calcio intracelular, (e) promueve actividad antioxidante y (f) modula la acción de neurotrofinas [10,74,102,147].

El declinamiento de los niveles de estrógenos en la circulación, ya sea de modo natural o inducido quirúrgicamente, ha sido relacionado con la etiología o progresión de enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad. La terapia de reemplazo hormonal con estrógenos ha sido benéfica para muchas mujeres posmenopausicas. Estos beneficios incluyen una mejora de las funciones cognitivas y mentales, particularmente de la memoria verbal y un retraso en el inicio de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y posiblemente Parkinson, así como una reducción de la incidencia de

osteoporosis y enfermedades cardiovasculares [9,15,84,92,95].

El efecto neuroprotector de los estrógenos ha sido demostrado en varios modelos de neurodegeneración y daño isquémico. En ratas ovariectomizadas, la administración de concentraciones fisiológicas de estradiol atenúan la extensión del daño cerebral causado por isquemia; así mismo, el estradiol disminuye el daño neuronal en ratas seniles. En cultivos neuronales primarios, cultivos hipocampales organotípicos y cultivos de la líneas celular hipocampal HT22, los estrógenos disminuyen considerablemente el daño neuronal causado por hipoxia, aminoácidos excitadores, aniones superóxido y peróxido de hidrógeno. Aunado a lo anterior, se ha reportado que el estradiol reduce los efectos neurotóxicos del  $\beta$ -amiloide así como su producción en cultivos celulares [57,68,161].

Diversos estudios señalan que el  $17\beta$ -estradiol produce cambios morfológicos y funcionales en el hipocampo ya que incrementa la densidad de espinas dendríticas, el número de sinapsis y la expresión de la subunidad NR1 del receptor a NMDA, así como la potenciación de corrientes sinápticas mediada por receptores a kainato en neuronas piramidales de la región CA1. Se conoce también que el estradiol ejerce un importante efecto neuroprotector en esta área, sin embargo, el mecanismo mediante el cual se dan estos procesos no se conoce con exactitud. Se ha hipotetizado que la neuroprotección inducida por estradiol está mediada principalmente por el receptor a estrógenos alfa, ya que en estudios con ratones knockout se ha demostrado que en ausencia de  $ER\alpha$  el estradiol no presenta efectos contra daño neuronal [110,132,156].

Uno de los mecanismos descritos, mediante el cual los estrógenos podrían ejercer un papel neuroprotector a través del  $ER\alpha$ , es la regulación de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2. En neuronas hipocampales en cultivo, la administración de estrógenos incrementa los niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xl y disminuye tanto la proteólisis mediada por caspasas como la muerte celular inducida por  $\beta$ -amiloide. En células PC12 transfectadas con  $ER\alpha$ ,  $17\beta$  estradiol ( $E_2$ ) incrementa la viabilidad celular en ausencia de suero. Se ha sugerido que tratamientos con estrógenos pueden incrementar la resistencia neuronal ante estímulos apoptóticos mediante una vía

dependiente de receptor a estrógenos, la cual desemboca en el incremento en la expresión de Bcl-2 y Bcl-x1 y la subsecuente inhibición de proteínas proapoptóticas. En neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra se ha podido establecer que los estrógenos protegen contra la muerte apoptótica a través del incremento en la expresión de Bcl-2 por un mecanismo que involucra la activación de elementos de respuesta AP1 a través del ER $\beta$ , el receptor que predomina en esta región del cerebro [59,74,161].

### 1.3.2 Progesterona

La progesterona es una hormona esteroide gonadal, que se sintetiza principalmente en el ovario (cuerpo lúteo) en hembras y en testículos y corteza adrenal en machos y desempeña papeles fundamentales en ambos sexos. Las funciones de esta hormona se llevan a cabo a través del receptor a progesterona (PR), el cual, al igual que el receptor a estrógenos, ha sido descrito como un factor de transcripción clásico, cuya acción involucra elementos de respuesta a estrógenos (PREs) presentes en la región promotora de los genes blanco [50,97].

Se conocen dos isoformas del receptor a progesterona, PR-B y la forma truncada en el extremo amino terminal, PR-A. Esta última forma, aparentemente ejerce un efecto negativo sobre la transcripción mediada por PR-B, y además sobre la expresión de genes promovida por la activación del receptor a estrógenos y el receptor a glucocorticoides. Además de actuar bajo este mecanismo clásico, la progesterona puede también alterar la función celular por mecanismos no genómicos. Hasta el momento se conoce una gran variedad de moléculas que actúan como segundos mensajeros en cascadas de señalización iniciadas por progesterona, entre las que se encuentran AMPc/PKA, MAPK (ERK1/2) y PI3K/AKT [97]

Los efectos neuroprotectores de la progesterona han sido caracterizados en diferentes modelos experimentales. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que la progesterona protege a células neuronales contra la toxicidad mediada por Glu. *In vivo*, la progesterona

incrementa la sobrevivencia neuronal después de la axotomía y previene la degeneración de las motoneuronas en ratones Wobbler. En neuronas dopaminérgicas, la progesterona aparentemente contribuye al mantenimiento de la integridad neuronal ante la toxicidad de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MTPT), un neurotóxico inductor de Parkinson, y previene la pérdida neuronal en cerebro y médula espinal después de una contusión, isquemia o edema. Adicionalmente, se sabe que la progesterona previene la muerte neuronal inducida por ácido kaínico en hipocampo. Otro efecto neuroprotector importante de la progesterona es que disminuye las convulsiones epilépticas y suprime la actividad epileptiforme en rebanadas hipocampales [41,135].

En el SNC, la progesterona es rápidamente metabolizada a 5 $\alpha$ - dihidroprogesterona (DHP), misma que subsecuentemente es reducida a 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -tetrahidroprogesterona (THP, alopregnenolona), estas conversiones son catalizadas por 5 $\alpha$ -reductasa y 3 $\alpha$ -hidroesteroide deshidrogenasa. Existen numerosas evidencias de que los efectos anticonvulsivos de la progesterona se encuentran mediados principalmente por sus metabolitos reducidos, DHP y THP, mismos que modulan la conductancia por cloro del receptor GABA<sub>A</sub>, y ejercen un importante papel inhibitor y anticonvulsivo. La falta de THP incrementa la susceptibilidad convulsiva en modelos animales de epilepsia y la inhibición de la actividad enzimática de la reductasa elimina los efectos anticonvulsivos de la progesterona [41,91].

In vivo, se ha observado que la administración de los metabolitos reducidos de progesterona DHP y THP, en ratas ovariectomizadas, previene el daño en el estrato piramidal de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y la pérdida de neuronas hilares ante la administración de ácido kaínico. En forma interesante, también se ha encontrado que la administración de estos metabolitos resulta neuroprotectora en dosis bajas. Se ha hipotetizado que la protección observada en el SNC ante daño por agonistas de glutamato, puede estar mediada principalmente por la THP, ya que la DHP es convertida rápidamente a THP en SNC y se ha demostrado que este metabolito participa en la modulación de receptores GABA [35].

Los metabolitos reducidos de la progesterona pueden modular diferentes tipos de receptores membranales. Los complejos de receptores GABA sigma han sido los mayormente estudiados. Ha sido demostrado que la THP y tetrahydrodeoxicorticosterona (THDOC) son fuertes moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA<sub>A</sub>. Se conoce también que la pregnenolona sulfato (PS) y 11β estradiol son moduladores negativos de los receptores a NMDA, así mismo la PS modula, también en forma negativa, los receptores AMPA y kainato. Se ha comprobado que la THP no sólo potencia la función del receptor GABA<sub>A</sub>, sino que aparentemente también es capaz de prevenir la supresión de su actividad a través de PKC [45,46,131].

Otros estudios han revelado que la alopregnenolona reduce significativamente los cambios inducidos por glutamato en las concentraciones intracelulares de calcio en modelos de neurotoxicidad hipocámpal. La progesterona administrada en ratas en forma crónica o aguda, disminuye la extensión de la zona cerebral dañada en modelos de isquemia tanto en ratas macho como hembra y reduce también el edema cerebral que sigue a estos episodios de trauma cerebral.

Las células gliales han mostrado ser un importante blanco de la progesterona, ya que diversos estudios sugieren la participación de esta hormona en la regeneración y mielinización después de eventos traumáticos en sistema nervioso central y periférico. En ratas con la médula espinal seccionada, el tratamiento con progesterona aumenta el número de astrocitos que expresan NADPH-diaforasa (sintasa de óxido nítrico) y la expresión de la proteína básica de mielina (MBP) así como el número de células precursoras de oligodendrocitos que expresan el proteoglicano condroitin sulfato NG2 [67].

### 1.3.3 Corticoesteroides

El eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) es importante para el control homeostático; y los disturbios de la homeostasis o estrés inducen su activación. Las neuronas

parvocelulares en el núcleo hipotalámico paraventricular (PVN) liberan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), causando la liberación de la hormona adrenal corticotropina, misma que permite la secreción de glucocorticoides (GCs) [152].

Los glucocorticoides (corticoesterona en rata) regulan negativamente su propia liberación. La corticoesterona regula su propia secreción a través de retroalimentación negativa por interacción con dos receptores que difieren en su afinidad. Los receptores tipo I, llamados también receptores a mineralocorticoides (MR), tienen gran afinidad por corticoesterona y están prácticamente saturados con los niveles diurnos de corticoesterona, mientras que los receptores tipo II, llamados receptores a glucocorticoides (GR) presentan afinidad baja por la hormona y están saturados durante la fase nocturna. Parte de esta regulación ocurre en la glándula pituitaria y el PVN. Sin embargo, otras áreas del cerebro como el hipocampo, el cual proyecta al PVN, también ejercen control sobre la actividad del eje HPA. Estas proyecciones límbicas son transmitidas vía interneuronas GABAérgicas [41,120,152].

Los glucocorticoides son esteroides adrenales secretados durante periodos de estrés cuya función es esencial para la adaptación ante estrés agudo. Los GCs tienen efecto sobre una amplia variedad de tejidos. En tejidos periféricos, la exposición aguda a estos esteroides puede resultar patogénica por sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, características que suelen influir en el establecimiento de condiciones patológicas como osteoporosis, hipertensión arterial y diabetes tipo II.

Las hormonas GCs presentan una influencia importante en la plasticidad hipocampal durante la vida adulta. En roedores, se sabe que la supresión de corticoesterona en la circulación por adrenalectomización induce muerte neuronal y regula positivamente la neurogénesis. Sin embargo, se ha reportado que los glucocorticoides producidos en respuesta a estrés fisiológico o psicológico, pueden incrementar la vulnerabilidad de las neuronas hipocampales ante degeneración por excitotoxicidad o relacionada a la edad. Estudios en ratas con modelos de daño cerebral por isquemia y excitotoxicidad han demostrado la participación del estrés en el incremento de daño neuronal y que este

efecto está mediado en forma importante por glucocorticoides. De manera interesante, se ha encontrado que existe una respuesta alterada del eje HPA en pacientes con Alzheimer y que estas alteraciones incrementan los niveles de glucocorticoides en circulación, actualmente se sabe también que estas hormonas afectan la vulnerabilidad neuronal a los efectos del péptido  $\beta$ -amiloide [53,120].

La exposición prolongada a GC puede interrumpir la excitabilidad hipocampal y la LTP, afectando el aprendizaje espacial, inhibiendo la neurogénesis y causando atrofia dendrítica y en casos severos causando muerte celular. Elevadas concentraciones fisiológicas de GCs pueden comprometer la capacidad de las neuronas hipocampales para sobrevivir ante estímulos como hipoxia e isquemia, convulsiones inducidas por excitotoxicidad e hipoglucemia, y potenciar el daño que sobreviene a estos eventos, lo que finalmente, aumenta la pérdida neuronal [41].

Diversos estudios sugieren que los glucocorticoides pueden favorecer la muerte neuronal necrótica en hipocampo después de un accidente vascular cerebral, ya que estas hormonas comprometen el metabolismo de la glucosa y por lo tanto la generación de moléculas energéticas. Adicionalmente se ha demostrado que los GCs participan en el incremento de las concentraciones sinápticas de Glu, inducen movilización excesiva de calcio post-sináptico en el citosol y favorecen la acumulación de especies reactivas de oxígeno [145].

Con respecto al efecto de los glucocorticoides sobre la muerte de tipo apoptótico, se ha reportado que en tejidos periféricos, estas hormonas inducen apoptosis en una gran variedad de tipos celulares como son mioblastos, osteoblastos, osteocitos u osteosarcomas, en testículo y en linfocitos. Varios estudios sugieren que este efecto es mediado por sus receptores y dependiente de la síntesis de proteínas. Se ha reportado que en linfocitos se induce la expresión de  $I\kappa\beta$  y la inhibición de  $NF\kappa\beta$ . Otros estudios sugieren que los GCs degradan las moléculas antiapoptóticas c-IAP y XIAP. Algunos estudios más reportan la activación de calpaínas, liberación de citocromo C y colapso del potencial mitocondrial, o un influjo excesivo de calcio y la activación de endonucleasas

dependientes de calcio. En SNC se ha reportado que GCs sintéticos pueden causar cambios de tipo apoptótico en diferentes áreas del cerebro incluyendo el estriado y en cultivos de neuronas cerebrales, además incrementan la incidencia de apoptosis en hipocampo relacionada a la edad [126,150].

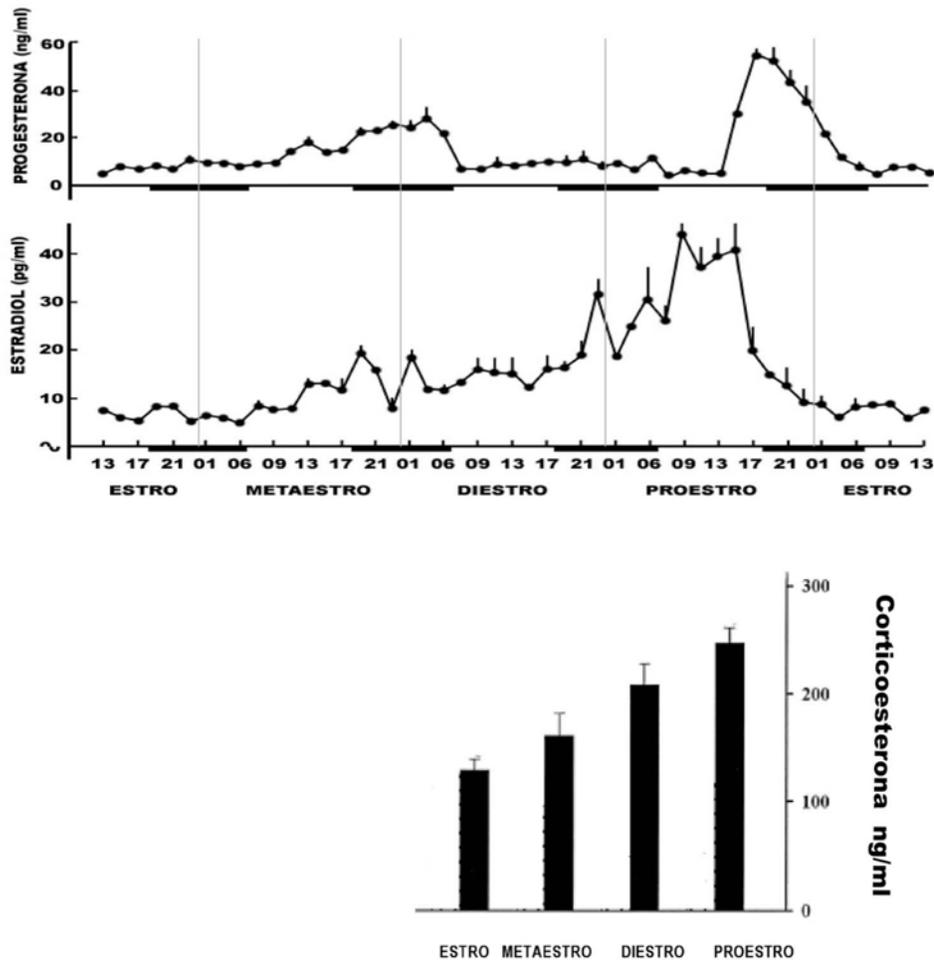
#### *1.4 Ciclo estral*

La rata es un mamífero de ovulación espontánea, la cual se lleva a cabo durante todo el año de acuerdo al ciclo estral del animal. El ciclo estral en rata tiene una duración de 4 a 5 días y está constituido por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro (diestro I) y diestro o (diestro II). La etapa del ciclo estral en la que el animal se encuentra, suele ser establecida mediante las características celulares del epitelio vaginal monitoreadas a través de un frotis de la región, ya que los cambios en las concentraciones séricas de hormonas reproductivas a lo largo del ciclo estral afectan la actividad del oviducto, útero, cervix y vagina, entre otros órganos [47].

El estradiol es una hormona secretada por los folículos de Graff en desarrollo, específicamente por las células de la teca y las células de la granulosa. Durante el ciclo estral, los niveles basales de estradiol en plasma se registran durante el estro ( $8 \pm 2$  pg/ml) y comienzan a elevarse hacia la tarde del diestro 1 alcanzando su máximo nivel durante el proestro ( $45 \pm 2$  pg/ml), en la tarde del estro los niveles de esta hormona decaen rápidamente a niveles basales iniciando nuevamente el ciclo [21,43,47].

El aumento de estradiol en circulación que caracteriza la etapa de proestro, permite la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) desde el hipotálamo, misma que induce la liberación de hormona luteinizante (LH) en la hipófisis, por lo que la presencia, en sangre periférica, de esta hormona se incrementa en la tarde del proestro alcanzando su máximo nivel en esta misma etapa ( $37 \pm 5$  ng/ml), lo que permite la ovulación en las primeras horas del estro. Con respecto a las otras etapas del ciclo estral, se sabe que la concentración de LH permanece a niveles basales desde la mañana del

estro hasta el diestro II, así mismo, ha sido determinado que la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) y prolactina es similar a la de LH [26,43,47].



**Figura 3. Hormonas esteroides en el ciclo estral.** La concentración de hormonas esteroides varía considerablemente a lo largo del ciclo estral, el pico máximo de progesterona (a) se registra al final de la etapa de proestro, mientras que el estradiol (b) alcanza su máximo nivel al inicio de la misma y los niveles de corticoesteroides (c) se encuentran en niveles basales durante el estro y aumentan en los siguientes días. Tomado de las ref. [7,47] (modificado).

La secreción de progesterona también presenta cambios importantes durante el ciclo estral, la primera secreción de esta hormona en el ciclo estral está dada por las células de la granulosa del folículo preovulatorio durante la noche del proestro ( $46 \pm 7$  ng/ml). Durante la mañana del estro, las concentraciones de progesterona en sangre son basales

( $2 \pm 1$  ng/ml), sin embargo se registra un segundo pico al medio día del diestro I ( $24 \pm 3$  ng/ml) mismo que se prolonga hasta las primeras horas del diestro II y vuelve a niveles basales poco después [26,43].

La concentración de la hormona corticoesterona varia a lo largo del ciclo estral, los niveles más bajos se registran durante el estro ( $129 \pm 11$  ng/ml) e incrementa progresivamente en los siguientes días, teniendo una máxima concentración en sangre durante la etapa de proestro ( $246 \pm 14$  ng/ml) [7,47].

### ***1.5 Periodo de Lactancia***

El ciclo reproductivo en mamíferos es un proceso complejo que comprende varias etapas como son el cortejo, apareamiento, ovulación, gestación, parto y lactancia. Durante cada etapa del ciclo reproductivo se producen cambios fisiológicos en el sistema neuroendócrino, que regula las funciones reproductivas entre otras, las asociadas al cuidado de las crías. Uno de los principales papeles del sistema endócrino en mamíferos es la sincronización del desarrollo mamario y su función con el estado reproductivo del animal y la demanda alimenticia de la progenie [140,155].

La sobrevivencia de la nueva progenie en mamíferos depende principalmente de un adecuado suministro de leche desde la glándula mamaria por un periodo variable de tiempo después del parto. La leche que es secretada inmediatamente después del parto se denomina calostro y contienen altas concentraciones de anticuerpos que confieren inmunidad pasiva a la descendencia; subsecuentemente, la secreción de la glándula mamaria desarrolla un fluido que provee todos los nutrientes requeridos para el desarrollo y sobrevivencia de la progenie. La lactancia constituye la última etapa del ciclo reproductivo en mamíferos y puede ser dividida en dos procesos básicos bajo el control de diferentes mecanismos endócrinos [149].

El periodo de lactancia en ratas se caracteriza por una serie de cambios fisiológicos y conductuales asociados a fluctuaciones drásticas en los niveles de hormonas y sus receptores. Las hormonas que intervienen durante el estado reproductivo del animal pueden clasificarse en dos grandes grupos; reproductivas y metabólicas [64].

Los niveles de las hormonas reproductivas, entre las que se incluyen estrógenos (E), progesterona (P), lactógeno placentario (PL), prolactina (PRL) y oxitocina, cambian con el estado reproductivo, y ejercen sus efectos sobre la glándula mamaria.

Las hormonas metabólicas tienen como función principal coordinar la respuesta corporal del animal ante los cambios metabólicos y el estrés. Entre estas, se sabe que la hormona de crecimiento interviene en el desarrollo de los ductos mamarios, mientras que los corticosteroides y la hormona tiroidea son necesarios para la secreción de la leche. En general, los cambios en los niveles sistémicos de las hormonas metabólicas regulan directamente la síntesis y secreción de leche alterando el flujo de nutrientes a la glándula mamaria lactante, órgano endócrino que sintetiza y secreta hormona de crecimiento (GH), péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP), leptina y PRL durante el estado reproductivo [100].

El inicio de la lactancia o lactogénesis es el periodo en el que se da la diferenciación de la glándula mamaria a través de una casacada de eventos definidos en dos estados, durante el primero de estos las células alveolares se diferencian citológica y enzimáticamente durante el último tercio de la gestación en la mayor parte de las especies; durante la segunda parte de esta fase se da una gran secreción de leche alrededor de uno a cuatro días antes del momento del alumbramiento [101].

La regulación hormonal de la lactagónesis no se encuentra completamente caracterizada, sin embargo, se conoce que los requerimientos mínimos de la lactogénesis involucran la secreción de PRL, GCs, PL y estradiol así como altos niveles de progesterona, ya que esta hormona aparentemente inhibe la secreción activa de leche. Durante esta etapa de la lactancia, se ha reportado que existe un incremento importante en la síntesis de enzimas,

metabolitos y la transcripción de genes asociados que codifican componentes de la leche entre ellos; lactosa,  $\alpha$ -lactoalbúmina, lactoglobulinas, caseína, triglicéridos de la grasa láctea y citrato en el caso de los rumiantes [19,54,149] .

Cerca del parto, la glándula mamaria sufre una serie de cambios que permiten la secreción del calostro y posteriormente de leche. Esta fase es denominada lactogénesis 2 y a nivel molecular se caracteriza por incremento drástico en la expresión de proteínas de la leche, el cierre de uniones estrechas entre las células alveolares y el movimiento de lípidos citoplasmáticos y micelas de caseína hacia el lumen alveolar (fig. 3). La formación del calostro se acompaña de un incremento en la transferencia de inmunoglobulinas y otras sustancias protectoras. Durante esta fase, se registra una baja en los niveles de progesterona y un aumento en los niveles circulantes de prolactina. Con el estímulo de succión que ejercen las crías, se da un nuevo incremento en la expresión de la mayor parte de los genes involucrados en la secreción de leche y, finalmente, ocurre una última división celular que permite la expansión del epitelio alveolar [100,101].

La segunda fase de la lactancia involucra la actividad secretora del tejido mamario durante el periodo de posparto, esta actividad generalmente es paralela a la demanda de leche por parte de la progenie, por lo que la intensidad del estímulo de succión por parte de las crías es un factor determinante durante este periodo. El efecto de succión sobre la glándula mamaria estimula la lactancia en al menos dos formas, primero reduce los efectos inhibidores de una alta presión intramamaria y la acumulación continua de la leche, por otro lado es un estímulo que causa un incremento importante en la secreción de varias hormonas necesarias para la síntesis continua de leche tales como prolactina, hormona de crecimiento, adenocorticotropina (glucocorticoides), hormonas tiroideas, insulina y hormona paratiroide [149]. Una vez que ha iniciado, la lactancia es mantenida por la remoción de leche de la glándula mamaria. En este proceso participan dos hormonas principalmente; la PRL, que actúa sobre las células del epitelio luminal para mantener la secreción de leche y la oxitocina que actúa sobre las células mioepiteliales para producir la secreción de leche [87,100].

Una vez que el estímulo de succión termina, ocurre la involución, y el epitelio secretor es remodelado lo que permite que regrese al estado inicial. Las señales involucradas en la fase de involución son principalmente de tipo local. La respuesta local ante el estado hormonal durante la diferenciación de la glándula mamaria, se debe en gran parte a factores de crecimiento, particularmente TGF- $\beta$ , IGF1, factor de crecimiento hepático y anfiregulina [87,148].

## **Planteamiento del problema**

Numerosos estudios han demostrado que las hormonas esteroides ováricas, progesterona y estradiol tienen un efecto protector ante estímulos tóxicos en SNC, por otro lado, se sabe que los glucocorticoides pueden exacerbar el daño neuronal producido por estímulos excitotóxicos.

A fin de conocer el efecto de la excitotoxicidad inducida por ácido kaínico en el hipocampo de la rata en una condición fisiológica caracterizada por bajos niveles de hormonas ováricas, y una alta concentración relativa de glucocorticoides, se trataron ratas hembra adultas durante el periodo final de la lactancia, misma que presenta las condiciones hormonales ya mencionadas. Aunado a lo anterior, ha sido reportado que el retirar las crías a las ratas madre antes de que se complete la lactancia se induce un rápido decremento de hormonas ováricas.

Otra condición fisiológica en la que las concentraciones séricas de hormonas esteroides ováricas son bajas, muy similares a las observadas durante el final de la lactancia, es la etapa diestro 1 o metaestro del ciclo estral, sin embargo, durante este periodo no hay un incremento de glucocorticoides.

Por lo anterior, se usaron ratas en diestro 1 y lactancia para evaluar la importancia y participación de las hormonas esteroides: progesterona, estradiol y corticoesterona, en el daño en el hipocampo inducido por kainato administrado intraperitonealmente

## **Hipótesis**

Al final de la lactancia las concentraciones de esteroides sexuales bajan a niveles similares a los observados en el diestro, sin embargo los glucocorticoides se encuentran elevados.

Si las hormonas esteroides sexuales son necesarias para mantener la funcionalidad e integridad neuronal, entonces al término de la lactancia habrá una susceptibilidad diferente al daño neuronal inducido por kainato.

## **Objetivo general**

Estudiar la susceptibilidad a daño neuronal inducido por kainato en el hipocampo de la rata, durante el término de la lactancia y su relación con los niveles de hormonas esteroides en sangre periférica.

## **Objetivos particulares**

1. Investigar la distribución de muerte celular inducida por exposición a ácido kaínico en el hipocampo de ratas lactantes y en diestro.
2. Estudiar los niveles de hormonas ováricas al final del periodo de lactancia.
3. Identificar la distribución del receptor a estrógenos alfa en CA1 , CA3 y giro dentado del hipocampo en la etapa de diestro I y en el periodo final de la lactancia.
4. Analizar si el daño neuronal producido por ácido kaínico en el hipocampo de la rata durante la lactancia induce la expresión de genes que participan en el proceso de muerte celular programada y su relación con el contenido, la distribución y localización celular del receptor a estrógenos alfa.

## **Metodología**

### ***Animales***

#### ***Ratas lactantes***

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar de 250-300 gramos de peso corporal, primigestas, mantenidas en observación a partir del último tercio de gestación. Las camadas se ajustaron a 8-12 crías. Todos los animales fueron mantenidos en ciclos luz/oscuridad (12hrs/12hrs), temperatura estándar (22°C) y comida, *ad libitum*.

En la primera parte del estudio se manejaron grupos de ratas que permanecieron con sus crías hasta el momento del sacrificio y grupos de ratas a las que se retiraron las crías 24 hrs antes de la administración del tratamiento. Durante la segunda parte del estudio las ratas permanecieron con sus crías hasta el día del sacrificio.

#### ***Ratas en diestro***

Se usaron ratas hembras en las que se monitoreó el ciclo estral a partir de la semana 10 de edad mediante frotis vaginal. Tras cuatro ciclos normales los animales fueron tratados en la etapa de diestro 1 o metaestro. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de luz y temperatura (22°C) y comida *ad libitum*.

### ***Tratamientos***

La lactancia en la rata tiene una duración de alrededor de tres semanas o 21 días, hacia el final de ésta, entre los días 18 a 20 las ratas adultas fueron tratadas. Los animales que fueron separados de sus crías se aisalaron el día 18 postparto. La administración de vehículo o ácido kaínico se realizó vía intraperitoneal el día 19 de la lactancia y el sacrificio de los animales por perfusión intracardial se llevó a cabo el día 20 de la lactancia. Los experimentos fueron

realizados entre las 10 y 12 hrs del día.

Las ratas que fueron utilizadas en la etapa de diestro 1 del ciclo estral fueron tratadas después de dar seguimiento a cuatro ciclos normales. El tratamiento utilizado para cada grupo de animales en la primera parte del estudio se resume en la tabla 1, mientras que la tabla 2 muestra el tratamiento utilizado en la segunda parte del mismo.

La solución vehículo y de ácido kaínico fue administrada vía intraperitoneal de acuerdo al peso del animal. El vehículo usado fue buffer de fosfatos de sodio (PBS) mismo que se utilizó para disolver el ácido kaínico.

### ***Concentraciones séricas de hormonas***

Las mediciones de los niveles de estradiol, progesterona, prolactina y corticoesteroides se realizaron mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) en muestras de suero obtenidas por centrifugación de 1 ml de sangre a 14 000 rpm durante 5 minutos.

Las ratas en lactancia fueron sangradas vía ocular en los días 12, 14, 16, 18 y 20 de la lactancia alrededor del medio día. Se diseñó un esquema para obtener muestras de sangre de 4-6 animales en cada punto experimental sin que fuera necesario utilizar al mismo animal en más de dos ocasiones ni en puntos consecutivos. Las muestras de sangre de ratas ciclando se obtuvieron vía ocular en diestro 1 alrededor de las 10 hrs antes de aplicar el tratamiento y el día del sacrificio del animal.

### ***Obtención del tejido***

Después de 24 h de ser tratados los animales, fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital y perfundidos vía aorta ascendente con 250 ml de PBS seguido del mismo volumen de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer de fosfatos. Los cerebros fueron removidos y posfijados en PFA 4% toda la noche, posteriormente se colocaron en una

solución de sacarosa 20% y después en sacarosa 30% en PBS. Se llevaron a cabo cortes coronales de 30  $\mu\text{m}$  de grosor en hipocampo medio en criostato. Los cortes fueron almacenados en una solución crioprotectora (0.05 M PBS, 40% etilenglicol, 20% sacarosa) a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 1.** Esquema de tratamiento con vehículo y ácido kaínico en los diferentes grupos experimentales. Los animales fueron sacrificados 24 hrs después del tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Condición</b>	<b>Día/admon</b>	<b>Día/sacrificio</b>	<b>Dosis</b>
K1	vehículo	lactancia normal	L 19	L 20	---
K2	kainato	lactancia normal	L 19	L 20	5 mg/kg
K3	vehículo	separada L 18	L 19	L 20	---
K4	kainato	separada L 18	L 19	L 20	5 mg/kg
K5	vehículo	ciclo estral	D 1	D 2	---
K6	kainato	ciclo estral	D 1	D 2	5 mg/kg
K7	kainato	lactancia normal	L 19	L 20	7.5 mg/kg
K8	kainato	ciclo estral	D 1	D 2	7.5 mg/kg

Antes de cualquier proceso, los tejidos fueron lavados 3 veces durante 10 minutos en PBS por flotación, posteriormente se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina y se dejaron secar a temperatura ambiente (t.a), se dejaron en PBS a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche a fin de eliminar los residuos de la solución crioprotectora.

### ***Tinción con Violeta de Cresilo***

La morfología general del tejido se revisó mediante una tinción con Violeta de Cresilo. Los cortes fueron lavados, montados y secados en portaobjetos. El tejido se hidrató en  $\text{H}_2\text{O}$  durante 5 minutos y se incubó en la solución de violeta de cresilo durante 10 minutos. Las muestras fueron deshidratadas por 30 segundos en cada una de la siguientes soluciones: etanol (EtOH)

50, 75, 96 y 100% , Xilol-EtOH (1:1) y Xilol 100% para ser finalmente montadas en Clarion y analizadas en microscopía de campo claro.

### ***Inmunohistoquímica por fluorescencia***

Para el doble inmunomarcaje de Caspasa-3 activada/proteína nuclear neuronal específica (Neu-N), las muestras fueron tratadas con citrato de sodio 0.1% en H<sub>2</sub>O durante 1 h a 4 °C; posteriormente, se dio un tratamiento con Tritón X-100 al 3% en PBS durante 1 h y se preincubaron con BSA al 5% en PBS por 1 h. La incubación con el anticuerpo de ratón anti-NeuN (1:100, Chemicon) se realizó en PBS durante toda la noche. Las muestras fueron lavadas en PBS e incubadas en oscuridad durante 2 h con el anticuerpo anti-ratón fluoresceinado (1:100, Zymed), seguido de lavados con PBS y su posterior incubación protegido de la luz durante 72 hrs a 4°C con el anticuerpo de conejo anti-caspasa 3 activa (1:50; BioVision). Las muestras fueron lavadas en PBS e incubadas durante 2 h con el anticuerpo de cabra anti-conejo rodaminado (1:100, Chemicon). Finalmente las muestras se lavaron con PBS e incubaron en una solución de Hoechst Hoechst 33258 (1µg/ml; Molecular Probes) en PBS durante 5 min a t.a. para ser montadas con medio de montaje DAKO y analizadas en microscopio de fluorescencia.

### ***Inmunohistoquímica***

La localización de las proteínas ER- $\alpha$ , c-fos y Bcl-2 se realizó por inmunohistoquímica revelada por peroxidasa y diaminobencidina (DAB). Las muestras fueron montadas y lavadas como ya se ha descrito. La peroxidasa endógena fue bloqueada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% en H<sub>2</sub>O desionizada durante 30 minutos a t.a, posteriormente los tejidos fueron tratados con NaBH<sub>4</sub> al 1% en PBS por 8 minutos. Las secciones fueron lavadas en PBS y preincubadas en una solución de BSA al 5% en PBS durante 1 h. Se utilizó el anticuerpo de conejo anti-ER $\alpha$  (1:50, Santa Cruz) y el anticuerpo de cabra anti-Bcl 2 (1:50, Santa Cruz) en PBS durante 48 hrs a 4°C. El tejido fue lavado con PBS e incubado con el anticuerpo secundario biotinilado

correspondiente durante 1 h en PBS a temperatura ambiente (t.a.). Posterior al enjuague con PBS las muestras se incubaron 1 h con el complejo Avidina-Biotina preparado en PBS 30 minutos antes. El revelado se realizó con DAB, los tejidos fueron deshidratados en EtOH 50, 75, 96 y 100%; Xilol-EtOH y Xilol 100% antes de ser montados en Clarion. Las preparaciones se analizaron con microscopía de luz.

### ***TUNEL***

La detección de DNA fragmentado *in situ*, se realizó mediante la técnica de terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated rhodamine-dUTP nick-end labelling (TUNEL). Los tejidos fueron lavados en PBS, montados y secados en portaobjetos como se describió anteriormente. Las secciones fueron pretratadas 30 minutos con MetOH 100%, proteinasa K (50 µg/ml) 10 minutos a 37°C y Tritón X-100 al 3% en citrato de sodio al 0.1% en frío por 2 minutos. Cada muestra fue incubada durante 2 h a 37°C en 30 µl de solución de TUNEL preparada de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Roche). El control positivo consistió en tejido tratado con DNasa a 37°C por 10 minutos, mientras que en el control negativo se omitió la enzima TdT. Los cortes fueron contrateñidos con Hoechst 33258 (1µg/ml; Molecular Probes) 5 min a t.a y montados con medio para fluorescencia (DAKO).

### ***Fluoro-Jade***

El Fluoro-Jade es un derivado aniónico tribásico de la fluoresceína con peso molecular alrededor de los 445 daltones que presenta un pico de emisión de 550 nm y un pico de excitación entre los 362 y 390 nm y es utilizado en la identificación de neuronas en degeneración, ya que se une a los procesos y somas de estas células por un mecanismo molecular aún no dilucidado en el que se cree está implicada la afinidad por una proteína específica de neuronas que sufre acidificación durante procesos de degeneración y muerte celular, ya sea apoptosis o necrosis [16,72,127,128].

Los tejidos fueron lavados, montados y secados en portaobjetos. La rehidratación del tejido se realizó con NaOH 1% en EtOH 80% durante 5 minutos, EtOH 70% 2 minutos y ddH<sub>2</sub>O (doble destilada) 2 min. Las secciones se trataron con KMnO<sub>4</sub> 0.06% 10 minutos en agitación seguido de un enjuague con ddH<sub>2</sub>O por 2 minutos. Las muestras fueron incubadas en agitación durante 20 min en una solución de Fluoro-Jade al 0.0004% en ácido acético al 0.1%, posteriormente se enjuagaron 3 veces en ddH<sub>2</sub>O durante 5 min. Los cortes se secaron a 50°C de 5 a 10 minutos, antes de ser montados en Clarion se trataron 1 minuto en Xilol al 100%.

### ***Cuantificación celular y densitometrías***

La cuantificación de las células positivas a caspasa-3 activa/Neu-N se realizó por observación directa al microscopio en aumentos de 20 y 40X. La cuantificación de núcleos positivos a TUNEL se llevó a cabo de la misma forma y mediante el análisis de fotografías de las diferentes áreas del hipocampo en 20X.

Las densitometrías realizadas para las inmunohistoquímicas de ER- $\alpha$ , Bcl-2 y Fluor Jade se llevaron a cabo por fotografías en 20X de las diferentes áreas de interés y con apoyo del programa Zeiss 300.

### ***Análisis estadístico***

Los niveles de expresión de las proteínas Bcl-2 y ER-alfa obtenidos de las inmunohistoquímicas, en corteza y las diferentes áreas del hipocampo en ratas lactantes y en diestro cuantificados por densitometría, fueron comparados a través de una prueba-t de student. Del mismo modo se llevó a cabo el análisis comparativo entre los núcleos positivos a TUNEL y células teñidas con Fluoro-Jade en los tejidos de los animales sometidos a los diferentes tratamientos, mediante una prueba t de student. En todos los casos el nivel de significancia se consideró con  $p < 0.05$ .

## Resultados

En la primera parte de este estudio se formaron dos grupos de ratas en la etapa de lactancia (n=36), en el primero de ellos, se permitió que las ratas se mantuvieran con sus crías desde el inicio de la lactancia hasta el momento en que fueron sacrificadas, en este grupo se incluyó también un conjunto de ratas tratado con 5 mg/kg de ácido kaínico el día 19 posparto y un grupo control, al cual se le administró vehículo hacia el mismo día.

El segundo grupo se constituyó con ratas lactantes, las cuales se mantuvieron con sus crías desde el inicio de la lactancia y les fueron retiradas hacia el día 18 posparto. Nuevamente, se conformaron dos subgrupos, con una n de 4 cada uno. El primero fue tratado con 5 mg/kg de ácido kaínico 24 hrs después de que les fueron retiradas las crías y al segundo se le administró vehículo. Las ratas de ambos grupos fueron sacrificadas el día 20 de la lactancia.

Como animales control se utilizaron ratas en la fase de diestro 1 o metaestro del ciclo estral. El ciclo estral de los animales fue monitoreado mediante frotis vaginal, una vez que se registraron 4 ciclos normales, los animales fueron separados en dos grupo con una n de 4. El primer grupo de ratas fue tratado en la etapa de diestro 1 con 5 mg/kg de ácido kaínico vía intraperitoneal, mientras que al segundo grupo se le administró vehículo. Los animales fueron sacrificados 24 hrs después del tratamiento.

Para la realización de la segunda fase del estudio, se trataron dos grupos de animales. El primero de ellos contempló ratas hacia el final del periodo de lactancia, quienes mantuvieron a sus crías desde el inicio de la misma hasta que fueron sacrificadas. En este primer bloque se trataron 4 ratas con ácido kaínico en una dosis de 7.5 mg/kg y 4 animales más con vehículo, como en el caso anterior, los animales fueron inyectados vía i.p. el día 19 de la lactancia y perfundidos 24 hrs después. El segundo bloque se conformó con ratas en la etapa de diestro, nuevamente se formaron dos grupos de 4 animales cada uno, el correspondiente a vehículo y el de animales administrados con ácido kaínico en una dosis de 7.5 mg/kg. Los animales fueron tratados en la etapa de diestro 1 y sacrificados 24 hrs después.

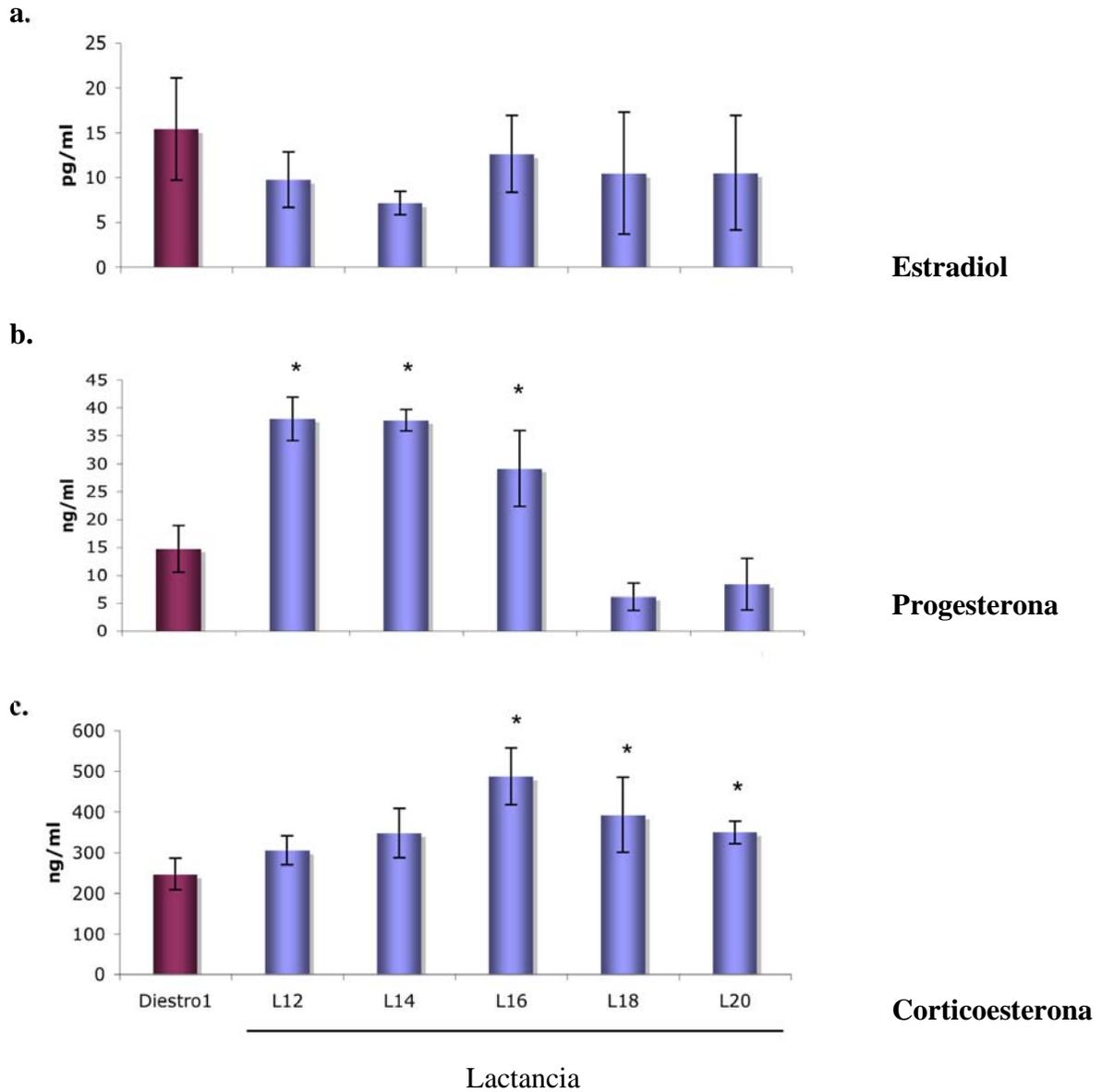
### ***Concentración de hormonas esteroides al final de la lactancia***

El inicio de la lactancia se caracteriza por bajos niveles en circulación de hormonas esteroides ováricas, se ha reportado que hacia el día 10 de este periodo hay un decremento en los niveles de progesterona y estradiol circulantes en la rata, comparables con los que se presentan en el metaestro del ciclo estral. Los niveles de hormonas esteroides en circulación, tanto en ratas lactantes como ratas en diestro, fueron analizados por radioinmuno-ensayo. Se obtuvieron muestras de alrededor de 1 ml de sangre periférica de los animales vía ocular, de las que se obtuvieron alrededor de 500  $\mu$ l de suero; para las ratas en lactancia se tomaron muestras en los días 12, 14, 16, 18 y 20 de la lactancia, para las ratas en diestro, la muestra fue obtenida en diestro 1.

Los resultados indican que los niveles hormonales de las ratas en el periodo final de la lactancia son similares a los que encontramos en la etapa de diestro 1 del ciclo estral. Los niveles de estradiol que se obtuvieron en ratas lactantes del día 12 al día 20 se encuentran alrededor de los 10 pg/ml, mientras que en diestro 1, los niveles de esta hormona se ubican cerca de los 15 pg/ml (fig. 4a).

Durante el inicio de la segunda etapa de la lactancia, entre los días 12 a 14, los niveles de progesterona en circulación son particularmente elevados, manteniéndose arriba de los 30 ng/ml y comienzan a disminuir notablemente hacia el día 16 de este periodo teniendo niveles bajos hacia los últimos días de la lactancia, en los que se presentan en concentraciones, semejantes ( $< 10$  ng/ml) a las encontradas durante la etapa de diestro 1 (15 ng/ml) (fig. 4b).

Los niveles de corticoesterona registrados en ratas entre los días 12 a 20 de la lactancia indican que esta hormona se mantiene en concentraciones por arriba de los 300 ng/ml con un incremento notable hacia el día 16 de este periodo y posteriormente disminuye en forma discreta. Las ratas en diestro presentaron niveles de corticoesterona que no sobrepasan los 300 ng/ml, aunque se encuentran cercanos a las concentraciones encontradas entre los días 12 y 14 de la lactancia (fig. 4c)



**Figura 4. Niveles de hormonas esteroides.** (a) Los niveles de estradiol en ratas lactantes son bajos, similares a los encontrados en diestro 1. (b) Los niveles de progesterona del día 12 al día 20 de la lactancia detectados por RIA se encuentran cerca de los 40 ng/ml y decaen drásticamente al final del periodo de lactancia hasta niveles similares a los encontrados en ratas en diestro 1. (c) La corticoesterona en ratas lactantes alcanza sus mayores niveles hacia en día 16 de este periodo, las ratas en diestro mantienen concentraciones séricas de la hormona relativamente bajas;  $p < 0.05$  (con respecto a diestroI)

## ***Daño celular por ácido kaínico***

### *Morfología del Hipocampo*

La morfología del hipocampo en los grupos tratados fue revisada mediante una tinción con violeta de cresilo. En general se pudo observar que en el hipocampo de los animales tratados con 5 mg/kg de ácido kaínico durante la etapa diestro 1 del ciclo estral, se presenta un adelgazamiento del estrato piramidal y granular en la regiones CA1 y el giro dentado respectivamente. Para la región CA3 se registró una pérdida de la organización estructural en el estrato de neuronas piramidales en comparación con las mismas áreas de tejidos de animales tratados con vehículo. El análisis de los tejidos de ratas durante la etapa de lactancia tratadas 5 mg/kg de ácido kaínico separadas de sus crías y no separadas de sus crías no mostró diferencias evidentes. La observación de las regiones CA1, CA3 y giro dentado en ambos casos, indica que en apariencia no hay cambios morfológicos en el hipocampo de los animales tratados con ácido kaínico en la dosis mencionada con respecto a los animales tratados con vehículo (fig. 5).

El tratamiento de ratas en diestro 1 con 7.5 mg/kg de ácido kaínico generó una disminución marcada de la densidad celular en el estrato piramidal de la región CA1 y el estrato de neuronas granulares en el giro dentado, mientras que en CA3 la desorganización de neuronas piramidales fue más pronunciada con respecto a otras áreas de la región hipocampal y se pudo observar una disminución importante de la densidad celular. Las ratas lactantes tratadas con la misma dosis de kainato presentan cambios en la morfología neuronal de las tres áreas hipocampales estudiadas. Las células que constituyen el estrato piramidal se muestran disminuidas en tamaño y la capa celular se observa compacta en comparación con la misma área en tejidos de animales tratados con vehículo. La densidad celular tanto en CA1, CA3 y giro dentado se ve disminuida en forma importante, principalmente el estrato piramidal en la región CA3; sin embargo el daño que se presenta es menor al que se puede apreciar en las mismas zonas del hipocampo de los animales tratados con kainato en la etapa diestro 1 del ciclo estral (fig 5).

### *Activación de Caspasa-3 por ácido kaínico*

El mecanismo de excitotoxicidad por glutamato en hipocampo, mediado por receptores de NMDA ha sido ampliamente estudiado tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*. Con respecto al daño neuronal inducido por excitotoxicidad a través de receptores a kaínato, varios estudios señalan que el principal mecanismo por el que el ácido kaínico induce la muerte neuronal es a través de apoptosis; sin embargo, también existen reportes que indican que este agonista de glutamato genera degeneración celular mediante necrosis.

Con el fin de conocer la distribución de muerte celular por apoptosis producido en en las diferentes áreas del hipocampo por la administración de ácido kaínico en una dosis de 5 mg/kg vía intraperitoneal, tanto en ratas lactantes como en diestro 1, se realizó inmunofluorescencia contra caspasa-3 activa en cortes de hipocampo medio de los grupos experimentales.

Para la cuantificación de las células dañadas por kainato se tomaron en consideración aquellas que mostraron inmunomarcaje para caspasa-3 activada y núcleo picnótico identificado mediante cotinción con Hoeschst, compuesto que interactúa con DNA y puede ser visualizado mediante luz ultravioleta en el rango de los 500-540 nm. Adicionalmente se realizó una inmunofluorescencia doble para caspasa-3 activada y Neu-N, una proteína específica del núcleo de neuronas, con la finalidad de identificar el tipo celular que presenta el marcador de apoptosis.

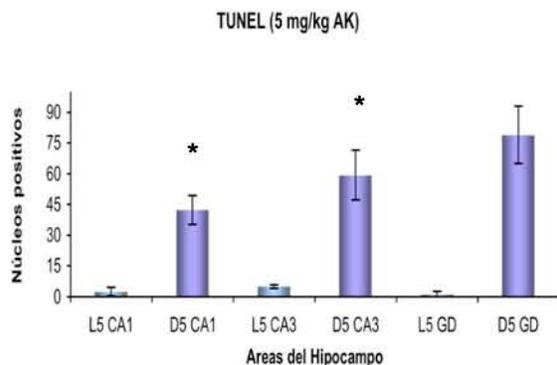
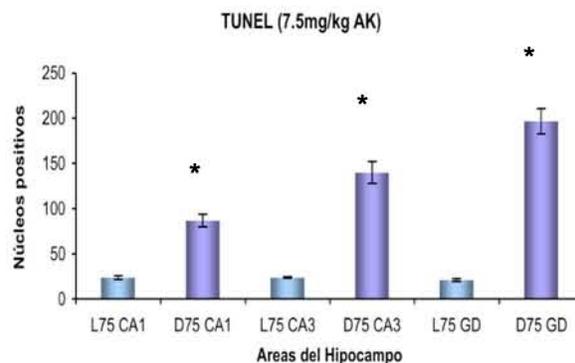
El inmuno-marcaje con caspasa-3 activa en el tejido de los diferentes grupos tratados mostró una mayor cantidad de células dañadas por la administración i.p. de ácido kaínico en la ratas en diestro 1. Las áreas estudiadas en el hipocampo fueron CA1, CA3 y el giro dentado. En general, se observó un mayor número de células marcadas por caspasa-3 activada en las tres áreas mencionadas en ratas tratadas durante el diestro 1 en comparación con lo registrado para ratas tratadas durante el periodo final de la lactancia (K6 vs. K4), el análisis estadístico empleado indica que estas diferencias son estadísticamente significativas con una  $p < 0.05$  (fig. 6).

De manera interesante, el uso de este marcador de muerte celular, permitió observar que en apariencia, las ratas separadas de sus crías durante 24 h antes del tratamiento, no presentan un patrón diferencial de daño celular con respecto a las ratas que no son separadas de sus crías durante el tratamiento, mismas que mantienen mayor número de células marcadas por caspasa-3 activada en el área hipocampal en respuesta a kainato que el observado en los animales tratados en diestro 1 (fig. 6).

A través del doble inmunomarcaje por fluorescencia, se observó que las células marcadas con el anticuerpo contra caspasa-3 activada en el hipocampo de ratas tratadas con kainato durante metaestro, presentan en su mayoría la proteína Neu-N (80%), lo cual indica que la caspasa-3 se mantiene activada principalmente en neuronas después de la administración de kainato, por el contrario en ratas lactantes tratadas con este agonista, las pocas células que presentan inmunomarcaje para la proteína caspasa-3 activa fueron negativas a la inmunohistoquímica con la proteína Neu-N.

#### *Detección de muerte celular por TUNEL*

La detección de daño celular utilizando el marcador de muerte por apoptosis, caspasa-3 activada, se realizó en tejidos obtenidos de animales tratados con una dosis mayor de ácido kaínico (7.5 mg/kg). Los resultados mostraron que la caspasa-3 activa no es un buen marcador de daño celular por ácido kaínico en ratas tratadas durante el periodo de lactancia y diestro 1 del ciclo estral, ya que el número de células positivas no coincide con el grado de daño en la morfología de las diferentes áreas del hipocampo, visualizado por la técnica de Nissl, por lo que se llevó a cabo el marcaje de DNA fragmentado mediante la técnica de TUNEL en las muestras obtenidas de animales tratados como se indica en las tablas 1 y 2. Los resultados mostraron un patrón de muerte, en los grupos tratados con 5mg/kg de ácido kaínico, muy semejante al ya descrito por la activación de la caspasa-3 activa.

**b****c**

**Figura 7. TUNEL.** a) Imágenes representativas del patrón de apoptosis detectada por TUNEL (ver página anterior) en tejidos obtenidos de animales tratados durante lactancia y diestro 1 con ácido kaínico. b) Cuantificación de los núcleos positivos a TUNEL en animales tratados con 5 mg/kg de ácido kaínico. c) Cuantificación de núcleos positivos a TUNEL en las diferentes áreas del hipocampo de animales tratados con 7.5 mg/kg de ácido kaínico. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las ratas tratadas en lactancia y diestro 1 en las diferentes áreas del hipocampo con ambos tratamiento ( $p < 0.05$ ).

La detección de muerte celular en hipocampo a través de este marcador se realizó en grupos de ratas tratadas con 7.5 mg/kg de kainato durante el diestro 1 y en ratas en el periodo final de la lactancia sin ser separadas de sus crías.

En los grupos tratados con una dosis mayor de ácido kaínico se observó nuevamente que la condición fisiológica en la que el ácido kaínico tiene mayores efectos con respecto a daño celular en el hipocampo, es durante la etapa de diestro 1 del ciclo estral (fig. 7), asimismo, se observó que estas diferencias se mantienen en las tres áreas estudiadas, CA, CA3 y GD.

El análisis estadístico empleado para comparar los resultados obtenidos, mostró diferencias significativas entre las ratas en diestro y lactantes tratadas con 5mg/kg de ácido kaínico en las tres áreas del hipocampo estudiadas, y que estas diferencias se mantienen aun con una dosis mayor de kainato.

### *Daño neuronal detectado por Fluoro-Jade*

Dado que existen reportes que señalan al proceso necrótico como la principal vía de muerte celular en procesos de excitotoxicidad inducida por kainato, se realizó una tinción histoquímica con fluorojade en el hipocampo medio de los animales tratados con 7.5 mg/kg de ácido kaínico vía i.p. con el fin de detectar daño neuronal de cualquier tipo, ya sea apoptótico o necrótico, inducido por ácido kaínico en los diferentes grupos tratados.

Los resultados obtenidos muestran un mayor daño de las diferentes áreas del hipocampo por administración de ácido kaínico en los tejidos de ratas tratadas durante la etapa del metaestro del ciclo estral en comparación con el daño observado por la misma técnica en el hipocampo de ratas tratadas durante la lactancia. El patrón de daño celular que se observó con el uso de ésta técnica coincide con el patrón observado por el empleo de TUNEL como técnica de detección de muerte celular.

El área más afectada por la administración de kaínato en ratas tratadas durante diestro 1 fue la región CA1 del hipocampo seguida del giro dentado y CA3. En ratas tratadas durante la lactancia, el daño celular detectado es bajo y la región más afectada es el giro dentado. Aunque el daño global en hipocampo en ambos tratamientos coincide con el observado por TUNEL, el número de células marcadas por ambas técnicas en regiones específicas de los tejidos obtenidos de ratas en diestro1 varía notablemente (fig. 8). En este sentido es importante considerar que la técnica de fluorojade pudiera estar aportando datos sobre el tipo de neurodegeneración que predomina en la región CA1, la cual, de manera tentativa, podría estar más relacionada a muerte necrótica y no a muerte apoptótica, de modo que la técnica de TUNEL no es adecuada para detectar el daño neuronal en esta área.

### ***Distribución del receptor a estrógenos alfa en el hipocampo***

En los últimos años, se han realizado varios estudios sobre el papel de las hormonas esteroides y sus receptores en sistema nervioso central, particularmente su efecto en áreas del cerebro implicadas en aprendizaje y memoria. Con respecto al efecto neuroprotector de las hormonas esteroides se han encontrado datos importantes que sugieren la participación de los receptores a estrógenos en la modulación de la estructura, función y sobrevivencia de neuronas. El efecto neuroprotector ejercido por estrógenos ha sido asociado principalmente a la presencia del receptor a estrógenos alfa (ER $\alpha$ ).

Los cambios cíclicos de los niveles de hormonas sexuales, particularmente estrógenos, dirigen muchos aspectos reproductivos en los animales, coordinando la función de poblaciones neuronales en el cerebro y regulando la actividad de los gonadotropos en la pituitaria. Estas variaciones en los niveles de estrógenos en circulación se han relacionado a la expresión de sus receptores y por tanto a su función.

Con el propósito de relacionar los niveles de estradiol en circulación y su acción a través del receptor a estrógenos alfa con el daño celular ocasionado por kainato en el hipocampo de ratas en la fase diestro 1 del ciclo estral y ratas en lactancia, se detectó la presencia del receptor a estrógenos alfa en las diferentes zonas del hipocampo a través de inmunohistoquímica en muestras de hipocampo medio tanto de ratas tratadas en lactancia como en diestro 1.

Los resultados muestran la presencia y distribución uniforme de este receptor en las diferentes áreas del hipocampo y no se observan cambios aparentes en la expresión de la proteína entre los diferentes grupos de ratas. El análisis estadístico muestra con una  $p > 0.05$  que no hay cambios significativos en la expresión de receptor a estrógenos alfa en el hipocampo medio de los animales durante la lactancia en relación a la etapa de diestro 1 (fig. 9), estos datos correlacionan con los niveles de estradiol en circulación.

## ***Expresión de Bcl-2***

La muerte celular por apoptosis es una vía altamente regulada en células de mamíferos, en la cual las proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 constituyen un importante punto de control para el daño irreversible de los constituyentes celulares.

El estudio de los elementos pro y antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 se ha realizado en diferentes tejidos, en el caso de sistema nervioso central, se sabe que la principal proteína antiapoptótica que participa en la supervivencia celular es Bcl-2 y que su expresión y función puede ser afectada tanto a nivel transcripcional como postraduccionial.

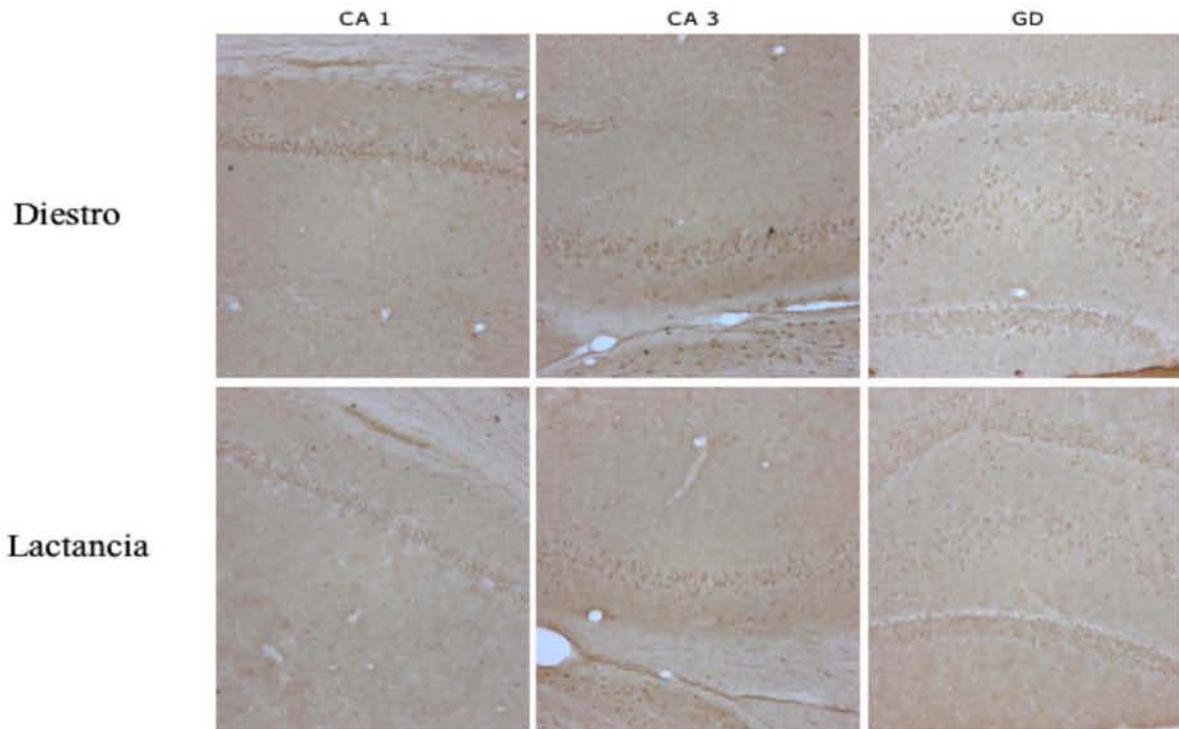
Mucho se ha investigado sobre la activación de esta proteína y su papel ante diferentes tipos de daño al sistema nervioso central, en el caso concreto de excitotoxicidad por ácido kaínico, se sabe que este agonista de glutamato afecta en forma importante la función de esta proteína dirigiendo el balance celular hacia muerte por apoptosis. Por otro lado, se sabe que la expresión de Bcl-2 es favorecida por elementos que participan en la protección celular ante daño, tales como hormonas y factores neurotróficos.

En este estudio se evaluó la expresión de la proteína Bcl-2 en hipocampo y corteza de animales en lactancia y diestro 1 a fin de correlacionar su presencia en las áreas cerebrales ya mencionadas con el efecto neuroprotector ante daño celular excitotóxico inducido por kainato durante la lactancia. Los resultados obtenidos, indican una mayor expresión de Bcl-2 en las células cerebrales de ratas durante la etapa de lactancia en comparación con la registrada para los tejidos de ratas en la fase de diestro 1 (fig. 10).

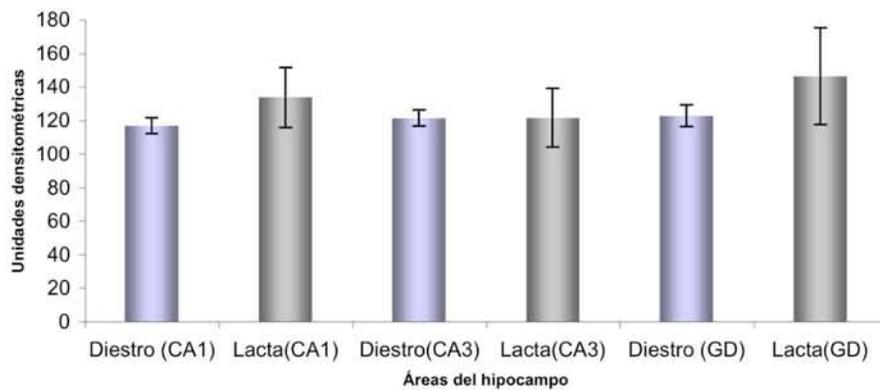
En cortes de hipocampo medio de ratas en diestro 1 se observó una menor expresión de Bcl-2 en comparación con CA1, CA3 y GD del hipocampo y la corteza entorrinal. Esta diferencia en la expresión de la proteína antiapoptótica correlaciona con el daño observado en las diferentes áreas del cerebro antes mencionadas, ya que en general se observó un mayor daño neuronal (medido por fluorojade) en corteza entorrinal (fig. 9)

Por otro lado, la expresión de Bcl-2 en el cerebro de ratas en lactancia es mayor con respecto a la registrada para ratas en diestro 1, y en general sigue el mismo patrón que el observado en estas últimas, es decir, su mayor expresión se da en corteza entorrinal e hipocampo mientras que corteza piriforme presenta una menor expresión. En estos tejidos, se observó una menor expresión de la proteína Bcl-2 en el área CA3 del hipocampo con relación a CA1 y GD, aparentemente esta área presenta niveles semejantes a los observado en tejidos de ratas en diestro 1, lo cual correlaciona con el daño celular registrado por tunel, no así con el observado por fluorojade. Estos datos sugieren la participación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en la neuroprotección observada durante el periodo de lactancia ante excitotoxicidad por ácido kaínico (fig. 10)

a.

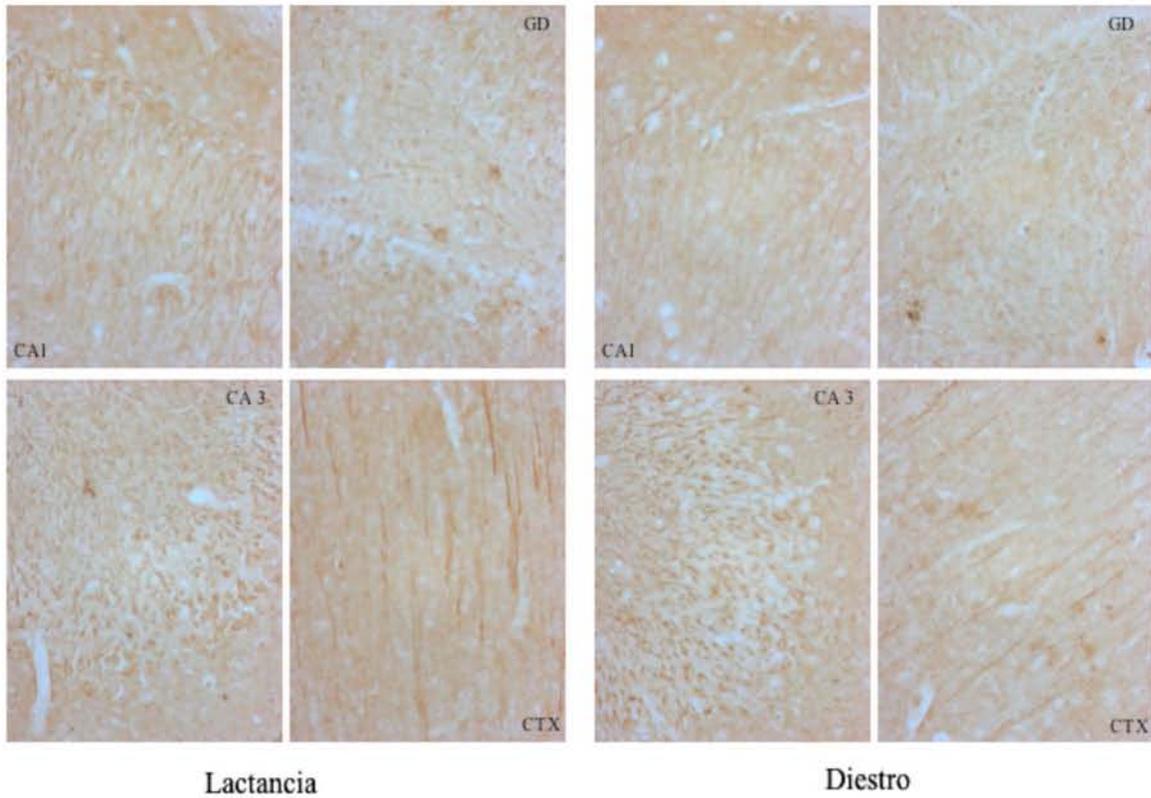


b.

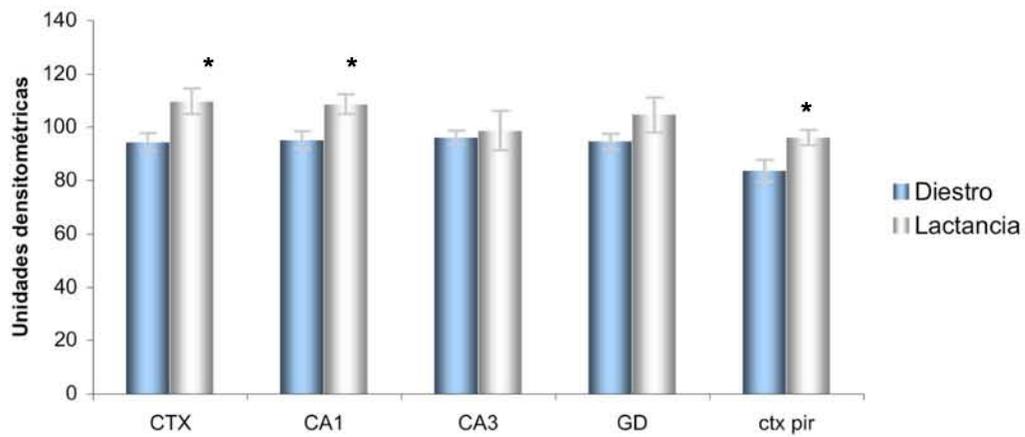


**Figura 9. Distribución de ER-alfa en el hipocampo.** a) Inmunohistoquímica representativa en muestras de ratas lactantes y en diestro en diferentes áreas del hipocampo. b) El análisis densitométrico no muestra diferencias significativas en los niveles de expresión del receptor a estrógenos alfa de ratas lactantes *versus* ratas en diestro 1 ( $p>0.05$ )

a.



b.



**Figura 10. Expresión de Bcl-2 en diferentes áreas del sistema nervioso central.** a) Inmunohistoquímica representativa para Bcl-2. b) Análisis densitométrico de la expresión de Bcl-2 en los diferentes grupos de animales utilizados. Estadísticamente se observó una mayor expresión de la proteína en los animales lactantes versus diestro 1 en corteza, CA1 y GD del hipocampo. En ctx piriforme se mantiene una menor expresión de la proteína con respecto a las otras áreas evaluadas ( $p < 0.05$ ).

## Discusión

El ácido kaínico es un agonista de glutamato que actúa sobre receptores AMPA y receptores a kainato. Su efecto sobre la región hipocampal se encuentra estudiado tanto en modelos *in vitro* [1,3,20,28,103,114] como modelos *in vivo* [71,94,96,115,124]. Los trabajos *in vivo* han sido realizados en animales machos ya que en hembras las hormonas esteroides ofrecen en apariencia un efecto neuroprotector [22,35,36].

En este estudio se evaluó el efecto del ácido kaínico en el hipocampo de *Rattus norvegicus* durante la lactancia, condición en la que los niveles de hormonas esteroides sexuales son bajos. Se demostró que la lactancia es una situación fisiológica que protege en forma significativa al hipocampo contra el daño neuronal inducido por este agonista de glutamato. Se concluye que la lactancia representa una condición fisiológica adecuado para estudios sobre los efectos neuroprotectores de las hormonas esteroides.

### *Hormonas esteroides y excitotoxicidad*

La concentración de hormonas esteroides sexuales, estradiol y progesterona, durante el ciclo estral de la rata, presenta variaciones importantes, los niveles más significativos de estas hormonas se presentan durante la etapa de proestro, mientras los niveles más bajos se dan en la etapa de estro y diestro 1. Los niveles de estradiol y progesterona, en ratas, durante los periodos de gestación y lactancia, se encuentran bien caracterizados, y se ha reportado que las concentraciones de estradiol, en circulación, aumentan después del día 16 de gestación (P16) y tienen su pico máximo en P22 cerca del tiempo de parto, por otro lado los niveles de progesterona en plasma se elevan hacia P14 y permanecen altos hasta P19 cuando comienzan a decrecer lentamente. Posterior al parto y durante la lactancia los niveles de estradiol son bajos y es hasta después de la primera semana de lactancia, cuando se registra un aumento de ésta hormona hasta niveles semejantes a los de diestro1. Con respecto a los niveles de

progesterona, se sabe que la concentración sérica de ésta hormona se mantiene elevada entre los días cuatro y diez de la lactancia y posteriormente disminuye [55,58].

Aunado al patrón de hormonas esteroides sexuales ya descrito, se ha documentado que durante los periodos de gestación y lactancia, se da un incremento importante en los niveles circulantes de glucocorticoides, en el caso de ratas, ha sido reportado un incremento significativo en la concentración sérica de corticoesterona durante la lactancia, y su participación se ha asociado al control de la regulación metabólica tanto en la producción como en la secreción de leche [100].

Durante el periodo final de la lactancia se observó un incremento importante en las concentraciones séricas de corticoesterona, lo que podría favorecer el daño celular en el área del hipocampo por kainato en ratas tratadas durante esta etapa reproductiva en comparación con ratas tratadas durante diestro 1.

Es importante mencionar que el objetivo principal de este trabajo fue el estudiar el efecto de la administración de kainato *in vivo* en las situaciones fisiológicas estudiadas, a fin de aportar nuevo conocimiento sobre el papel que juegan las hormonas esteroides sexuales en el SNC, si bien ha sido difícil encontrar un control adecuado para comparar los efectos tóxicos del kainato durante la lactancia, consideramos que las ratas durante la etapa de diestro 1 por su semejanza, en cuanto a niveles de hormonas esteroides que presentan, con relación a los de ratas en lactancia, fueron un control adecuado para los fines del estudio. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere evaluar en otros estudios el efecto de la administración de kainato a lo largo de la lactancia para poder establecer en forma sistemática cuál es la importancia de las hormonas durante la última fase de la misma.

#### *Daño celular en Hipocampo*

El daño celular en hipocampo inducido por ácido kaínico fue evaluado inicialmente a través de la técnica de Nissl, mediante esta tinción se pudo observar un cambio en la morfología de las

células que constituyen la región CA1 y el giro dentado, principalmente en el estrato piramidal, tanto con una dosis baja (5 mg/kg) como con una dosis un poco mayor (7.5 mg/kg) en comparación con las ratas tratadas en lactancia, en las que se observa un cambio en la morfología de CA1 y CA3 con la dosis de 7.5 mg/kg de ácido kaínico.

A diferencia de lo esperado con base en el patrón hormonal que caracteriza ambos periodos reproductivos en la rata, la susceptibilidad a degeneración celular es mayor en la etapa de diestro. Además de tratar las ratas que tuvieron una lactancia completa, inicialmente, también se usaron ratas separadas de sus crías ya que ha sido reportado que el retirar el estímulo de succión a las ratas lactantes en el día 10 de la lactancia, induce modificaciones importantes en la respuesta del sistema nervioso ante diversos estímulos.

Los resultados obtenidos en cuanto a daño celular en el hipocampo de ratas separadas de sus crías no mostraron cambios importantes con respecto a ratas que completaron la lactancia, por lo que en apariencia esta variable no juega un papel importante durante la etapa final de la lactancia en el mantenimiento de la integridad de la estructura hipocampal ante estímulos excitotóxicos como el kainato. Sin embargo, el papel del estímulo de succión no fue estudiado con mayor detalle. Estos resultados fueron confirmados utilizando marcadores específicos de daño celular.

Ha sido reportado que la excitotoxicidad por ácido kaínico en SNC puede ser de tipo apoptótico aunque el mecanismo a través del cual la neuroexcitotoxicidad por kainato induce este tipo de muerte celular no se conoce con detalle. Se sabe que ésta es una forma de muerte celular regulada al interior de la célula a través de diversos factores como son las proteínas de la familia de Bcl-2, la liberación de citocromo C desde la mitocondria y la activación de caspasas [31,71,80,81].

Aunque diversos estudios han demostrado que la activación de varios tipos de caspasas después de la administración de ácido kaínico, tales como caspasa-2, caspasa-6, y caspasa-12, la mayor parte de los estudios coinciden en la activación consistente de caspasa-3 en el proceso de excitotoxicidad por kainato [80,98,99,108,111]. A nivel morfológico, el proceso

apoptótico se caracteriza por la fragmentación del material genético al interior del núcleo y la degradación de los componentes citoplasmáticos.

La detección de células dañadas en hipocampo medio, 24 hrs después de la administración de ácido kaínico vía intraperitoneal, en ratas tratadas hacia el periodo final de la lactancia y durante la etapa de diestro 1, se realizó a través de la localización de la caspasa-3 (serin-proteasa) en su forma activa mediante inmunofluorescencia. Se utilizó también la técnica de TUNEL, para la detección de DNA fragmentado al interior del núcleo en las células de la región hipocampal, como marcador de muerte celular por apoptosis.

Los resultados obtenidos tanto con la localización de la caspasa-3 activa como a través de TUNEL, confirman lo observado a través de la técnica de Nissl, es decir, en apariencia, existe un mayor daño celular en hipocampo, especialmente en el estrato de neuronas piramidales del CA1 y el estrato granular del giro dentado en ratas tratadas con kainato durante la etapa de diestro 1 en comparación con ratas tratadas al final de la lactancia aun cuando los niveles de hormonas neuroprotectoras son similares y los glucocorticoides son mayores en lactancia. Aunado a lo anterior, se demostró que hacia el final de la lactancia, el estímulo de succión por parte de las crías no juega un papel determinante en el mantenimiento de la integridad neuronal como ha sido reportado en etapas tempranas de este periodo.

Los estudios en los que se reporta la activación de caspasa-3 después de administración de ácido kaínico, han sido realizados en modelos *in vitro* o en animales machos. En este estudio se encontró que la activación de esta preteasa no refleja el daño celular observado a través de otras técnicas como Nissl y TUNEL, esta diferencia aunque no fue estudiada en detalle, sugiere que la toxicidad por ácido kainico en hembras y machos podría ser diferente. Inicialmente podemos referir las diferencias debidas al ambiente hormonal entre hembras y machos que representa un “milieu” hormonal completamente diferente. Varias investigaciones en el área de neuroprotección por estrógenos han reportado un incremento en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 y una reducción de la activación de caspasas en respuesta a la administración de 17- $\beta$  estradiol en diversos modelos de daño neuronal.

Por otro lado nuestros resultados obtenidos a través de la tinción de los tejidos por Fluoro-Jade, mostraron un mayor daño celular en diestro 1 que el observado a través de la aplicación de las técnicas antes mencionadas, con respecto a las ratas en lactancia, el daño observado a través del uso de éste colorante, derivado aniónico tribásico, coincide con el obtenido por TUNEL. La aplicación de la técnica de fluorojade permitió confirmar que durante el periodo final de la lactancia, el daño celular en hipocampo en respuesta a excitotoxicidad por kainato es menor en comparación con el daño inducido de la misma forma durante la etapa de diestro1.

El fluorojade permite la detección de degeneración neuronal a través de su unión a una proteína específica de neuronas que se acidifica en todo proceso de este tipo, por lo que resulta útil en la detección de daño y muerte neuronal por apoptósis o necrosis [16,72,127,128]. Las diferencias observadas entre el número de células dañadas, detectadas por TUNEL y caspasa-3 activa en relación a las detectadas por fluorojade, puede deberse a que el daño por excitotóxicos también puede darse a través de una vía de daño celular de tipo necrótico, la cual se caracteriza por una alta generación de especies reactivas de oxígeno y daño mitocondrial que conlleva a la muerte celular por declinamiento de moléculas energéticas y oxidación de macromoléculas. Aunque también puede deberse a que son sustratos celulares diferentes (proteínas y ácidos nucleicos) y depende del momento en el cual se detecta el daño [48,115,120,146].

Aunque se ha reportado que las hormonas esteroides sexuales pueden actuar como antioxidantes, las diferencias encontradas en cuanto a células dañadas por kainato detectadas por Fluoro-Jade, que se relacionan con diferentes tipos de muerte celular y la detectada con marcadores de apoptosis, en las condiciones fisiológicas estudiadas, sugieren que no podrían deberse a este papel de los esteroides, ya que en ambas condiciones se tienen niveles semejantes de estradiol y progesterona y solo durante la etapa de diestro1 parece predominar la muerte celular no relacionada con apoptosis, por lo que cabe la posibilidad de que durante el periodo final de la lactancia, la expresión de moléculas propias de la lactancia, se encuentren implicadas en un efecto neuroprotector ante daño excitotóxico, teniendo un papel importante en la regulación de moléculas que modulan la muerte celular por apoptosis o necrosis como

podrían ser las caspasas, proteínas antiapoptóticas, proapoptóticas o especies reactivas de oxígeno.

### *Neuroprotección durante lactancia*

La familia Bcl-2 comprende al menos 12 proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis, que pueden ser clasificadas de acuerdo a su función en proapoptóticas y antiapoptóticas. La actividad de éstas moléculas puede verse afectada por modificaciones postraduccionales como proteólisis y fosforilación, mismas que inducen cambios en la conformación de la proteína, localización subcelular y expresión. Se ha reportado que Bcl-2 es la principal proteína antiapoptótica perteneciente a ésta familia, implicada en el mantenimiento de la viabilidad celular en sistema nervioso central [112,129,143].

La expresión de Bcl-2 fue estudiada en la región hipocampal de los animales en diestro 1 y lactancia, a través de inmunohistoquímica. En forma interesante, se observó que en la etapa de diestro, hay una expresión uniforme de Bcl-2 en la región hipocampal, que es significativamente menor en comparación con la encontrada en los tejidos de ratas lactantes en el hipocampo de las ratas en lactancia. Durante la lactancia, se observó que además de haber una mayor expresión de Bcl-2, hay una expresión diferencial de esta proteína, ya que CA3 muestra bajos niveles de esta proteína en relación a CA1 y el giro dentado, en forma inversa al daño que se observó a través de diferentes técnica.

Aunado a lo anterior, se encontró que en la corteza piriforme hay una menor expresión de esta proteína con respecto a las otras áreas estudiadas tanto en ratas lactantes como en ratas en diestro y una mayor expresión de la misma en corteza entorrinal durante la lactancia, lo cual correlaciona, nuevamente, en forma inversa con los niveles de daño neuronal encontrado por fluorojade en ambos tipos de corteza. Estos datos, sugieren la participación de Bcl-2 en la prevención de daño celular en el hipocampo de ratas lactantes ante estímulos excitotóxicos.

Se ha reportado que uno de los mecanismos a través del cual los estrógenos se encuentra ejerciendo un efecto neuroprotector ante estímulos tóxicos, es mediante la inducción de Bcl-2. Este incremento en la expresión de la proteína antiapoptótica ha sido relacionado directamente a la regulación positiva del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) por estrógenos. Ha sido demostrado que este factor neurotrófico aumenta la expresión de Bcl-2 y previene modificaciones en la proteína asociadas a su inactivación como la fosforilación a través de su unión a el receptor TrkB y la subsecuente activación de la cascada PI3K/AKT, vía implicada en sobrevivencia celular [59,68,129].

Adicionalmente, en diversos modelos celulares e *in vivo*, se ha demostrado que el estradiol previene la apoptosis por inducción de la proteína antiapoptótica Bcl-x1 y la disminución de la actividad de caspasas. Con respecto a la proteína Bcl-2 se ha reportado que en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, los estrógenos aumentan su expresión a través de elementos AP-1 mientras que en la línea celular SK-ER3 modulan positivamente su función al disminuir la expresión de la proteína Nip2 [59,92,161].

Ya que el efecto neuroprotector de los estrógenos se ha asociado principalmente a un efecto genómico a través del ER alfa, se evaluó la expresión de éste receptor por inmunohistoquímica, los resultados mostraron una expresión similar del ER alfa en las diferentes regiones del hipocampo estudiadas, entre los grupos tratados.

Otro de los factores que se conoce es capaz de influenciar la sobrevivencia neuronal ante excitotoxicidad es la progesterona a través de sus metabolitos reducidos DHP y THP ya que estos compuestos participan en la depresión de la actividad neuronal modulando positivamente el sistema GABAérgico en SNC [35,89,91]. Sin embargo, en las condiciones fisiológicas estudiadas, no parece que la progesterona sea responsable de el efecto neuroprotector durante la lactancia, ya que en este periodo se mantienen niveles similares a los que se presentan durante el diestro1, por lo que su participación no fue explorada en este trabajo.

También ha sido descrito el efecto neuroprotector de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea en cultivos de células granulares de cerebelo, mediante la regulación del flujo de

$\text{Ca}^+$  a través de canales dependientes de voltaje y se conoce, en modelos de desarrollo de sistema óseo, que esta proteína puede regular la expresión de Bcl-2 positivamente [18].

La prolactina, es una hormona peptídica requerida para el desarrollo lobuloalveolar en la glándula mamaria durante la gestación, para lactogénesis al tiempo del parto y el mantenimiento de la secreción de leche durante la lactancia (Tucker, 1994). La expresión de receptores a prolactina en hipotálamo durante los periodos de gestación y lactancia pone de manifiesto la participación de la prolactina en el sistema nervioso central durante la gestación y lactancia. A este respecto, se ha sugerido que la prolactina a través de sus acciones en sistema nervioso, influye de manera importante el establecimiento del comportamiento materno, el incremento del apetito e ingesta de comida que se observa en ratas gestantes y en lactancia, los cambios en fertilidad durante estos periodos, además de mediar la secreción de oxitocina y vasopresina y modular el estrés y ansiedad [54,155].

La prolactina podría ser un metabolito importante en la neuroprotección del daño inducido por kainato observada durante la fase final de la lactancia debido a que se ha demostrado que es capaz de inhibir la actividad de la sintasa de óxido nítrico en células endoteliales. Se ha descrito que la sintasa de óxido nítrico es dependiente de  $\text{Ca}^+$  y su expresión ha sido demostrada en las regiones celulares, magnocelular y parvocelular, de algunos núcleos hipotalámicos.

Varios estudios han demostrado que el NO participa en el control de diferentes procesos neurosecretores, principalmente en el sistema neurosecretor responsable de la liberación de la hormona corticotropina, por lo que la modulación redox en el sitio de acción de receptores a NMDA parece ser crítica en el control del eje hipotálamico-pituitario-adrenocortical (HPA). Así mismo se ha determinado que los glucocorticoides facilitan la excitotoxicidad neuronal por un aumento en la expresión de receptores a glutamato e inhibición de la recaptura de este neurotransmisor [113].

Recientemente se ha descrito en células endoteliales, que la prolactina, hormona que se encuentra especialmente elevada durante la lactancia, inhibe la angiogénesis promovida por el

factor de crecimiento endotelial (VEGF) a través del bloqueo de la activación de eNOS por inhibición de la síntesis de acetilcolina y bradicinina. En SNC, la prolactina podría estar inhibiendo también la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y mediando por tanto la inactivación de receptores a glutamato [51].

Aunado a lo anterior, también se conoce que la prolactina incrementa la secreción de el factor de crecimiento neuronal (NGF). En sistema nervioso central, NGF, tiene un papel trófico sobre neuronas colinérgicas y se ha reportado que protege contra neurodegeneración inducida por axotomía y atrofia relacionada a la edad, además de que en cultivos hipocampales previene la muerte neuronal por excitotoxicidad. El mecanismo a través del cual este factor neurotrófico protege a las neuronas hipocampales no se conoce con precisión dado que la expresión de TrkA, el receptor de alta afinidad a NGF, no se expresa en ésta área del sistema nervioso central [88]. Sin embargo se conoce que la expresión del receptor de baja afinidad, p75<sup>NTR</sup>, incrementa ante estímulos excitotóxicos y algunos estudios señalan que la unión de este receptor a su ligando induce la activación de esfingomielinasa y el factor nuclear NFκB, eventos ligados a un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como manganeso superóxido dismutasa. Aunado a ello, se conoce en otros modelos de muerte apoptótica, que la activación de NFκB inhibe la muerte celular [25].

Los resultados obtenidos y los datos descritos, sugieren que durante la lactancia, se mantiene un sistema importante de neuroprotección aún ante la presencia de la elevación de glucocorticoides y la disminución de hormonas esteroides sexuales en las zonas más sensibles a daño por excitotoxicidad a través de un mecanismo posiblemente independiente de hormonas esteroides y seguramente mediado por moléculas que participan en el establecimiento y mantenimiento de la secreción de leche y cuidado maternal.

Los resultados de este estudio en general sugieren que existe un efecto neuroprotector ante excitotoxicidad por kainato durante el periodo final de la lactancia, mismo que parece no ser dependiente de la acción directa de las hormonas esteroides sexuales.



## **Conclusiones**

- Existe un efecto neuroprotector ante excitotoxicidad por kainato durante el periodo final de la lactancia, mismo que parece no ser dependiente de la acción directa de las hormonas esteroides sexuales.
- La lactancia es el primer modelo natural de neuroprotección en el hipocampo ante la toxicidad por administración sistémica de kainato, que a nuestro conocimiento haya sido descrito.

## **Perspectivas**

En este trabajo se identificó que el periodo de lactancia en *Rattus norvegicus* es un estado fisiológico adecuado para el estudio de neuroprotección ante excitotoxicidad por ácido kaínico en el hipocampo.

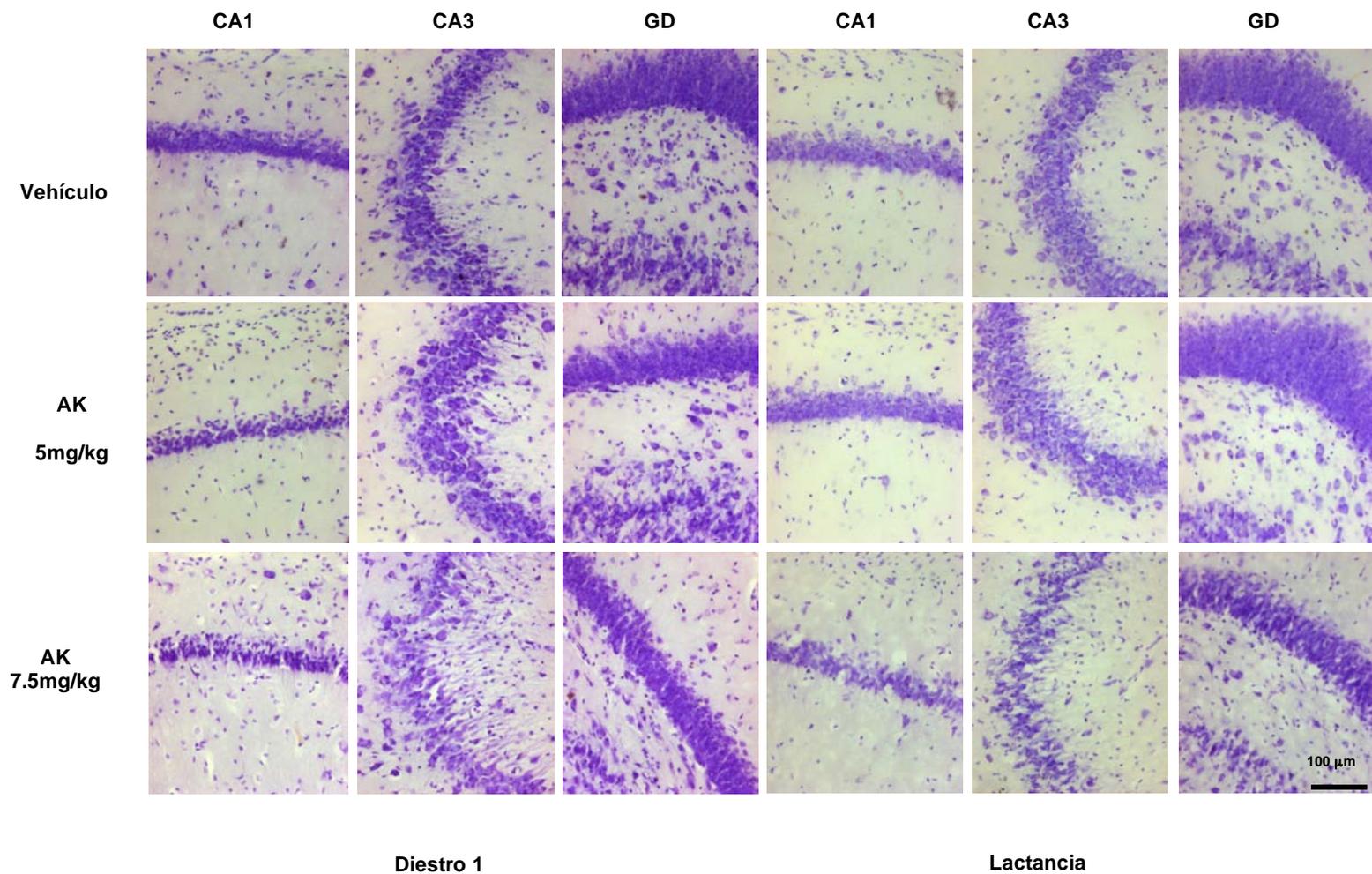
En relación a estas observaciones, existen diversos aspectos importantes que es necesario estudiar a futuro, el más relevante esta relacionado con la identificación de la o las moléculas que participan en el efecto neuroprotector ante excitotoxicidad por ácido kaínico durante la lactancia.

Por otro lado, se requiere explorar si la neuroprotección a ácido kainico observado en la lactancia, previene el daño neuronal ante la administración de los diferentes agonistas de glutamato y otro tipo de condiciones patológicas como la isquemia.

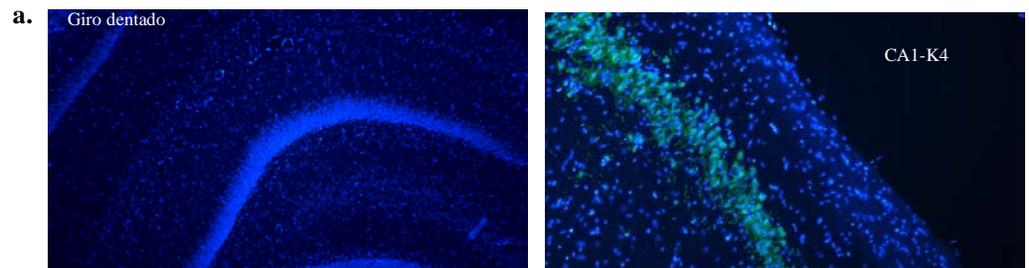
A lo largo del estudio, se observó que la administración de ácido kainico induce daño celular moderado en la corteza entorrinal, a diferencia de otras regiones que presentan mayor susceptibilidad a degeneración por excitotoxicidad, tales como núcleos talámicos e hipotalámicos asociados al establecimiento y mantenimiento de la lactancia y comportamiento materno. Por lo que sería relevante caracterizar en forma detallada la susceptibilidad a daño celular en diferentes regiones del cerebro materno y el tipo de muerte celular asociado.

Finalmente consideramos que este modelo representa una importante área de estudio del impacto de la relación madre-progenie sobre la función del sistema nervioso central como son el comportamiento materno durante la etapa de lactancia y su relación con las crías. Así mismo el daño de la madre sobre el desarrollo postnatal de las crías, por lo que resulta una herramienta para el estudio del efecto de la exposición a aminoácidos excitadores de la progenie vía materna en el desarrollo del sistema nervios central y sus funciones en la vida adulta.

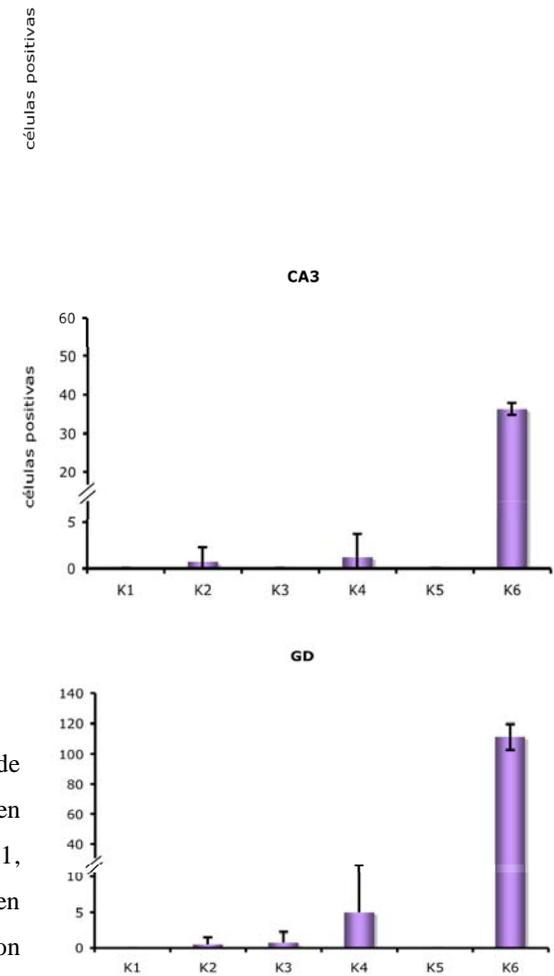




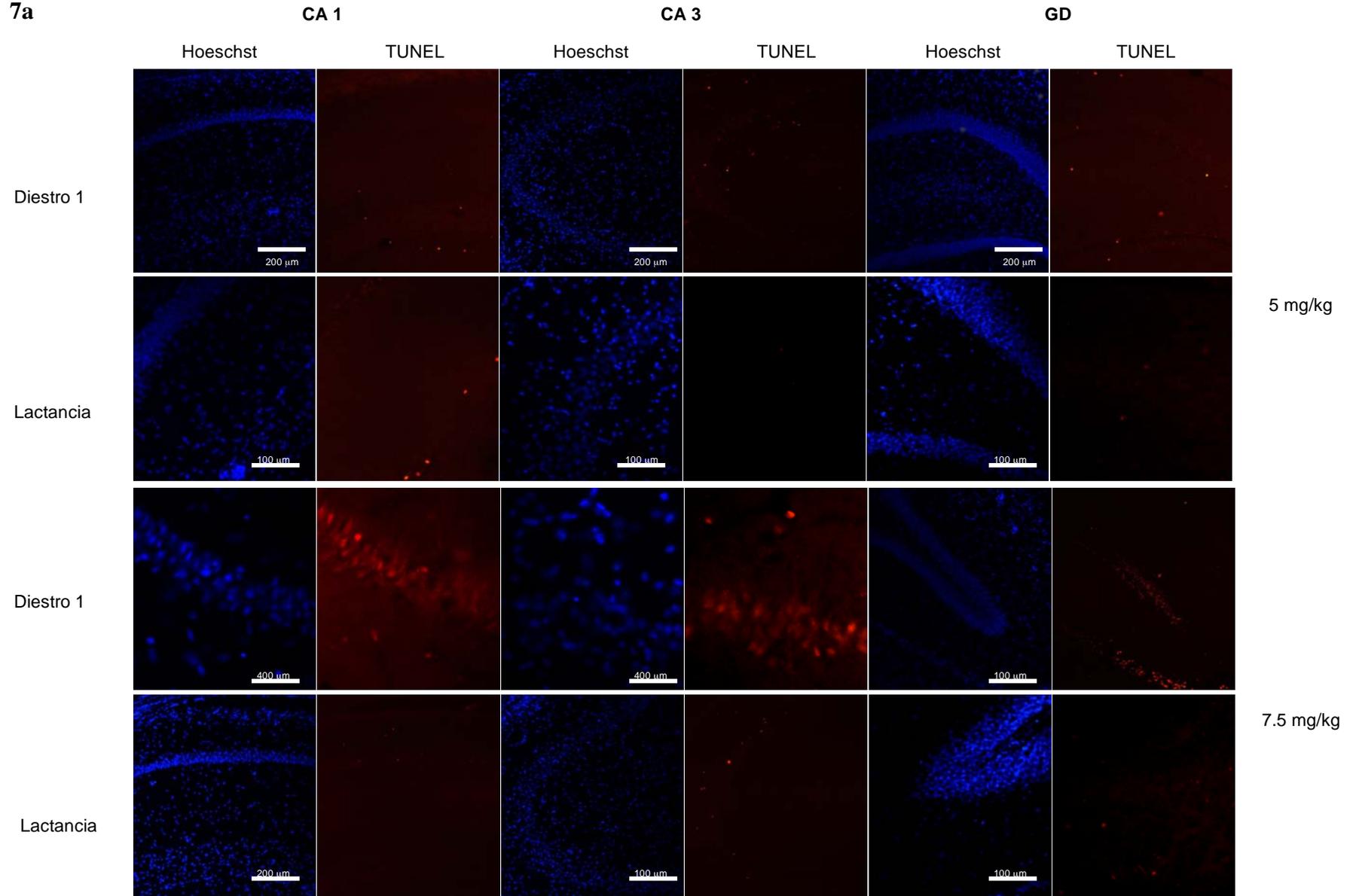
**Figura 5. Daño ocasionado por kainato en los distintos grupos de este estudio evaluado con Nissl.** Se muestra la morfología de las diferentes áreas del hipocampo, se puede observar un cambio importante después de 24 h del tratamiento con ácido kaínico, principalmente en el hipocampo de ratas en diestro tratadas con 5 y 7.5 mg/kg vía ip. En las ratas lactantes la dosis de 5 mg/kg no genera cambios importantes en hipocampo, con una dosis mayor se observa daño principalmente en CA3.

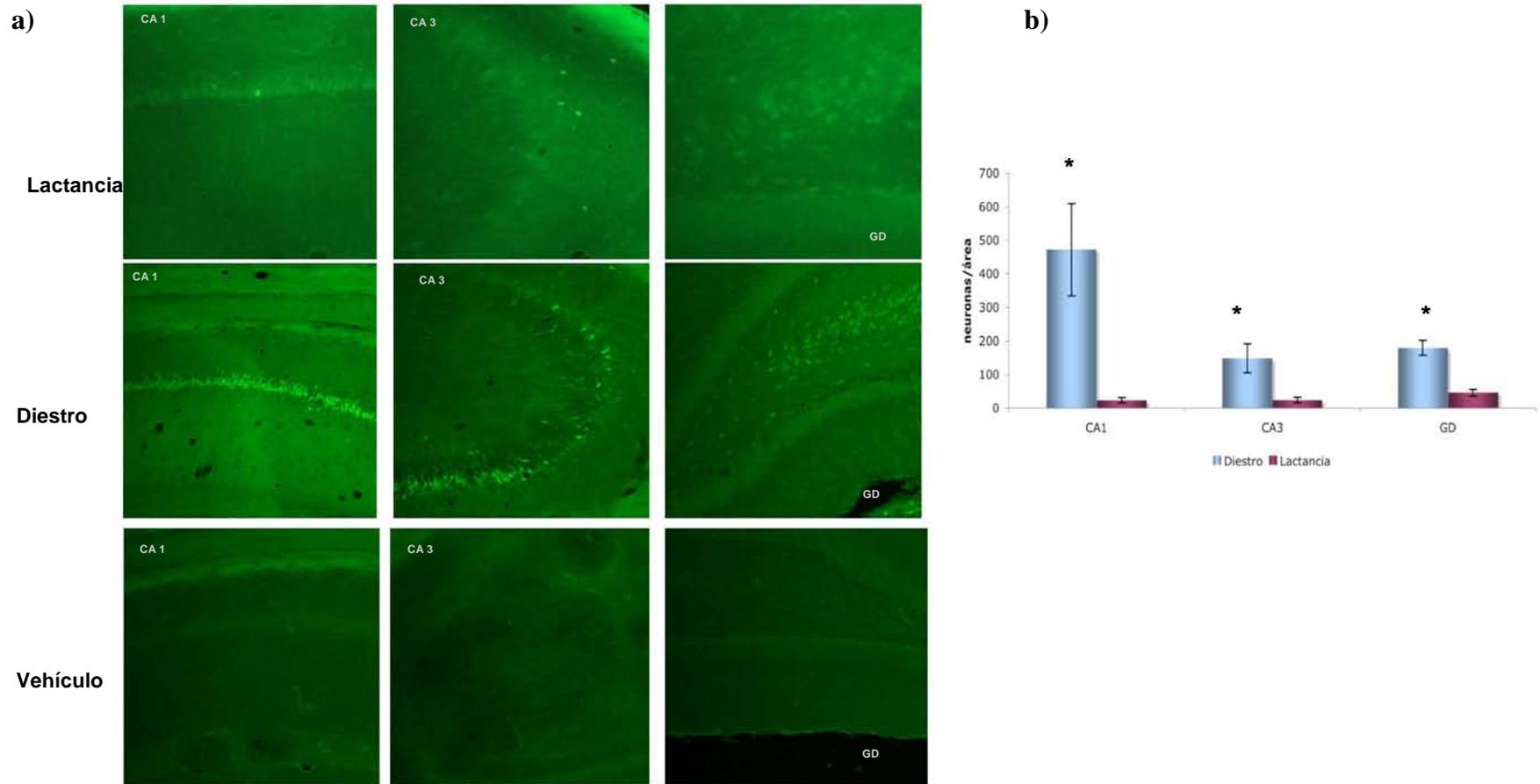


**Figura 6.** Células marcadas por caspasa-3 activada y núcleo picnótico 24h después de la administración i.p. de 5mg/kg de ácido kaínico. a) Células positivas para caspasa-3 activada en la región hipocampal en coimmunolocalización de Neu-N, b) Análisis estadístico de las células positivas a caspasa-3 activada en CA1, CA2 y GD. En todos los casos el mayor número de células positivas a caspasa-3 activa y núcleo picnótico en ratas en diestro, presentaron inmunomarcaje para Neu-N mientras que en ratas lactantes no presentaron marcaje para esta proteína. El mayor número de células positivas se registró para el tratamiento de ácido kaínico en ratas en diestro 1 en las tres áreas del hipocampo ( $p < 0.05$ ). Lactancia normal: K1(vehículo), K2 (AK); separada de sus crías: K3 (vehículo), K4 (AK); diestro 1: K5 (vehículo), K6 (AK).



7a





**Figura 8.** Secciones histológicas teñidas con Fluoro-Jade. a) Tinción representativa para cada tratamiento. b) Las gráficas muestran el análisis densitométrico en muestras de animales tratados con 7.5 mg/kg de ácido kaínico. Las diferencias son significativas con una  $p < 0.05$ .

## Bibliografía

- [1] A.E. Abele, K.P. Scholz, W.K. Scholz and R.J. Miller, Excitotoxicity induced by enhanced excitatory neurotransmission in cultured hippocampal pyramidal neurons, *Neuron* 4 (1990) 413-419.
- [2] P.H. Anborgh, C. Godin, M. Pampillo, G.K. Dhimi, L.B. Dale, S.P. Cregan, R. Truant and S.S. Ferguson, Inhibition of Metabotropic Glutamate Receptor Signaling by the Huntingtin-binding Protein Optineurin, *J Biol Chem* 280 (2005) 34840-34848.
- [3] R.D. Andrew and B.A. MacVicar, Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice, *Neuroscience* 62 (1994) 371-383.
- [4] M. Artal-Sanz and N. Tavernarakis, Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration, *FEBS Lett* 579 (2005) 3287-3296.
- [5] M. Arundine and M. Tymianski, Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity, *Cell Calcium* 34 (2003) 325-337.
- [6] M. Arundine and M. Tymianski, Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury, *Cell Mol Life Sci* 61 (2004) 657-668.
- [7] H.C. Atkinson and B.J. Waddell, Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle, *Endocrinology* 138 (1997) 3842-3848.
- [8] S. Bahn, B. Volk and W. Wisden, Kainate receptor gene expression in the developing rat brain, *J Neurosci* 14 (1994) 5525-5547.
- [9] L.D. Baker, K. Sambamurti, S. Craft, M. Cherrier, M.A. Raskind, F.Z. Stanczyk, S.R. Plymate and S. Asthana, 17beta-estradiol reduces plasma Abeta40 for HRT-naive postmenopausal women with Alzheimer disease: a preliminary study, *Am J Geriatr Psychiatry* 11 (2003) 239-244.
- [10] T. Barkhem, S. Nilsson and J.A. Gustafsson, Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action, *Am J Pharmacogenomics* 4 (2004) 19-28.
- [11] M.F. Beal, Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Trends Neurosci* 23 (2000) 298-304.
- [12] Y. Ben-Ari and R. Cossart, Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress, *Trends Neurosci* 23 (2000) 580-587.
- [13] M. Benfey, U.R. Bunger, M. Vidal-Sanz, G.M. Bray and A.J. Aguayo, Axonal regeneration from GABAergic neurons in the adult rat thalamus, *J Neurocytol* 14 (1985) 279-296.
- [14] B. Bettler, J. Boulter, I. Hermans-Borgmeyer, A. O'Shea-Greenfield, E.S. Deneris, C. Moll, U. Borgmeyer, M. Hollmann and S. Heinemann, Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development, *Neuron* 5 (1990) 583-595.
- [15] B.R. Bhavnani, Estrogens and menopause: pharmacology of conjugated equine estrogens and their potential role in the prevention of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, *J Steroid Biochem Mol Biol* 85 (2003) 473-482.

- [16] C. Bonde, J. Noraberg and J. Zimmer, Nuclear shrinkage and other markers of neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures, *Neurosci Lett* 327 (2002) 49-52.
- [17] Z.A. Bortolotto, V.R. Clarke, C.M. Delany, M.C. Parry, I. Smolders, M. Vignes, K.H. Ho, P. Miu, B.T. Brinton, R. Fantaske, A. Ogden, M. Gates, P.L. Ornstein, D. Lodge, D. Bleakman and G.L. Collingridge, Kainate receptors are involved in synaptic plasticity, *Nature* 402 (1999) 297-301.
- [18] M.L. Brines, Z. Ling and A.E. Broadus, Parathyroid hormone-related protein protects against kainic acid excitotoxicity in rat cerebellar granule cells by regulating L-type channel calcium flux, *Neurosci Lett* 274 (1999) 13-16.
- [19] C. Brisken, M. Socolovsky, H.F. Lodish and R. Weinberg, The signaling domain of the erythropoietin receptor rescues prolactin receptor-mutant mammary epithelium, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 14241-14245.
- [20] J.R. Brorson, C.J. Marcuccilli and R.J. Miller, Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons, *Stroke* 26 (1995) 1259-1266; discussion 1267.
- [21] K. Brown-Grant, D. Exley and F. Naftolin, Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrous cycle of the rat, *J Endocrinol* 48 (1970) 295-296.
- [22] B. Budziszewska, M. Leskiewicz, M. Kubera, L. Jaworska-Feil, M. Kajta and W. Lason, Estrone, but not 17 beta-estradiol, attenuates kainate-induced seizures and toxicity in male mice, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 (2001) 168-173.
- [23] C.G. Buitrago, A.C. Ronda, A.R. Boland and R. Boland, MAP kinases p38 and JNK are activated by the steroid hormone 1alpha,25(OH)(2)-vitamin D(3) in the C2C12 muscle cell line, *J Cell Biochem* (2005).
- [24] I. Bureau, S. Dieudonne, F. Coussen and C. Mulle, Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 6838-6843.
- [25] M.A. Burke and M. Bothwell, p75 neurotrophin receptor mediates neurotrophin activation of NF-kappa B and induction of iNOS expression in P19 neurons, *J Neurobiol* 55 (2003) 191-203.
- [26] R.L. Butcher, W.E. Collins and N.W. Fugo, Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat, *Endocrinology* 94 (1974) 1704-1708.
- [27] R.J. Cabrera, C. Bregonzio, M. Laconi and A. Mampel, Allopregnanolone increase in striatal N-methyl-D-aspartic acid evoked [3H]dopamine release is estrogen and progesterone dependent, *Cell Mol Neurobiol* 22 (2002) 445-454.
- [28] P. Casaccia-Bonofil, E. Benedikz, R. Rai and P.J. Bergold, Excitatory and inhibitory pathways modulate kainate excitotoxicity in hippocampal slice cultures, *Neurosci Lett* 154 (1993) 5-8.
- [29] P.E. Castillo, R.C. Malenka and R.A. Nicoll, Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons, *Nature* 388 (1997) 182-186.
- [30] K. Chergui, A. Bouron, E. Normand and C. Mulle, Functional GluR6 kainate receptors in the striatum: indirect downregulation of synaptic transmission, *J Neurosci* 20 (2000) 2175-2182.
- [31] E.C. Cheung, L. Melanson-Drapeau, S.P. Cregan, J.L. Vanderluit, K.L. Ferguson, W.C. McIntosh, D.S. Park, S.A. Bennett and R.S. Slack, Apoptosis-inducing factor is a

- key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms, *J Neurosci* 25 (2005) 1324-1334.
- [32] D.W. Choi, Ionic dependence of glutamate neurotoxicity, *J Neurosci* 7 (1987) 369-379.
- [33] D.W. Choi and D.M. Hartley, Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death, *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 71 (1993) 23-34.
- [34] J.K. Christensen, A.V. Paternain, S. Selak, P.K. Ahring and J. Lerma, A mosaic of functional kainate receptors in hippocampal interneurons, *J Neurosci* 24 (2004) 8986-8993.
- [35] I. Ciriza, I. Azcoitia and L.M. Garcia-Segura, Reduced progesterone metabolites protect rat hippocampal neurones from kainic acid excitotoxicity in vivo, *J Neuroendocrinol* 16 (2004) 58-63.
- [36] I. Ciriza, P. Carrero, I. Azcoitia, S.G. Lundeen and L.M. Garcia-Segura, Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol, *J Neurobiol* 61 (2004) 209-221.
- [37] C. Cui and M.L. Mayer, Heteromeric kainate receptors formed by the coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7, *J Neurosci* 19 (1999) 8281-8291.
- [38] R.A. Cunha, J.A. Ribeiro and J.O. Malva, Presynaptic kainate receptors modulating glutamatergic transmission in the rat hippocampus are inhibited by arachidonic acid, *Neurochem Int* 44 (2004) 371-379.
- [39] M. Cyr, O. Ghribi, C. Thibault, M. Morissette, M. Landry and T. Di Paolo, Ovarian steroids and selective estrogen receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors, *Brain Res Brain Res Rev* 37 (2001) 153-161.
- [40] M. Day and M. Good, Ovariectomy-induced disruption of long-term synaptic depression in the hippocampal CA1 region in vivo is attenuated with chronic estrogen replacement, *Neurobiol Learn Mem* 83 (2005) 13-21.
- [41] B.O. Dubrovsky, Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29 (2005) 169-192.
- [42] J. Egebjerg, B. Bettler, I. Hermans-Borgmeyer and S. Heinemann, Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA, *Nature* 351 (1991) 745-748.
- [43] H. Feder, *Estrous Cyclicity in Mammals*, Plenum Press, USA, 1981, 555 pp.
- [44] M.W. Fleck, E. Cornell and S.J. Mah, Amino-acid residues involved in glutamate receptor 6 kainate receptor gating and desensitization, *J Neurosci* 23 (2003) 1219-1227.
- [45] P. Follesa, F. Biggio, S. Caria, G. Gorini and G. Biggio, Modulation of GABA(A) receptor gene expression by allopregnanolone and ethanol, *Eur J Pharmacol* 500 (2004) 413-425.
- [46] P. Follesa, A. Concas, P. Porcu, E. Sanna, M. Serra, M.C. Mostallino, R.H. Purdy and G. Biggio, Role of allopregnanolone in regulation of GABA(A) receptor plasticity during long-term exposure to and withdrawal from progesterone, *Brain Res Brain Res Rev* 37 (2001) 81-90.
- [47] M. Freeman, *The ovarian cycle of the rat*, Raven press, New York, 1988.
- [48] C. Gabriel, B. Friguls, F.X. Sureda, M. Pallas, A.M. Planas, E. Escubedo, J. Camarasa and A. Camins, Inhibitors of NO-synthase and donors of NO modulate kainic acid-induced damage in the rat hippocampus, *J Neurosci Res* 59 (2000) 797-805.

- [49] N. Gago, Y. Akwa, N. Sananes, R. Guennoun, E.E. Baulieu, M. El-Etr and M. Schumacher, Progesterone and the oligodendroglial lineage: stage-dependent biosynthesis and metabolism, *Glia* 36 (2001) 295-308.
- [50] N. Gava, C.L. Clarke, K. Byth, R.L. Arnett-Mansfield and A. deFazio, Expression of progesterone receptors A and B in the mouse ovary during the estrous cycle, *Endocrinology* 145 (2004) 3487-3494.
- [51] C. Gonzalez, A.M. Corbacho, J.P. Eiserich, C. Garcia, F. Lopez-Barrera, V. Morales-Tlalpan, A. Barajas-Espinosa, M. Diaz-Munoz, R. Rubio, S.H. Lin, G. Martinez de la Escalera and C. Clapp, 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation, *Endocrinology* 145 (2004) 5714-5722.
- [52] P.F. Good, G.W. Huntley, S.W. Rogers, S.F. Heinemann and J.H. Morrison, Organization and quantitative analysis of kainate receptor subunit GluR5-7 immunoreactivity in monkey hippocampus, *Brain Res* 624 (1993) 347-353.
- [53] Y. Goodman, A.J. Bruce, B. Cheng and M.P. Mattson, Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons, *J Neurochem* 66 (1996) 1836-1844.
- [54] D.R. Grattan, X.J. Pi, Z.B. Andrews, R.A. Augustine, I.C. Kokay, M.R. Summerfield, B. Todd and S.J. Bunn, Prolactin receptors in the brain during pregnancy and lactation: implications for behavior, *Horm Behav* 40 (2001) 115-124.
- [55] B. Greco, L.S. Lubbers and J.D. Blaustein, Estrogen receptor beta messenger ribonucleic acid expression in the forebrain of proestrous, pregnant, and lactating female rats, *Endocrinology* 144 (2003) 1869-1875.
- [56] P. Gregor, B.F. O'Hara, X. Yang and G.R. Uhl, Expression and novel subunit isoforms of glutamate receptor genes GluR5 and GluR6, *Neuroreport* 4 (1993) 1343-1346.
- [57] B. Guerra, M. Diaz, R. Alonso and R. Marin, Plasma membrane oestrogen receptor mediates neuroprotection against beta-amyloid toxicity through activation of Raf-1/MEK/ERK cascade in septal-derived cholinergic SN56 cells, *J Neurochem* 91 (2004) 99-109.
- [58] M.B. Hapon, M. Simoncini, G. Via and G.A. Jahn, Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation, *Reproduction* 126 (2003) 371-382.
- [59] C. Harms, M. Lautenschlager, A. Bergk, J. Katchanov, D. Freyer, K. Kapinya, U. Herwig, D. Megow, U. Dirnagl, J.R. Weber and H. Hortnagl, Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration, *J Neurosci* 21 (2001) 2600-2609.
- [60] W.R. Harrington, S.H. Kim, C.C. Funk, Z. Madak-Erdogan, R. Schiff, J.A. Katzenellenbogen and B.S. Katzenellenbogen, Estrogen Dendrimer Conjugates that Preferentially Activate Extranuclear, Non-Genomic versus Genomic Pathways of Estrogen Action, *Mol Endocrinol* (2005).
- [61] A. Herb, N. Burnashev, P. Werner, B. Sakmann, W. Wisden and P.H. Seeburg, The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits, *Neuron* 8 (1992) 775-785.
- [62] A. Herb, M. Higuchi, R. Sprengel and P.H. Seeburg, Q/R site editing in kainate receptor GluR5 and GluR6 pre-mRNAs requires distant intronic sequences, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 1875-1880.

- [63] J.P. Herman, O. Eyigor, D.R. Ziegler and L. Jennes, Expression of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat, *J Comp Neurol* 422 (2000) 352-362.
- [64] R.C. Hovey, J.F. Trott and B.K. Vonderhaar, Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology, *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7 (2002) 17-38.
- [65] G.W. Huntley, S.W. Rogers, T. Moran, W. Janssen, N. Archin, J.C. Vickers, K. Cauley, S.F. Heinemann and J.H. Morrison, Selective distribution of kainate receptor subunit immunoreactivity in monkey neocortex revealed by a monoclonal antibody that recognizes glutamate receptor subunits GluR5/6/7, *J Neurosci* 13 (1993) 2965-2981.
- [66] M.R. Hynd, H.L. Scott and P.R. Dodd, Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Neurochem Int* 45 (2004) 583-595.
- [67] C. Ibanez, S.A. Shields, M. El-Etr, E. Leonelli, V. Magnaghi, W.W. Li, F.J. Sim, E.E. Baulieu, R.C. Melcangi, M. Schumacher and R.J. Franklin, Steroids and the reversal of age-associated changes in myelination and remyelination, *Prog Neurobiol* 71 (2003) 49-56.
- [68] T. Jover, H. Tanaka, A. Calderone, K. Oguro, M.V. Bennett, A.M. Etgen and R.S. Zukin, Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1, *J Neurosci* 22 (2002) 2115-2124.
- [69] N. Kang, L. Jiang, W. He, J. Xu, M. Nedergaard and J. Kang, Presynaptic inactivation of action potentials and postsynaptic inhibition of GABAA currents contribute to KA-induced disinhibition in CA1 pyramidal neurons, *J Neurophysiol* 92 (2004) 873-882.
- [70] M. Kohler, N. Burnashev, B. Sakmann and P.H. Seeburg, Determinants of Ca<sup>2+</sup> permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing, *Neuron* 10 (1993) 491-500.
- [71] L. Korhonen, N. Belluardo, G. Mudo and D. Lindholm, Increase in Bcl-2 phosphorylation and reduced levels of BH3-only Bcl-2 family proteins in kainic acid-mediated neuronal death in the rat brain, *Eur J Neurosci* 18 (2003) 1121-1134.
- [72] J. Kundrotiene, A. Wagner and S. Liljequist, Fluoro-Jade and TUNEL staining as useful tools to identify ischemic brain damage following moderate extradural compression of sensorimotor cortex, *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64 (2004) 153-162.
- [73] S.E. Lauri, M. Segerstrale, A. Vesikansa, F. Maingret, C. Mulle, G.L. Collingridge, J.T. Isaac and T. Taira, Endogenous activation of kainate receptors regulates glutamate release and network activity in the developing hippocampus, *J Neurosci* 25 (2005) 4473-4484.
- [74] S.J. Lee and B.S. McEwen, Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41 (2001) 569-591.
- [75] J. Lerma, Kainate receptors: an interplay between excitatory and inhibitory synapses, *FEBS Lett* 430 (1998) 100-104.
- [76] J. Lerma, Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission, *Nat Rev Neurosci* 4 (2003) 481-495.
- [77] J. Lerma, M. Morales, M.A. Vicente and O. Herreras, Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission, *Trends Neurosci* 20 (1997) 9-12.
- [78] J. Lerma, A.V. Paternain, A. Rodriguez-Moreno and J.C. Lopez-Garcia, Molecular physiology of kainate receptors, *Physiol Rev* 81 (2001) 971-998.

- [79] P. Li, T.J. Wilding, S.J. Kim, A.A. Calejesan, J.E. Huettner and M. Zhuo, Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord, *Nature* 397 (1999) 161-164.
- [80] W. Liu, R. Liu, J.T. Chun, R. Bi, W. Hoe, S.S. Schreiber and M. Baudry, Kainate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures: evidence for multiple apoptotic pathways, *Brain Res* 916 (2001) 239-248.
- [81] E. Lopez, E. Pozas, R. Rivera and I. Ferrer, Bcl-2, Bax and Bcl-x expression following kainic acid administration at convulsant doses in the rat, *Neuroscience* 91 (1999) 1461-1470.
- [82] C.R. Lu, H.H. Willcockson, K.D. Phend, S. Lucifora, M. Darstein, J.G. Valtschanoff and A. Rustioni, Ionotropic glutamate receptors are expressed in GABAergic terminals in the rat superficial dorsal horn, *J Comp Neurol* 486 (2005) 169-178.
- [83] F. Maingret, S.E. Lauri, T. Taira and J.T. Isaac, Profound regulation of neonatal CA1 rat hippocampal GABAergic transmission by functionally distinct kainate receptor populations, *J Physiol* 567 (2005) 131-142.
- [84] D. Manthey and C. Behl, From structural biochemistry to expression profiling: Neuroprotective activities of estrogen, *Neuroscience* (2005).
- [85] C. Matute, M. Domercq and M.V. Sanchez-Gomez, Glutamate-mediated glial injury: Mechanisms and clinical importance, *Glia* (2005).
- [86] M. Mayer, Structure and function of glutamate receptors, *Ann N Y Acad Sci* 1038 (2004) 125-130.
- [87] J.L. McManaman and M.C. Neville, Mammary physiology and milk secretion, *Adv Drug Deliv Rev* 55 (2003) 629-641.
- [88] D. Melck, L. De Petrocellis, P. Orlando, T. Bisogno, C. Laezza, M. Bifulco and V. Di Marzo, Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation, *Endocrinology* 141 (2000) 118-126.
- [89] S.H. Mellon and L.D. Griffin, Neurosteroids: biochemistry and clinical significance, *Trends Endocrinol Metab* 13 (2002) 35-43.
- [90] S.H. Mellon and L.D. Griffin, Synthesis, regulation, and function of neurosteroids, *Endocr Res* 28 (2002) 463.
- [91] S.H. Mellon, L.D. Griffin and N.A. Compagnone, Biosynthesis and action of neurosteroids, *Brain Res Brain Res Rev* 37 (2001) 3-12.
- [92] I. Merchenthaler, T.L. Dellovade and P.J. Shughrue, Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia, *Ann N Y Acad Sci* 1007 (2003) 89-100.
- [93] I. Merchenthaler, M.V. Lane, S. Numan and T.L. Dellovade, Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses, *J Comp Neurol* 473 (2004) 270-291.
- [94] D. Milatovic, R.C. Gupta and W.D. Dettbarn, Involvement of nitric oxide in kainic acid-induced excitotoxicity in rat brain, *Brain Res* 957 (2002) 330-337.
- [95] M.C. Morale, P.A. Serra, F. L'Episcopo, C. Tirolo, S. Caniglia, N. Testa, F. Gennuso, G. Giaquinta, G. Rocchitta, M.S. Desole, E. Miele and B. Marchetti, Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration, *Neuroscience* (2005).
- [96] K. Morimoto and T. Oda, Kainate exacerbates beta-amyloid toxicity in rat hippocampus, *Neurosci Lett* 340 (2003) 242-244.

- [97] T. Murata and T. Higuchi, Progesterone receptor mRNA levels during pregnancy, labor, lactation and the estrous cycle in rat uterus, *J Reprod Dev* 49 (2003) 425-432.
- [98] S. Narkilahti, T.J. Pirttila, K. Lukasiuk, J. Tuunanen and A. Pitkanen, Expression and activation of caspase 3 following status epilepticus in the rat, *Eur J Neurosci* 18 (2003) 1486-1496.
- [99] S. Narkilahti and A. Pitkanen, Caspase 6 expression in the rat hippocampus during epileptogenesis and epilepsy, *Neuroscience* 131 (2005) 887-897.
- [100] M.C. Neville, T.B. McFadden and I. Forsyth, Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion, *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7 (2002) 49-66.
- [101] M.C. Neville, J. Morton and S. Umemura, Lactogenesis. The transition from pregnancy to lactation, *Pediatr Clin North Am* 48 (2001) 35-52.
- [102] A.W. Norman, M.T. Mizwicki and D.P. Norman, Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model, *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004) 27-41.
- [103] K. Ohno, M. Okada, R. Tsutsumi, A. Kohara and T. Yamaguchi, Kainate excitotoxicity is mediated by AMPA- but not kainate-preferring receptors in embryonic rat hippocampal cultures, *Neurochem Int* 31 (1997) 715-722.
- [104] A.V. Paternain, M.T. Herrera, M.A. Nieto and J. Lerma, GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors, *J Neurosci* 20 (2000) 196-205.
- [105] A.V. Paternain, M. Morales and J. Lerma, Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons, *Neuron* 14 (1995) 185-189.
- [106] A.V. Paternain, A. Rodriguez-Moreno, A. Villarroel and J. Lerma, Activation and desensitization properties of native and recombinant kainate receptors, *Neuropharmacology* 37 (1998) 1249-1259.
- [107] C. Patte-Mensah, V. Kappes, M.J. Freund-Mercier, K. Tsutsui and A.G. Mensah-Nyagan, Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways, *J Neurochem* 86 (2003) 1233-1246.
- [108] E. Perez-Navarro, N. Gavalda, E. Gratacos and J. Alberch, Brain-derived neurotrophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum, *J Neurochem* 92 (2005) 678-691.
- [109] R.S. Petralia, Y.X. Wang and R.J. Wenthold, Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies, *J Comp Neurol* 349 (1994) 85-110.
- [110] J. Prange-Kiel, U. Wehrenberg, H. Jarry and G.M. Rune, Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons, *Hippocampus* 13 (2003) 226-234.
- [111] B. Puig and I. Ferrer, Caspase-3-associated apoptotic cell death in excitotoxic necrosis of the entorhinal cortex following intraperitoneal injection of kainic acid in the rat, *Neurosci Lett* 321 (2002) 182-186.
- [112] R. Raghupathi, Cell death mechanisms following traumatic brain injury, *Brain Pathol* 14 (2004) 215-222.
- [113] W. Riedel, Role of nitric oxide in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, *Z Rheumatol* 59 Suppl 2 (2000) II/36-42.

- [114] M. Riepe and D.O. Carpenter, Delayed increase of cell volume of single pyramidal cells in live rat hippocampal slices upon kainate application, *Neurosci Lett* 191 (1995) 35-38.
- [115] V. Riljak, M. Milotova, K. Jandova, M. Langmeier, D. Maresova, J. Pokorny and S. Trojan, Repeated kainic acid administration and hippocampal neuronal degeneration, *Prague Med Rep* 106 (2005) 75-78.
- [116] A. Rodriguez-Moreno, O. Herreras and J. Lerma, Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus, *Neuron* 19 (1997) 893-901.
- [117] A. Rodriguez-Moreno and J. Lerma, Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function, *Neuron* 20 (1998) 1211-1218.
- [118] A. Rodriguez-Moreno, J.C. Lopez-Garcia and J. Lerma, Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 1293-1298.
- [119] A. Rodriguez-Moreno, A. Sistiaga, J. Lerma and J. Sanchez-Prieto, Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization, *Neuron* 21 (1998) 1477-1486.
- [120] M. Roy and R.M. Sapolsky, The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis, *Neuroendocrinology* 77 (2003) 24-31.
- [121] J.L. Rozas, A.V. Paternain and J. Lerma, Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors, *Neuron* 39 (2003) 543-553.
- [122] D. Ruano, B. Lambolez, J. Rossier, A.V. Paternain and J. Lerma, Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing, *Neuron* 14 (1995) 1009-1017.
- [123] G.M. Rune and M. Frotscher, Neurosteroid synthesis in the hippocampus: Role in synaptic plasticity, *Neuroscience* 136 (2005) 833-842.
- [124] N. Sanon, L. Carmant, M. Emond, P. Congar and J.C. Lacaille, Short-term effects of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity, *Epilepsia* 46 (2005) 837-848.
- [125] H.H. Schiffer, G.T. Swanson and S.F. Heinemann, Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate, *Neuron* 19 (1997) 1141-1146.
- [126] S. Schmidt, J. Rainer, C. Ploner, E. Presul, S. Riml and R. Kofler, Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance, *Cell Death Differ* 11 Suppl 1 (2004) S45-55.
- [127] L.C. Schmued, C. Albertson and W. Slikker, Jr., Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration, *Brain Res* 751 (1997) 37-46.
- [128] L.C. Schmued and K.J. Hopkins, Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration, *Toxicol Pathol* 28 (2000) 91-99.
- [129] J.J. Shacka and K.A. Roth, Regulation of neuronal cell death and neurodegeneration by members of the Bcl-2 family: therapeutic implications, *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4 (2005) 25-39.
- [130] S.S. Shank and D.A. Scheuer, Glucocorticoids reduce responses to AMPA receptor activation and blockade in nucleus tractus solitarius, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 (2003) H1751-1761.

- [131] H. Shen, Q.H. Gong, M. Yuan and S.S. Smith, Short-term steroid treatment increases delta GABAA receptor subunit expression in rat CA1 hippocampus: pharmacological and behavioral effects, *Neuropharmacology* 49 (2005) 573-586.
- [132] S. Shiroma, T. Yamaguchi and K. Kometani, Effects of 17beta-estradiol on chemically induced long-term depression, *Neuropharmacology* 49 (2005) 97-102.
- [133] P.J. Shughrue and I. Merchenthaler, Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system, *J Comp Neurol* 436 (2001) 64-81.
- [134] M.A. Shupnik, Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation, *Oncogene* 23 (2004) 7979-7989.
- [135] M. Singh, Mechanisms of progesterone-induced neuroprotection, *Ann N Y Acad Sci* 1052 (2005) 145-151.
- [136] S.S. Smith and C.S. Woolley, Cellular and molecular effects of steroid hormones on CNS excitability, *Cleve Clin J Med* 71 Suppl 2 (2004) S4-10.
- [137] B. Sommer, M. Kohler, R. Sprengel and P.H. Seeburg, RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels, *Cell* 67 (1991) 11-19.
- [138] R.X. Song, C.J. Barnes, Z. Zhang, Y. Bao, R. Kumar and R.J. Santen, The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 2076-2081.
- [139] L. Stefanis, Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury, *Neuroscientist* 11 (2005) 50-62.
- [140] J.M. Stern and J.S. Lonstein, Neural mediation of nursing and related maternal behaviors, *Prog Brain Res* 133 (2001) 263-278.
- [141] Y. Stern-Bach, B. Bettler, M. Hartley, P.O. Sheppard, P.J. O'Hara and S.F. Heinemann, Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins, *Neuron* 13 (1994) 1345-1357.
- [142] B. Stoffel-Wagner, Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications, *Ann N Y Acad Sci* 1007 (2003) 64-78.
- [143] K.I. Strauss, R.K. Narayan and R. Raghupathi, Common patterns of bcl-2 family gene expression in two traumatic brain injury models, *Neurotox Res* 6 (2004) 333-342.
- [144] G.T. Swanson, R.W.t. Gereau, T. Green and S.F. Heinemann, Identification of amino acid residues that control functional behavior in GluR5 and GluR6 kainate receptors, *Neuron* 19 (1997) 913-926.
- [145] T. Takahashi, T. Kimoto, N. Tanabe, T.A. Hattori, N. Yasumatsu and S. Kawato, Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in cultured rat hippocampal neurons, *J Neurochem* 83 (2002) 1441-1451.
- [146] J. Takano, M. Tomioka, S. Tsubuki, M. Higuchi, N. Iwata, S. Itohara, M. Maki and T.C. Saido, Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice, *J Biol Chem* 280 (2005) 16175-16184.
- [147] C.D. Toran-Allerand, M. Singh and G. Setalo, Jr., Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story, *Front Neuroendocrinol* 20 (1999) 97-121.
- [148] K.L. Troyer and D.C. Lee, Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network, *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6 (2001) 7-21.
- [149] A. Tucker, *Lactation and Its Hormonal Control*, Ravel Press, New York, USA, 1988.

- [150] J.P. Tuckermann, A. Kleiman, K.G. McPherson and H.M. Reichardt, Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis, *Crit Rev Clin Lab Sci* 42 (2005) 71-104.
- [151] N. Vasudevan, L.M. Kow and D. Pfaff, Integration of steroid hormone initiated membrane action to genomic function in the brain, *Steroids* 70 (2005) 388-396.
- [152] J.M. Verkuyl, H. Karst and M. Joels, GABAergic transmission in the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus is suppressed by corticosterone and stress, *Eur J Neurosci* 21 (2005) 113-121.
- [153] M. Vignes and G.L. Collingridge, The synaptic activation of kainate receptors, *Nature* 388 (1997) 179-182.
- [154] B. Vissel, G.A. Royle, B.R. Christie, H.H. Schiffer, A. Ghetti, T. Tritto, I. Perez-Otano, R.A. Radcliffe, J. Seamans, T. Sejnowski, J.M. Wehner, A.C. Collins, S. O'Gorman and S.F. Heinemann, The role of RNA editing of kainate receptors in synaptic plasticity and seizures, *Neuron* 29 (2001) 217-227.
- [155] J.L. Voogt, Y. Lee, S. Yang and L. Arbogast, Regulation of prolactin secretion during pregnancy and lactation, *Prog Brain Res* 133 (2001) 173-185.
- [156] A.K. Wagner, L.A. Willard, A.E. Kline, M.K. Wenger, B.D. Bolinger, D. Ren, R.D. Zafonte and C.E. Dixon, Evaluation of estrous cycle stage and gender on behavioral outcome after experimental traumatic brain injury, *Brain Res* 998 (2004) 113-121.
- [157] T.J. Wilding and J.E. Huettner, Differential antagonism of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionic acid-preferring and kainate-preferring receptors by 2,3-benzodiazepines, *Mol Pharmacol* 47 (1995) 582-587.
- [158] W. Wisden and P.H. Seeburg, A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain, *J Neurosci* 13 (1993) 3582-3598.
- [159] W. Wisden and P.H. Seeburg, Mammalian ionotropic glutamate receptors, *Curr Opin Neurobiol* 3 (1993) 291-298.
- [160] L. Xiao, A. Qi and Y. Chen, Cultured embryonic hippocampal neurons deficient in glucocorticoid (GC) receptor: a novel model for studying nongenomic effects of GC in the neural system, *Endocrinology* 146 (2005) 4036-4041.
- [161] L. Zhao, T.W. Wu and R.D. Brinton, Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons, *Brain Res* 1010 (2004) 22-34.
- [162] C.F. Zorumski, S. Mennerick and J. Que, Modulation of excitatory synaptic transmission by low concentrations of glutamate in cultured rat hippocampal neurons, *J Physiol* 494 ( Pt 2) (1996) 465-477.