



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA
ACÍDICA FIBRILAR GLIAL (GFAP) EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL DE LA RATA DURANTE LA GESTACIÓN Y EL INICIO DE LA
LACTANCIA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARCO ANTONIO BALANDRÁN RUIZ

MÉXICO, D.F

2009





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dra. Carmen Giral Barnez
VOCAL: Profesor: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
SECRETARIO: Profesor: Dr. Ignacio Camacho Arroyo
1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Aliesha Araceli González Arenas
2° SUPLENTE: Profesor: Dr. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 107 EDIFICIO E

FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO



SUSTENTANTE (S): MARCO ANTONIO BALANDRÁN RUIZ



AGRADECIMIENTOS



Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo con el apoyo del proyecto PAPIIT IN201908, DGAPA, U.N.A.M. y con el apoyo del programa 127 del Departamento de Superación Académica, Facultad de Química U.N.A.M.



DEDICATORIAS



Que agradable es llegar a uno de los más exitosos momentos en la vida y recordar en cuantos corazones estás presente y cuantos rostros recuerdas, es un gusto y placer realizar estas dedicatorias, las cuales son un pequeño fragmento del cariño que les tengo a todos por todos los bellos momentos que compartimos juntos. Dedicada a:

A mis padres que me dieron todo lo que necesite es su debido momento, especialmente amor y libertad.

A mis hermanos que fueron mis segundos padres, los cuales compartieron conmigo toda su experiencia inculcándome responsabilidad de cada uno de mis actos.

A mis amigos de la banda tapajeña y allegados con los cuales compartí una infancia que cualquiera envidiaría.

A mis abuelos que siempre consintieron al niño de la ciudad, el cual disfrutaba de toda la naturaleza que había en el rancho, en paz descansen.

A mi abuelo Nayo que me demostró el valor que se necesita para pedir perdón.

A mis padrinos, tíos, primos y sobrinos, con los cuales disfruto del cariño mutuo que existe entre todos nosotros.

A todos los hijos de la timba de la banda salcera, la cual se consolidó como una de las más fructíferas amistades, ya que hemos compartido tantos sentimientos que ni siquiera la salsa puede describir.

A mis amigos de la secundaria, Aldo, Diana, Vero, Gabriel, Bere, Christian y Ricardo, que a pesar del tiempo y los obstáculos nos mantenemos firmes en nuestros sueños, madurando y preparándonos para obtener el éxito día a día.

A los primeros amigos que tuve desde que nací, compartimos el mismo año de nacimiento, la misma colonia, el nombre y hasta la misma infancia, en la cual éramos inseparables.

A mis amigos de la prepa 3, Liz, Violeta, Carlos, Susana, Giovanna, Jesica, Sonia, Bety, Morin y Karim, solo con recordar sus nombres me traslado hasta aquellos tiempos en los que, curiosamente, el tiempo no importaba.



DEDICATORIAS



A mis amigos del coro, ya que por ellos soy el chico extrovertido y desastroso que toma las cosas como son y por lo que son siempre con una sonrisa y con el alma llena de felicidad.

A las maestras Violeta, Alicia y Mary, que desde muy pequeño brindaron todo el apoyo para el desarrollo intelectual y emocional del que en aquel entonces era un niño, y hoy, es un hombre; aunque igual de soñador como aquel niño.

A mis exitosos amigos de la Facultad de Química que se quemaron las pestañas, se fregaron el lomo y pesar de ello seguimos en pie listos para llegar más lejos.

A todas la personas que trabajan en el laboratorio 107 del edificio F de la Facultad de Química que fueron más que compañeros de trabajo, con los cuales tengo una amistad muy especial y siento un gran respeto las exitosas carreras que tienen y que llegaran más lejos aun.

A la UNAM especialmente a la Facultad de Química que me apoyo durante 5 años con conocimiento, alimento y experiencia, y de la cual estoy sumamente orgullosos de pertenecer y ser egresado.

A Carolina una de la personas más especiales en el mundo y con la cual comparto los sentimientos más ocultos que existen en mi persona, porque su cariño está por encima del entendimiento que me ha enseñado la vida.

Gracias a todos los que mencioné y que olvide mencionar, y gracias por las lecciones aprendidas que dejaron en mi corazón, porque lo que soy hoy es gracias al amor, la alegría, el apoyo, la calidez, los regaños, las disputas y todas aquellas cosas que me han brindado; por ello, todos viven en mi así como yo vivo en todos ustedes.

“el pasado es historia, el futuro es un misterio, pero hoy es un regalo por ello se llama presente y hay que disfrutarlo como el niño que abre sus regalos en navidad”



Contenido

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción	3
4. Antecedentes	4
4.1. Características generales de la gestación	4
4.2. El Sistema Nervioso Central durante la gestación	10
4.2.1. El hipocampo	15
4.2.2. El hipotálamo	17
4.2.3. El área preóptica	20
4.2.4. La corteza frontal	21
4.2.5. El cerebelo	22
4.3. Características del citoesqueleto	23
4.3.1. Citoesqueleto en astrocitos	25
4.4. Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	26
5. Planteamiento del problema	29
6. Hipótesis	30
7. Objetivos	30
8. Metodología	31
8.1. Animales de experimentación	31
8.2. Extracción y cuantificación de proteínas	31
8.3. Western blot	32
8.4. Análisis densitométrico y estadístico	33
9. Resultados	34
10. Discusión	37
11. Conclusiones	41
12. Referencias	42



1. ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropina
APO	Área preóptica
BSA	Albumina sérica bovina
CA1	Cornu ammonis 1
CA3	Cornu ammonis 3
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
E2	Estradiol
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
ER	Receptor e estrógeno
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
HHA	Hipófisis-Hipotálamo-Adrenal
IF	Filamento intermedios
mPFC	Corteza prefrontal media
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF-H	Neurofilamentos pesados
NF-L	Neurofilamentos ligeros
NF-M	Neurofilamentos medianos
NPY	Neuropeptido Y
OTR	Receptor a oxitocina
P4	Progesterona
PMFS	Fenil-metil-sulfonil-fluor
RP	Receptor a progesterona
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central



2. RESUMEN

Durante el embarazo se modifican las funciones de todos los tejidos del organismo incluido el sistema nervioso central (SNC). En esta etapa se han encontrado diversos cambios conductuales, así como en la memoria y el aprendizaje, sin embargo, se desconocen los mecanismos involucrados en estos cambios. Por otro lado se ha reportado que hay un incremento significativo en los niveles de estradiol (E2) y progesterona (P4) durante el embarazo. Se ha observado que en el hipocampo de la rata (regiones CA1, CA3 y el giro dentado) durante el ciclo estral, en el día del proestro (en donde la concentración de E2 y P4 es elevada) se modifica la morfología de los astrocitos de esta región y se incrementa la inmunopositividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Aunque se ha visto que GFAP es sensible a los cambios durante el ciclo estral no se ha caracterizado el patrón de expresión de esta proteína durante la gestación. En este estudio se determinó el patrón de expresión de GFAP a los 2,14,18 y 21 días de la gestación y al día 2 de la lactancia en el SNC de la rata por la técnica de *Western blot*. Los resultados obtenidos muestran que existen cambios en el contenido de GFAP durante el embarazo y la lactancia. El contenido de GFAP se incrementa en el hipocampo durante la gestación, mientras que en el área preóptica (POA) y en el cerebelo hay un decremento. En la corteza cerebral el contenido de GFAP se incrementa al día 14 de la gestación. En el hipotálamo hay un incremento en el contenido de GFAP al día 18 de la gestación y una baja de éste al día 21. Con respecto a la lactancia el contenido de GFAP se incrementa en el hipocampo, en la corteza y en el cerebelo, mientras que en POA y en el hipotálamo disminuye significativamente. Estos resultados sugieren que durante la gestación y el inicio de la lactancia hay cambios en la estructura y función de los astrocitos en diversas áreas del SNC.



3. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) es un blanco para los esteroides sexuales. Al final del estado fetal y en la vida postnatal temprana, los esteroides gonadales influyen en la supervivencia, la diferenciación y la conectividad de poblaciones neuronales específicas, tanto en el cerebro como en la médula espinal. Más tarde, en el adulto, los esteroides sexuales continúan ejerciendo efectos sobre la morfología y las conexiones de las neuronas, participando de esta manera en la plasticidad neuronal. En la gestación hay un incremento significativo en los niveles de estradiol (E2) y progesterona (P4) que permite que ésta se lleve a cabo.

El E2 y la P4 aumentan el número de astrocitos en el hipocampo y la expresión de una proteína específica de los astrocitos como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y modifica la morfología de los astrocitos en el hipocampo de la rata durante el ciclo estral (Arias et al., 2009).

A pesar de que se han diversos realizado estudios para determinar cuáles son las regiones del SNC que participan en la conducta materna, aún se desconoce cuáles son los factores que inducen cambios en la plasticidad cerebral durante la gestación. El conocimiento de los mecanismos por los cuales se modifica la sinapsis durante la gestación permitirá entender este proceso.



4. ANTECEDENTES

4.1. Características generales de la gestación

La gestación es una etapa que comprende desde la fecundación del óvulo hasta el momento del parto, Metcalfe y colaboradores la consideran como una serie de procesos integrados, resultando en el exitoso desarrollo y parto de uno o más miembros de la misma especie. Durante la gestación ocurren cambios fisiológicos y conductuales muy importantes para el éxito del producto. En los mamíferos, las crías son incapaces de tener una vida independiente al nacimiento; así los compromisos de la reproducción continúan después del parto involucrando la lactancia y el comportamiento maternal (Metcalfe, 1988).

En la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*) la gestación tiene una duración de 21-22 días, y en el transcurso de ésta, se presentan diferentes tipos de conductas que han sido ampliamente estudiadas por el grupo de Rosenblatt (Rosenblatt, 1980; Rosenblatt et al., 1988) entre otros. En la actualidad se consideran 4 principales comportamientos característicos de la conducta maternal, la cual inicia desde la misma gestación: **el acarreamiento de las crías** (cuando la madre mueve de lugar a las crías, con los incisivos generalmente, para devolver las crías al nido y no pierdan calor corporal), **la construcción del nido** (la madre busca el lugar apropiado y escarba generando un hueco en el cual estarán las crías), **el lamido ano-genital** (la madre estimula la zona ventro-genital de las crías para que éstas puedan orinar y no mueran por intoxicación, se observa durante las 2 primeras semanas post-parto) y **el amamantamiento de las crías**



ANTECEDENTES



(se refiere a la postura encorvada que adquiere la madre cuando amamanta a las crías)
(Numan and Stolzenberg, 2009) (Fig. 1).

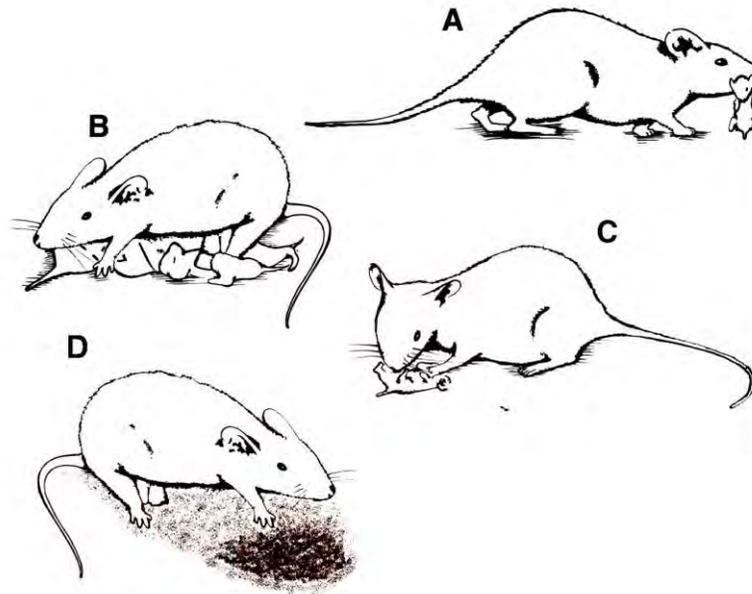


Figura 1. Representación de las 4 principales características de la conducta maternal: A) el acarreamiento, B) el amamantamiento, C) el lamido ano-genital, D) la construcción del nido (modificado de (Martínez-Gomez, 2002)).

La exhibición recíproca de las respuestas hacia la madre, la estimulación de las glándulas mamarias, la emisión de sonidos y olores, y todo el conjunto de cambios fisiológicos y conductuales promueven la resistencia inmunológica, la maduración física, y el desarrollo emocional y social de las ratas jóvenes (Fleming et al., 1999).

Además de los comportamientos antes mencionados, durante la gestación se presenta una conducta de agresividad ante los intrusos que se incrementa desde el día 16 hasta el día 19 y que tiene un máximo justo antes del parto cuando inician las contracciones del útero (Matthews-Felton et al., 1995).



ANTECEDENTES

Existen una gran cantidad de cambios fisiológicos que ocurren en la gestación, como el incremento de sales retenidas en el riñón, el aumento en el volumen plasmático, en la cantidad de eritrocitos, en el ritmo cardiaco, en el gasto calórico, la disminución del volumen máximo de inspiración, y una gran actividad del sistema neuroendócrino (Hodgen, 1988; Metcalfe, 1988; Risberg et al., 2009). Dentro de las hormonas más importantes en la regulación de la gestación están el E2 y la P4 que, en la rata, presentan un incremento en su concentración plasmática: el E2 de 50 pg/mL aprox., como pico máximo en el ciclo estral, se eleva a más de 100 pg/mL en la gestación aumentando a más de 500 pg/mL al momento del parto; mientras que la concentración de P4, de 10 a 35 ng/mL durante el ciclo estral, se incrementa hasta 120 ng/mL en la gestación. Estas hormonas caen antes del parto a niveles basales (Fig. 2).

Los cambios hormonales que ocurren durante la gestación, principalmente de E2 y P4, son indispensables para que los pulmones, los riñones, el hígado, las glándulas adrenales y otros órganos del feto puedan madurar (Genuth, 2006).

La P4 es fundamental en el desarrollo de la gestación ya que mantiene las funciones de la placenta, engrosa el endometrio, disminuye las contracciones basales del útero, estimula el crecimiento de la glándula mamaria, fortalece el moco del cerviz que previene las infecciones, fortalece las paredes uterinas preparándolas para el trabajo de parto. (Houdebine et al., 1985; Mahesh et al., 1996). Además se ha demostrado que los receptores a P4 (RP) son muy importantes en el desarrollo del epitelio ductal en la glándula mamaria y son esenciales para la diferenciación de los lóbulos alveolares que ocurre durante la gestación (Klopper, 1982; Seagroves et al., 2000).

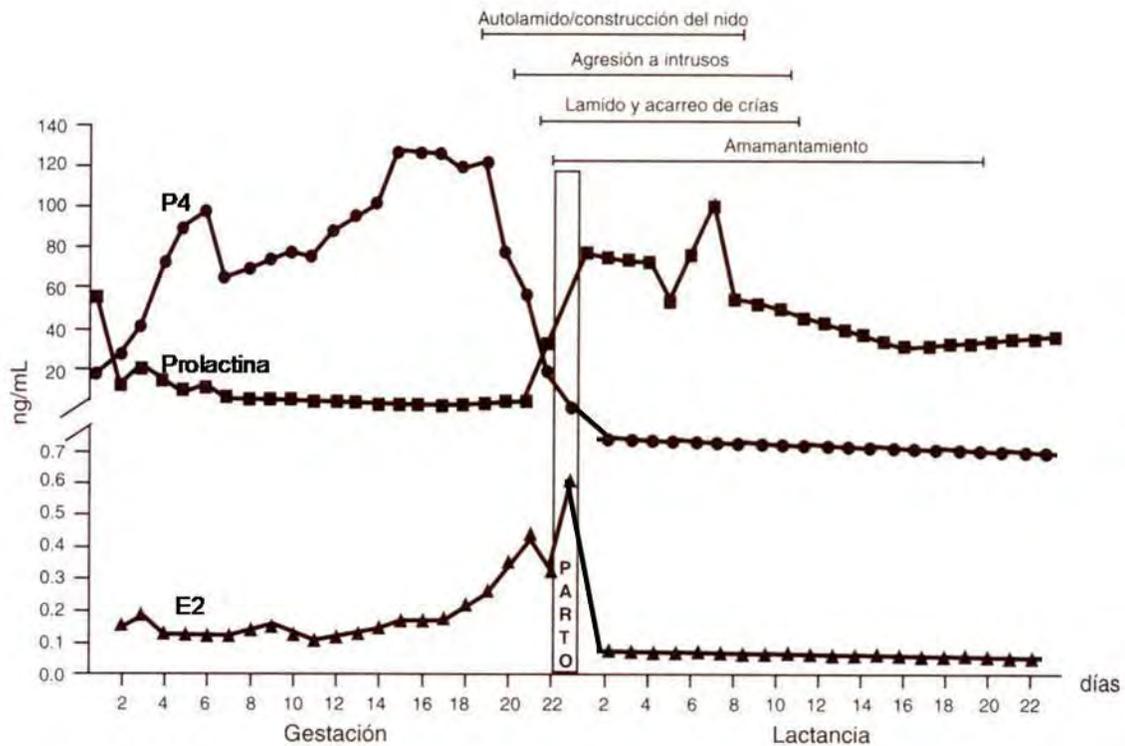


Figura 2. Esquema de las concentraciones plasmáticas de estradiol, progesterona y prolactina de la rata gestante y lactante. Arriba se indican algunas de las conductas que se presentan en estos periodos. (E2, estradiol; P4, progesterona) (Martínez-Gomez, 2002).

El incremento en el peso corporal de ratas gestantes se ha relacionado al efecto anoréxico que tiene el E2 y el efecto orexigénico de la P4. En el caso de la P4 se ha visto que ésta incrementa la ingesta de alimentos tanto en ratas ovariectomizadas como en las intactas (Augustine et al., 2008).

Se ha reportado que conductas, como el lamido ano-genital, están inicialmente bajo el control de hormonas, como el E2 y la P4. Aunque la importancia de estas hormonas en la conducta maternal disminuye después de la primer semana post-parto y posteriormente el comportamiento se mantiene gracias al aprendizaje y al reforzamiento (Fleming et al., 1999).



ANTECEDENTES



El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) tiene un papel muy importante en los cambios fisiológicos que ocurren en la gestación y la lactancia por que los cambios en la cantidad de adrenocorticotropina (ACTH) incrementan la concentración de cortisol promoviendo la síntesis de E2 y de P4 en la placenta, la cantidad de ACTH disminuye después del parto (Fig. 3). Durante la gestación los niveles de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) se incrementan notablemente ya que la placenta y las membranas fetales producen CRH, esta secreción se estimula por los estrógenos. En esta etapa la hipófisis incrementa su tamaño (30%) pero sus funciones permanecen intactas (Mastorakos and Ilias, 2003).

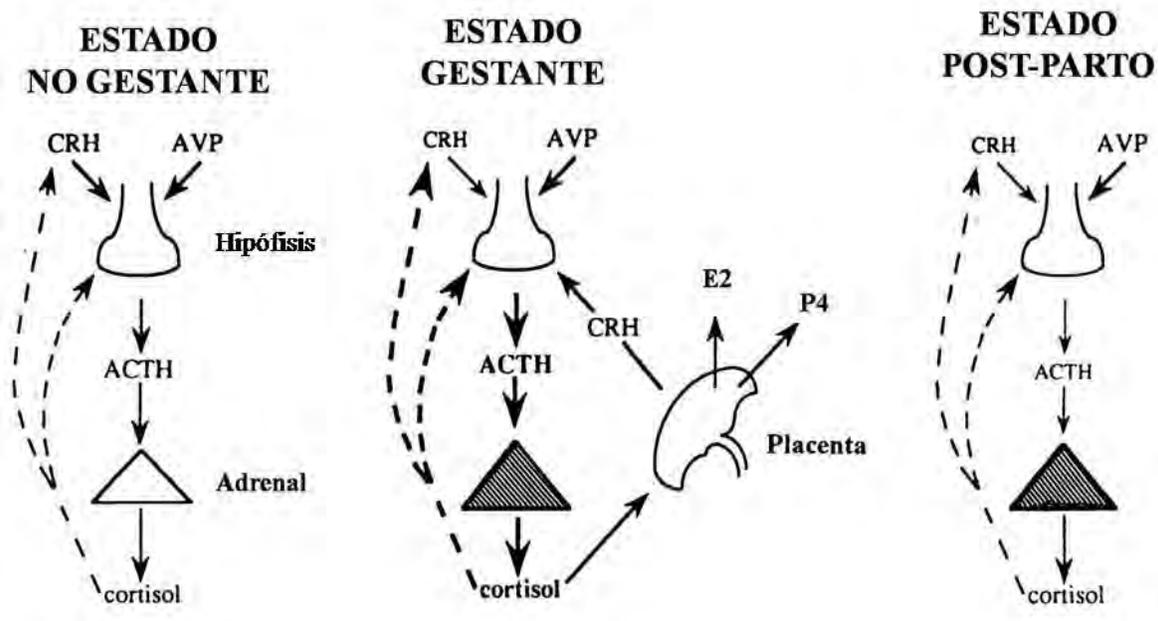


Figura 3. Representación comparativa de eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) de ratas no gestantes, gestantes y en el estado post parto, CRH (hormona liberadora de corticotropina), AVP (arginina-vasopresina) ACTH (adrenocorticotropina), E2 (estradiol), P4 (progesterona), áreas sombreadas significan hipertrofia de las adrenales (Mastorakos and Ilias, 2000).



ANTECEDENTES

La gestación se establece y mantiene, durante la primera mitad de ésta, por las hormonas secretadas por la hipófisis (luteinizante y folículo-estimulante), que a su vez actúan en los ovarios, pero en la segunda mitad de la gestación la placenta controla la concentración de hormonas esteroides (E2 y P4) en plasma al inhibir secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas y la acción luteolítica de la hipófisis hasta el final de la gestación cuando inicia el parto (Taya and Greenwald, 1981).

Los niveles elevados de estrógenos permiten el incremento de los niveles de la globulina de unión a corticosteroides resultando en una baja en el catabolismo del cortisol por el hígado y el incremento de la vida media de éste en el plasma. Además las glándulas adrenales se hipertrofian (Mastorakos and Ilias, 2003).

Por otro lado, la gestación, vista desde un punto de vista inmunológico, puede ser considerada como una situación donde el feto es un injerto. En este contexto se ha visto que la CRH podría estar implicada en el proceso inflamatorio de la implantación, y en el proceso antirrechazo que protege al feto del sistema inmune materno (Magiakou et al., 1996).

En la etapa post-parto los niveles de cortisol disminuyen y el eje HHA vuelve al estado pre-gestante. En un estudio se mostró que a las 3 y 6 semanas post-parto hubo una supresión transitoria de la secreción de CRH recuperándose a la semana 12 (Magiakou et al., 1996).

Los cambios fisiológicos y conductuales a los que se enfrenta la madre durante el embarazo causan estrés en ella que se puede manifestar en conductas de ansiedad, lo



ANTECEDENTES

anterior se comprobó usando el modelo de cruz elevada, presentándose un incremento de la ansiedad desde el día 15 hasta el fin de la gestación, aunque en el día 18 hubo una disminución que es comparable con el nivel de ansiedad de ratas vírgenes (Numan et al., 1998).

La conducta maternal desaparece en el momento del destete que ocurre entre el día 22 y el día 28 post-parto, a pesar de que se conocen diferentes variaciones hormonales durante la lactancia, aún no es claro si las hormonas participan directamente en la disminución de la conducta maternal cercana al destete (Martínez-Gomez, 2002).

El efecto que puede llegar a tener la conducta maternal en el desarrollo de la descendencia ha sido ampliamente estudiado. El comportamiento materno es crítico en el desarrollo de diferentes componentes del sistema nervioso central, se ha visto que el lamido ano-genital es muy importante para la maduración de eje HHA de la descendencia (Caldji et al., 1998). También se ha visto que el comportamiento materno aumenta la densidad neuronal en el hipocampo de las madres, lo cual, a su vez, puede incrementar el aprendizaje espacial en ellas (Bredy et al., 2003).

4.2. El sistema nervioso central en la gestación

El sistema nervioso central (SNC) es la parte del sistema nervioso que coordina muchas de las actividades del organismo y modula las diferentes conductas de un individuo, se compone, básicamente, por la médula espinal y el encéfalo, las cuales están protegidas por las meninges. El encéfalo está conformado por cuatro diferentes regiones



ANTECEDENTES

que a su vez poseen diferentes estructuras con diversas funciones y conexiones entre si, la tabla 1 muestra su organización desde un punto de vista neuroanatómico (Bear, 2006).

Tabla 1. Organización neuroanatómica del encéfalo. Se distinguen 4 regiones y las estructuras que conforman estas regiones dan lugar a las respectivas cavidades por donde fluye el líquido sinovial

Región	Estructura
Telencéfalo	Neocorteza, hipocampo, cuerpo estriado
Diencéfalo	Tálamo, hipotálamo, subtálamo y epitálamo
Mesencéfalo	Tectum, protectum y pedúnculo cerebral
Rombencéfalo	Bulbo raquídeo, puente y cerebelo

El SNC está conformado principalmente por neuronas y células gliales, la proporción de éstas varía dependiendo la estructura y la región. En cuanto a morfología hay gran diversidad en ambos tipos celulares, en la figura 4 se muestran diferentes tipos de neuronas y células gliales (Bear, 2006).

El SNC sufre muchos cambios a través del desarrollo de un organismo. Estos cambios son necesarios para un adecuado manejo de la información, establecimiento de conductas e interacciones con el medio. A los cambios que involucran alteraciones morfológicas en las células del SNC, ya sea por el reacomodo de conexiones sinápticas, la neurogénesis o el cambio en células gliales, se le conoce como plasticidad cerebral, la cual es indispensable en la funcionalidad del SNC en sus diferentes áreas (Magistretti, 2006; Toro and Deakin, 2007).



ANTECEDENTES

Las células gliales brindan una matriz que sirve de sostén a las neuronas, además de tener la capacidad de regular la sinapsis mediante diferentes procesos. Existen 3 tipos principales de células gliales en el SNC: a) los oligodendrocitos, b) los astrocitos y c) la microglia. Los oligodendrocitos envuelven el axón y secretan mielina, la cual no es continua sino que está dividida por los nódulos de Ranvier. La microglia está formada por células pequeñas que poseen capacidad fagocitaria y han sido relacionadas con el sistema inmune. Los astrocitos se dividen en fibrosos y protoplasmáticos, los primeros están muy relacionados con la barrera hematoencefálica alrededor de los vasos sanguíneos; por otro lado los astrocitos protoplasmáticos están en cercana interacción con las neuronas y están involucradas en la regulación del medio extracelular y la nutrición neuronal (Aguilar Roblero, 2002; Bear, 2006).

Se ha visto que los astrocitos participan en la plasticidad sináptica, además por el espacio que ocupan las sinapsis por μm^3 en comparación con el volumen de un astrocito ha sugerido que un solo astrocito podría contactar hasta 140 000 conexiones sinápticas (Bushong et al., 2002). La plasticidad sináptica está definida como cambios en la eficacia de la sinapsis que pueden ser mediados por mecanismos pre y post-sinápticos (Todd et al., 2006). Ullian y colaboradores observaron que los astrocitos incrementan el número de sinapsis estructuralmente maduras y funcionales, y que éstos son necesarios para mantener la estabilidad sináptica en células ganglionares de la retina (Ullian et al., 2001). Se ha visto que astrocitos, en el hipocampo, tienen la capacidad de expresar la efrina-A3,



ANTECEDENTES

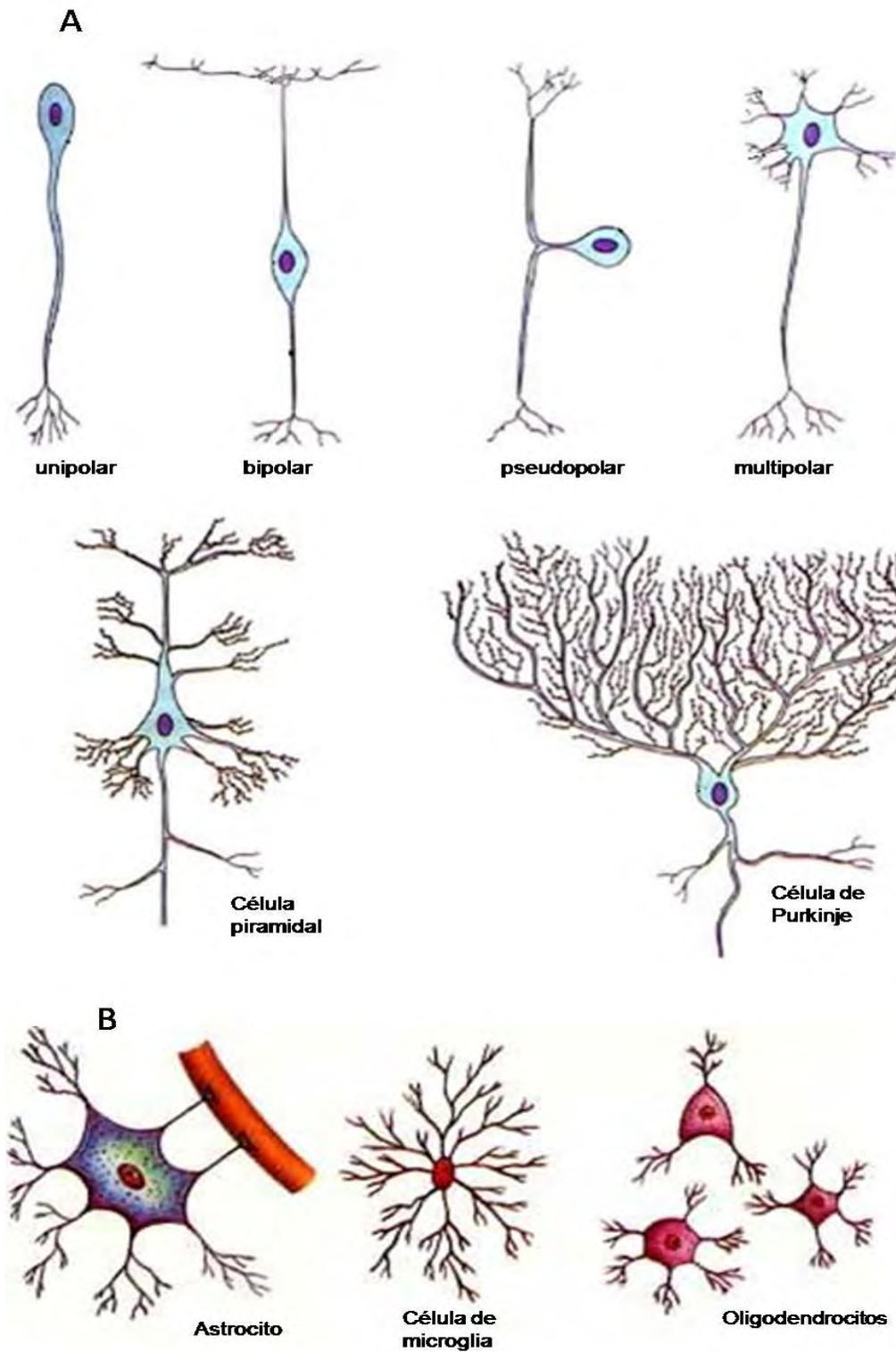


Figura 4. Algunos tipos de morfología de las células del SNC. A) Neuronas, B) células gliales (Bear, 2006).



ANTECEDENTES

la cual regula negativamente la expansión de espinas dendríticas (Murai et al., 2003). Esto sugiere que la glia puede modular directamente la plasticidad en el cerebro.

Se ha reportado que los astrocitos pueden modificar la morfología neuronal por dos vías. Pueden liberar factores que incrementen o disminuyan la transmisión sináptica (como la D-serina) o factores que estimulen directamente la sinaptogénesis. Entre los factores que influyen en la sinaptogénesis están las lamininas (intervienen en la maduración celular (Liesi et al., 1983)), neurotrofinas (regulan la diferenciación celular, crecimiento axonal y dendrítico, participan en el control de la expresión de enzimas, canales iónicos, neuropéptidos (Reichardt, 2006)), S100B (estimula la sobrevivencia neuronal, la diferenciación celular, la proliferación astrocítica, modula la actividad de células inflamatorias (Donato, 2001)) y el factor neurotrófico dependiente de actividad (promueve la respuesta a glutamato en las neuronas y el desarrollo morfológico (Blondel et al., 2000)) (Slezak et al., 2006).

El SNC sufre cambios importantes durante la gestación, se ha visto que diferentes regiones del cerebro son fundamentales en el desarrollo y mantenimiento de la gestación tales como el hipocampo, el área preóptica (Kinsley, 2008). En la figura 5 se muestran algunas áreas que participan en la manifestación de diferentes conductas en la gestación.

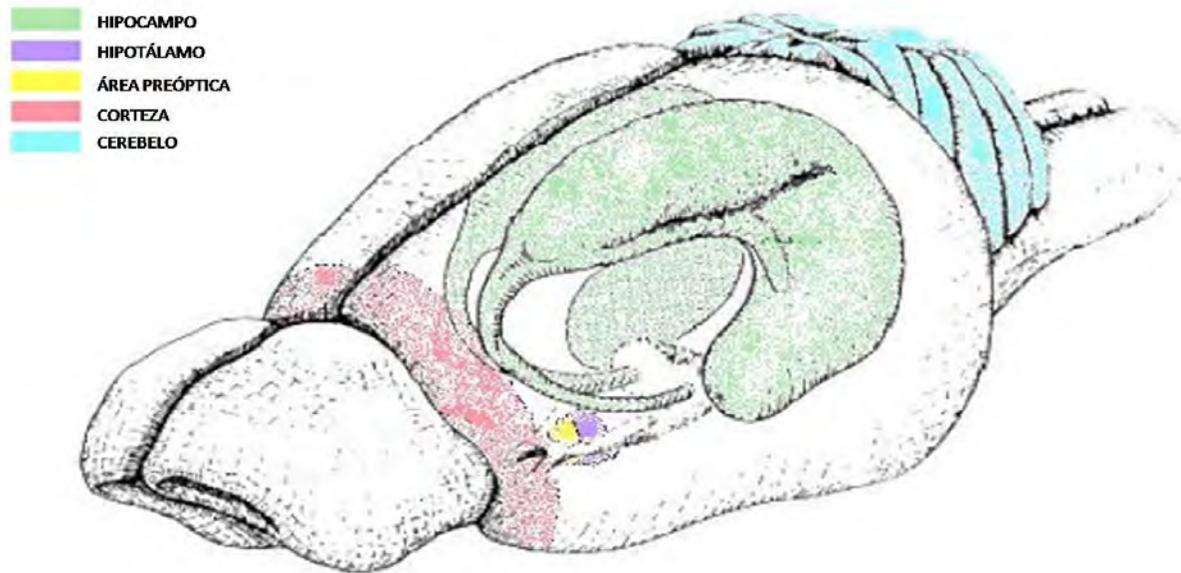


Figura 5. Esquema del cerebro rata. Se diferencia las áreas del cerebro que podrían estar relacionadas con la conducta maternal.

4.2.1. El hipocampo

El hipocampo es una estructura simétrica y bilateral, semejante a una corteza primitiva compuesta sólo por 3 capas de células, se localiza en la cara interna del lóbulo temporal a lo largo de la circunvolución que lleva su nombre, participa en la orientación y el aprendizaje espacial, en la formación de memoria a corto plazo y su consolidación, motivo por el cual tiene un papel fundamental en el establecimiento de la conducta materna (Aguilar Roblero, 2002; Bear, 2006).

En el hipocampo, la información llega desde la corteza entorrinal, se comunica con el giro dentado, éste transmite hacia CA3 y después a CA1, tal como se indica en la figura 6. La información también puede recibirse de las conexiones que el hipocampo tiene con el septum.



ANTECEDENTES

Pawluski y Galea evaluaron la concentración de espinas dendríticas en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo en ratas nulíparas, primíparas y múltiparas. Se observó que las ratas primíparas tienen una disminución en la longitud y la ramificación en ambas regiones al comparar con las ratas nulíparas y múltiparas, además observaron que la densidad de espinas en la región CA1 es mayor en las ratas múltiparas que en las nulíparas o las primíparas. Estos cambios en la plasticidad neuronal pueden estar relacionados al proceso de aprendizaje y memoria que se presenta en la gestación de la rata (Pawluski et al., 2006).

Kinsley y colaboradores determinaron la concentración de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo en ratas vírgenes durante el diestro, el estro y el proestro, ratas al día 21 de la gestación y al día 5-6 de la lactancia, observando que al día 21 se alcanzaba el valor máximo de espinas dendríticas llegando a más del doble de concentración en comparación con las ratas en el estro. Además, evaluaron si el E2 y la P4 participaban en el incremento de la concentración de las espinas dendríticas en CA1 mediante tratamientos de E2/P4 en ratas nulíparas ovariectomizadas encontrándose que, efectivamente, hay un incremento en las espinas dendríticas cuando se comparó con el control en una relación de 2:1 (Kinsley et al., 2006).

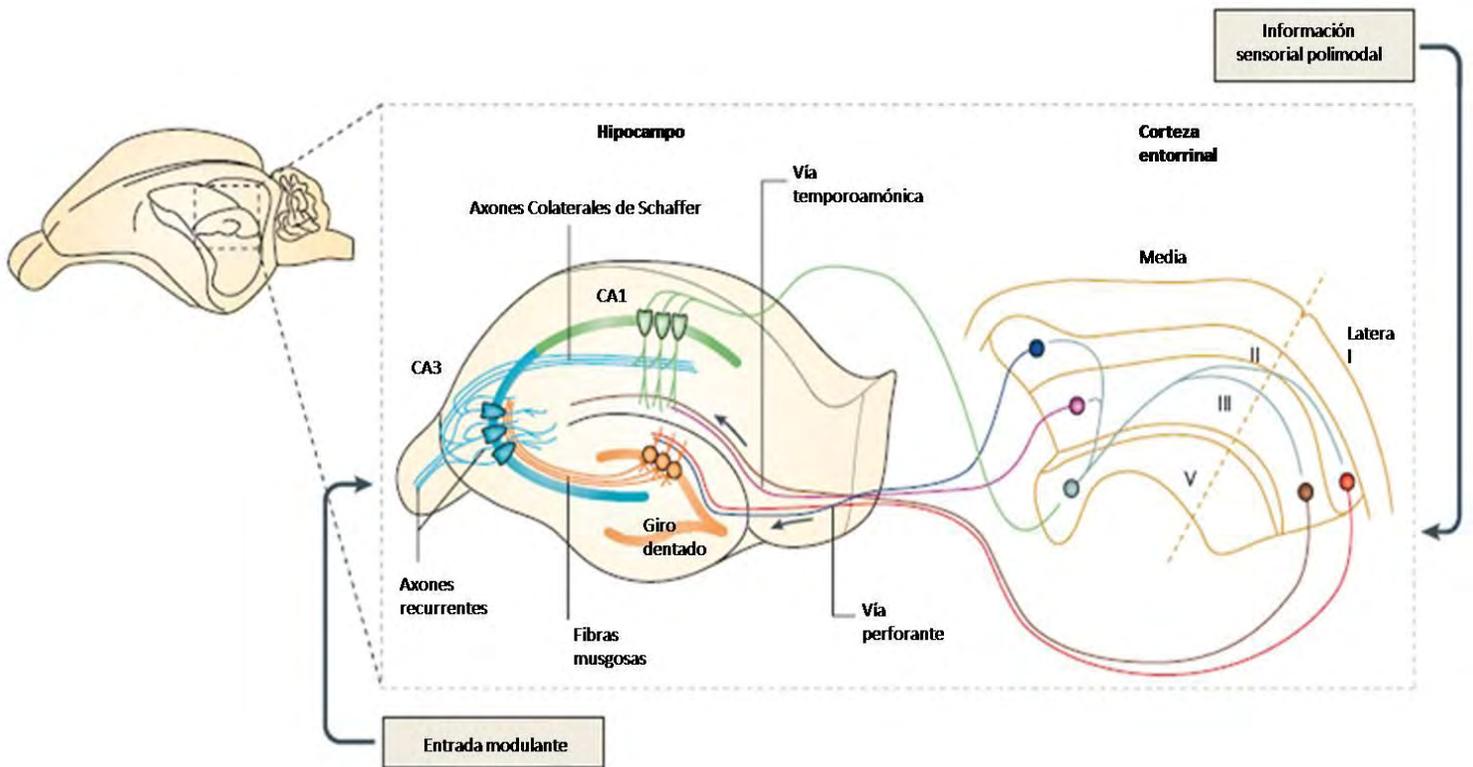


Figura 6. Flujo sináptico del hipocampo. Los impulsos viajan desde la corteza entorrinal hacia el giro dentado por la vía perforante (principal vía aferente) luego hacia la región CA3 y luego a CA1; también puede viajar hacia CA3 a través de la vía temporo-amónica (vía aferente secundaria). CA1 tiene vías eferentes hacia el subículo a la corteza entorrinal. (Neves et al., 2008).

4.2.2. El hipotálamo

El hipotálamo se localiza en la base del cerebro y constituye la prolongación rostroventral del tallo cerebral, se halla situado por debajo del tálamo. En el eje rostrocausal se distinguen las regiones preóptica, anterior, tuberal y mamilar. El hipotálamo participa en la regulación de procesos asociados con el mantenimiento de la homeostasis y los ritmos biológicos, además de que es una región donde se integran procesos que controlan la alimentación, la ingestión de agua, la reproducción, el sueño y la conducta materna (Aguilar Roblero, 2002; Bear, 2006).



ANTECEDENTES

Hacia el final de la gestación los niveles del RP se incrementan en diferentes regiones del SNC. Numan y colaboradores determinaron el número de células inmunoreactivas a RP en diversos núcleos hipotalámicos encontrando un incremento en el número de células que expresan el RP en los días 15 y 21 de la gestación al compararla con el día 3 de la gestación, además estos niveles de RP disminuyeron al día 3 de la lactancia (Numan et al., 1999).

Broad y colaboradores sugieren que el incremento de P4 y E2 en la gestación inducen la expresión del mRNA del receptor a oxitocina (OTR) durante la última semana de la gestación en diferentes regiones del sistema olfatorio, el hipotálamo y el sistema límbico en ovejas. Ellos compararon ovejas ovariectomizadas tratadas con E2 y P4 contra un grupo control observándose una mayor expresión de mRNA del OTR bajo el tratamiento hormonal (Broad et al., 1999).

Meddle y colaboradores evaluaron la expresión de OTR al final de la gestación, en el parto y en el periodo postparto observándose un incremento en la cantidad de mRNA del OTR en los días anteriores al parto, (21 y 22 días de la gestación) llegando a un pico máximo en el día del parto, y descendiendo en la etapa postparto en diversas áreas del SNC (núcleo supraóptico, médula ventrolateral, bulbo olfatorio, área preóptica media, amígdala media). Además observaron un incremento en la actividad de las células inmunopositivas a OTR en el día 21 de la gestación y el momento del parto al compararseles contra ratas vírgenes en la etapa del proestro (Meddle et al., 2007).

Se ha visto que hacia el final de la gestación (días 19 y 21) hay un incremento en la cantidad de neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares en el núcleo arcuato y que



ANTECEDENTES

éstas disminuyen el día 5 de la lactancia. Además, cuando se determinó la expresión del receptor a estrógenos (ER)- α en estas neuronas, se observó que hay un incremento ésta durante la gestación que disminuyó al día 5 de la lactancia. Sin embargo, cuando se determinó la inmunoreactividad a RP en estas células, se observó que no había cambios en la gestación ni en la lactancia en comparación con ratas en diestro (Steyn et al., 2007).

Mann y Babb caracterizaron los cambios en la expresión de ER α , ER β y RP en el bulbo olfatorio, el área preóptica media, el hipotálamo, amígdala media y la corteza temporal, encontrando una mayor expresión del RP al día 15 de la gestación en comparación con el día 21 ésta en todas la regiones estudiadas, sin cambios en el ER α y el ER β (Mann and Babb, 2005).

Se ha visto que la inmunoreactividad a ER en el núcleo ventromedial se incrementa al día 22 de la gestación y que desciende en el primer día postparto, contrario a lo que se observó en el núcleo del lecho de la estría terminal donde hay mayor inmunoreactividad en el primer día postparto (Wagner et al., 1998).

La leptina es una hormona que tiene la capacidad de regular el apetito, el cual se incrementa en la gestación. Ésta actúa en el núcleo arcuato en el hipotálamo, el cual, regula negativamente la ingesta alimenticia a través del control en la liberación del neuropéptido Y (NPY). Durante el embarazo, a pesar de que la leptina está en altas concentraciones, se ha visto que en el núcleo arcuato hay una baja expresión del receptor a leptina permitiendo la acción orexigénica del NPY liberado por este núcleo. En la lactancia la leptina disminuye su concentración permitiendo, de igual manera, la acción orexigénica del NPY. (Ladyman and Grattan, 2005). Por otro lado, se conoce que los



ANTECEDENTES

astrocitos tiene la capacidad de expresar NPY como promotor en el crecimiento de neuritas (Muller et al., 1995).

Se ha visto que en el núcleo supraóptico del hipotálamo, antes de la gestación, algunas las neuronas se encuentran separadas de otras neuronas por finos procesos de las células gliales, estos procesos se ven interrumpidos por el ambiente hormonal que prevalece en el parto y la lactancia permitiendo el acercamiento de la neuronas y sus dendritas para que, en el parto y la lactancia, las neuronas secretoras de oxitocina y vasopresina se activen simultáneamente liberando pulsos de oxitocina (Purves, 2001).

4.2.3. El área preóptica

El área preóptica (APO) es uno de los núcleos hipotalámicos que conforman al hipotálamo, se encuentra en la parte más rostral de éste, entre el diencefalo y el telencefalo justo en la base del encéfalo. El APO recibe información de la mayoría de las modalidades sensoriales (tiene aferencias del hipotálamo con excepción de los núcleos supraóptico, supraquiasmático, y mamilar; de regiones límbicas como la amígdala el subículo ventral, y el núcleo septal; de las áreas corticales insular e infralímbica) (Simerly and Swanson, 1986; Wagner et al., 1998) y es por eso que integra información medioambiental. El APO, en general es el centro de regulación de muchas funciones autonómicas como la termorregulación, la sed, el hambre, el comportamiento sexual masculino y el comportamiento maternal (Aguilar Roblero, 2002; Balthazart and Ball, 2007; Bear, 2006).



ANTECEDENTES

El APO es fundamental para el establecimiento de la conducta materna durante el embarazo. Se ha reportado que al inducir daño específico en esta región la manifestación de la conducta maternal no se presenta, además la administración de E2 o de prolactina en el APO estimula la manifestación de esta conducta (Bridges et al., 1990; Numan, 1988). Lesiones en el APO media por el ácido N-metil aspártico bloquean la construcción del nido (Kalinichev et al., 2000).

4.2.4. La corteza frontal

La corteza frontal es de asociación de información y está ubicada en el lóbulo frontal. A pesar de que la corteza no puede ser considerada como una entidad anatómica o funcionalmente homogénea es factible distinguir láminas y columnas como patrones básicos de su organización. Hay 6 láminas paralelas a la superficie caracterizadas por el tamaño o densidad de las neuronas que contienen. Por otra parte, las columnas constituyen la unidad básica de procesamiento de información ya que varias láminas se conectan entre sí conformando un eje vertical (Aguilar Roblero, 2002; Bear, 2006).

Particularmente, la corteza frontal no puede ser definida por la entrada de información de un sistema sensorial predominante. Krettek y Price realizaron un estudio a profundidad de la citoarquitectura de la corteza frontal diferenciando 4 áreas principales: el área precentral, área rostral prelímbica, el área orbital, y el área insular agranular (Krettek and Price, 1977). Tiempo después Kolb agrupó las diferentes áreas y sub-áreas en 3 zonas intentando relacionarlas con las aferencias y eferencias de éstas: zona frontal media (mPFC), zona frontal ventral y la zona motora y pre-motora (Kolb, 1984).



ANTECEDENTES

Se ha visto que la mPFC, que corresponde al área rostral prelímbica, es importante en la manifestación de la conducta materna durante el embarazo y la construcción del nido ya que cuando se realizaron lesiones en esta zona del cerebro estas conductas se observaron disminuidas (Stamm, 1955). Esta zona es muy importante porque tiene aferencias hacia las regiones de los núcleos ventro medial y medio dorsal y la zona del medialis anterior en el tálamo.

Se ha visto que la mPFC contribuye a la toma de decisiones, a la supervisión, al auto-control, al cambio de tareas y al orden de los eventos para la manifestación de un determinado comportamiento (Dalley et al., 2004). Alfonso y colaboradores evaluaron la participación de la mPFC en el comportamiento materno induciendo lesiones con N-metil aspartato. Ellos encontraron que solo las conductas del lamido anogenital y del acarreo fueron alteradas mientras que la construcción del nido fue similar al compararla con el grupo control (Afonso et al., 2007).

Glaser y colaboradores observaron una disminución en la concentración de ácido-5-hidroxiindol-3-acético (metabolito mayoritario de la serotonina) en la corteza frontal y estriada al día 15 de la gestación. También observaron que el receptor a serotonina S2 se encuentra disminuido al día 4 de la lactancia (Glaser et al., 1990).

4.2.5. El cerebelo

El cerebelo se localiza dorsal al tallo cerebral, está dividido en varios lóbulos separados entre sí por fisuras. Se divide en tres regiones arquicerebelo (más antigua y mejor conservada), paleocerebelo y neocerebelo (más reciente en la filogenia). El



ANTECEDENTES

cerebelo se encuentra íntimamente relacionado con todas las regiones en donde se regula el movimiento fino y desempeña una importante función como integrador de la actividad motora voluntaria e involuntaria. El cerebelo puede detectar errores en el movimiento antes de que se ejecuten ya que posee aferencias y eferencias hacia la corteza, el tallo cerebral y la médula espinal. También se ha relacionado al cerebelo con el lenguaje y procesos de memoria y aprendizaje relacionados con habilidades motoras (Aguilar Roblero, 2002; Bear, 2006); Lalonde 1990).

4.3. Características del citoesqueleto

El citoesqueleto es un sistema de filamentos y microtúbulos que proporciona el soporte a la célula, participa en el transporte de vesículas, en la mitosis y endocitos; en las células eucarióticas está constituido básicamente de tres elementos: 1) los filamentos de actina, 2) los filamentos intermedios y 3) los microtúbulos. La morfología neuronal y glial depende de estas estructuras tanto en el cerebro en desarrollo como en adultos (Fig. 7) (Kandel et al., 2000).

Los filamentos de actina o microfilamentos están formados por una doble cadena de actina denominada actina F (filamentosa). La actina es la proteína del citoesqueleto más abundante en todas las células, en las neuronas están presentes dos isoformas que son la β y γ -actina cuya proporción en el cerebro de la rata es de 2:1. Los filamentos de actina se encuentran en la zona proximal a la membrana y determinan la flexibilidad



ANTECEDENTES

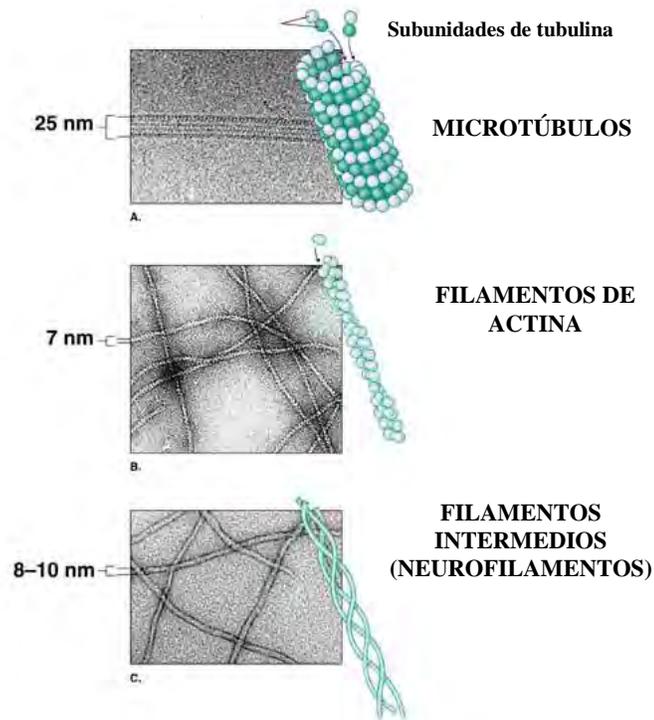


Figura 7. Elementos del citoesqueleto neuronal (Harcourt, 2001).

de la membrana en una célula. Esta proteína presenta diversas modificaciones postraduccionales que dan origen a formas adicionales de actina las cuales presentan una estructura globular bilobulada (Alberts, 2008).

Los microtúbulos están conformados por heterodímeros de α y β -tubulina, de 50 kDa de peso molecular, conformando protofilamentos que a su vez conforman la pared cilíndrica del microtúbulo. Los microtúbulos se unen a las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP's), las cuales proveen la funcionalidad a los microtúbulos, son proteínas que pueden fosforilarse en múltiples sitios por diversas cinasas. Los microtúbulos presentan una organización en haces y su polaridad es distinta, presentando un extremo relativamente positivo (*plus end*) de crecimiento rápido y un



ANTECEDENTES

extremo relativamente negativo (*minus end*) de crecimiento lento los cuales son determinantes en la función del microtúbulo (Alberts, 2008).

Los filamentos intermedios (IF) del citoesqueleto presentan diferentes proteínas dependiendo el tejido que se esté estudiando. El citoesqueleto de los astrocitos está formado principalmente por IF, los cuales, a su vez se componen por la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) vimentina y nestina (Eliasson et al., 1999). En las neuronas existen otro tipo de IF, los cuales se expresan diferencialmente en el desarrollo, se conoce que en la neurogénesis, las subunidades de neurofilamentos ligeros (NF-L) y medios (NF-M) de 61 y 90 kDa respectivamente son coexpresados, mientras que la expresión de la subunidad de neurofilamentos pesados (NF-H) de 115 kDa se presenta hasta el período postnatal (Lee and Cleveland, 1996).

4.3.1. Citoesqueleto en astrocitos

Los IF no se asocian con proteínas que tengan capacidad enzimática, a diferencia de los microtúbulos y los microfilamentos, siendo el componente menos estudiado del citoesqueleto. Aunque se ha descubierto que los IF contribuyen a la motilidad de los astrocitos y su activación, se han relacionado con etapas tempranas y tardías de la gliosis después de daño a nivel espinal o cerebral (Lepekhn et al., 2001).

Se ha visto que los IF en interacción con los microfilamentos y los microtúbulos contribuyen con el transporte de vesículas en astrocitos. Este transporte es relativamente rápido en neuronas y puede ser comparable en los astrocitos. En células tratadas con caliculina A, un despolimerizante de IF, la motilidad vesicular fue atenuada. Cuando



compararon astrocitos knock-out para GFAP y vimentina observaron una disminución en motilidad vesicular (Potokar et al., 2007).

4.4. Proteína acídica fibrilar glial (GFAP)

GFAP es una proteína de IF que pesa 50 kDa, provee de estabilidad estructural a los astrocitos y participa en la plasticidad que presentan éstos; está implicada en el movimiento y la comunicación celular, además ajusta la red de filamentos durante la mitosis. Se ha visto que GFAP es fundamental en la comunicación astrocito-neurona, astrocitos tratados con mRNA antisentido no tienen las extensiones de unión con las neuronas (Eng et al., 2000; Tardy et al., 1990)

El gen que codifica para GFAP se encuentra en el cromosoma 17 del humano y en el cromosoma 10 de la rata y se usa como marcador de células gliales. El gen que codifica para GFAP posee 14 exones. GFAP posee tres dominios: 1) el dominio de unión a DNA hacia la región del N-terminal, 2) el dominio central o de unión a IF, y 3) un dominio C-terminal (Fig. 8). El dominio de unión a IF está dividido en 4 subdominios hélice α (1A, 1B, 2A y 2B).

GFAP posee 6 isoformas, las cuales, provienen del mismo gen. GFAP- α/β poseen el tamaño total de la proteína, difieren entre ellas en la región 5' no traducible. GFAP- γ está codificada por un mRNA que perdió el exón 1. Los mRNAs que codifican para GFAP- δ , GFAO- ϵ y GFAP- κ son generados por el corte-empalme del intrón 7 con uso variable del exón 7 creando diferentes secuencias en el C-terminal. GFAP- α es la isoforma predominante en células gliales (Liem and Messing, 2009).

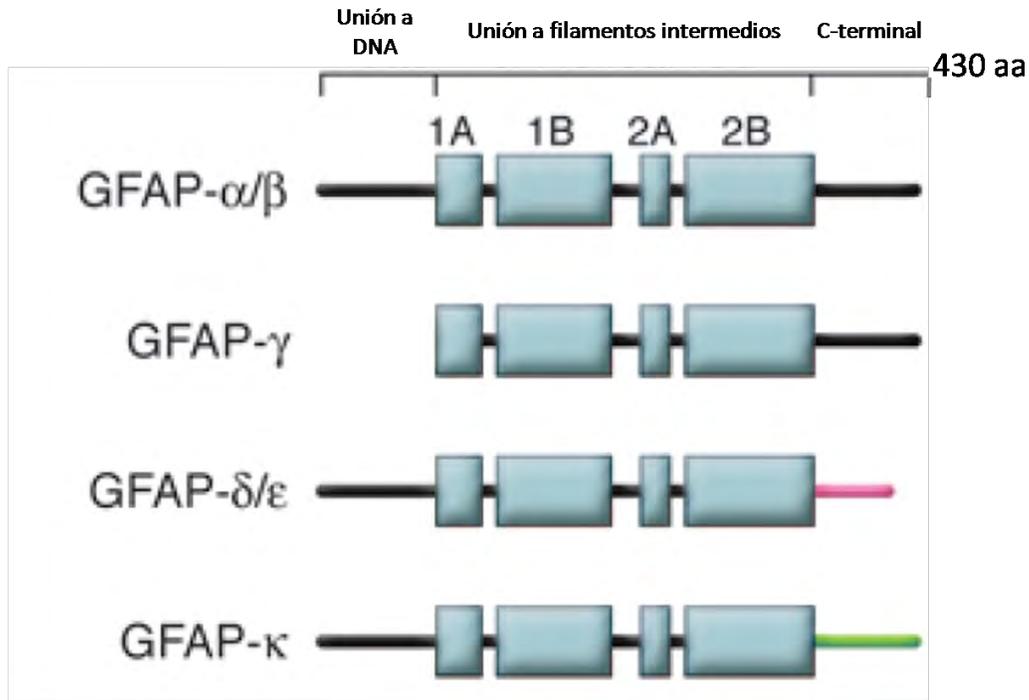


Figura 8. Esquema de GFAP y sus isoformas. Se muestran los 3 dominios de GFAP, hacia el N-terminal se encuentra el dominio de unión a DNA y al centro se observa el dominio central o de unión a filamentos intermedios (GFAP). Se muestran las 6 isoformas de GFAP (Liem and Messing, 2009)

Se conoce que la expresión de GFAP puede ser influenciada por la edad, el daño neuronal y las hormonas (Laping et al., 1994a; Laping et al., 1994b). En nuestro laboratorio se observaron variaciones morfológicas en astrocitos de hipocampo y una mayor inmunopositividad a GFAP al analizar las regiones CA1 y CA3 del hipocampo cuando se comparó la etapa del proestro con la etapa del diestro en la rata (Arias et al., 2009).

Se ha visto que el 17- β -E2 tiene la capacidad de acelerar el proceso de diferenciación de células totipotenciales en una neuroesfera hacia neuronas y células



ANTECEDENTES

parecidas a astrocitos. El 17- β -E2 incrementa el contenido de GFAP al compararlo con el control y este incremento está bloqueado por ICI, un antagonista de los receptores a estrógenos, además al realizar el experimento en presencia de PPT, un agonista del RE α se observó una inmunopositividad a GFAP similar a la que se obtuvo con el 17- β -E2 (Merlo et al., 2007)

Existe evidencia de que las células totipotenciales neuronales expresan GFAP y que pueden tener propiedades asociativas con las células gliales in vivo e in vitro (Hong et al., 2008).

GFAP puede ser fosforilada en el dominio de unión al DNA, se ha visto que existen 5 sitios de fosforilación en éste. En ratones knock-out se evaluó la importancia de los sitios fosforilables hacia el dominio N-terminal observándose un decremento en la inmunoreactividad a GFAP en diferentes regiones del cerebro, el cual fue mayor en los ratones que tenían 5 sitios mutados en comparación con los que tenían menos. Takemura y colaboradores sugieren que la fosforilación de estos sitios es indispensable para el mantenimiento de la plasticidad de los IF (Takemura et al., 2002).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La participación de los astrocitos en la modulación sináptica es indispensable en los procesos de memoria y aprendizaje, por lo que el conocimiento en la expresión de un marcador de astrocitos como GFAP es importante para entender los cambios en estos procesos y en la conducta durante la gestación.

Se han reportado diferencias sexuales y durante el ciclo estral en la expresión de GFAP y en la cantidad de astrocitos en el SNC, incrementándose en el proestro cuando hay mayor concentración de E2 y P4. Aunque se ha determinado que el contenido de GFAP cambia durante el ciclo estral y es mayor en hembras que en machos en el hipocampo de la rata, se desconoce si el contenido de esta proteína cambia durante la gestación. Por lo que en este trabajo se estudió el patrón de expresión de GFAP durante la gestación y al inicio de la lactancia en el hipocampo, el APO, la corteza frontal, el hipotálamo y el cerebelo de ratas. Esta información es indispensable para entender los mecanismos a través de los cuales actúan las hormonas sexuales en el SNC durante la gestación.



6. HIPÓTESIS

Dado que durante el embarazo hay un incremento significativo del E2 y la P4, y que se ha observado que la expresión de GFAP y la morfología de los astrocitos son reguladas por el E2 y la P4, entonces se observarán cambios en el contenido de GFAP durante el embarazo y al inicio de la lactancia en las distintas regiones del SNC.

7. OBJETIVO GENERAL

Conocer el patrón de expresión de GFAP en el SNC de la rata durante la gestación y al inicio de la lactancia.

7.1. Objetivos particulares

7.1.1. Determinar el contenido de GFAP, en el hipocampo, el hipotálamo, el APO, la corteza frontal y el cerebelo de la rata a los 2, 14, 18 y 21 días de gestación y a los 2 días de la lactancia.

7.1.2. Comparar el patrón de expresión en las regiones de estudio durante la gestación y el inicio de la lactancia.



8. METODOLOGÍA

8.1. Animales de experimentación

A lo largo de este estudio se utilizaron ratas hembra adultas de 230–250 g de peso de la cepa Sprague Dawley que se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 horas, con agua y comida *ad libitum* a 22°C de temperatura ambiente.

Las hembras fueron apareadas con un macho experto y a los 2, 14, 18 y 21 días de la gestación y a los 2 días de la lactancia (n=5 ratas por grupo) se sacrificaron por decapitación y se disecaron el hipocampo, el APO, el hipotálamo, la corteza frontal y el cerebelo. Todas las regiones fueron procesadas inmediatamente para la extracción de proteínas totales.

8.2. Extracción y cuantificación de proteínas

Se realizó la extracción de las proteínas totales de las diferentes regiones del SNC de las ratas gestantes y lactantes mediante la técnica que se explica a continuación:

1. En tubos estériles, se homogenizaron los tejidos en estudio en una relación 100 mg por 200 μ L de solución amortiguadora de lisis TDG (ditiotreititol 1 mM, Tris HCl 10 mM, glicerol 30%, EDTA 1 mM, leupeptina 2 μ g/mL, aprotinina 22.5 μ g/mL, PMFS 1 mM, o-vanadato 1 mM, azida de sodio 15 mM, triton 1%).



2. Las muestras homogenizadas se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se depositó en alícuotas de 200 μ L.

La concentración se determinó por el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) para realizar la curva patrón en concentraciones de 2.5, 5, 10, 15 y 20 μ g/mL.

8.3. *Western blot*

Para cada muestra se preparó el volumen necesario para cargar 50 μ g de proteína total mezclándolo con el amortiguador de carga (Tris base 50 mM, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) en una relación 1:1 volumen-volumen y se hirvieron durante 5 minutos.

Se depositaron 50 μ g de proteína total en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 8%, las proteínas fueron separadas por electroforesis a 90 volts por 2.5 horas. Enseguida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 75 mA durante 3 horas en una cámara de transferencia semihúmeda. Posteriormente se bloqueó la membrana con una solución de leche descremada al 3% y BSA al 1% en TBS 1x (NaCl, Tris,-Base, pH 7.4) durante 2 horas.

Se incubó la membrana con el anticuerpo primario, anti-GFAP (Chemicon) en una dilución 1:750 (1.33 μ g/mL) por 24 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con



una solución de TBS + Tween 20® 0.1%. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (IgG-HRP) (Santa Cruz) en una dilución de 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS + Tween 20® 0.1% y las membranas se colocaron en TBS para continuar con la detección. Las proteínas que fueron reconocidas por el anticuerpo primario se detectaron mediante quimioluminiscencia de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Con este sistema el peróxido de luminol y un activador son sustratos de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario que cuando reacciona se genera una señal de luminiscencia que se puede cuantificar utilizando placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada, se utilizó una proteína que no modifica su contenido en la etapa de estudio, en este caso α -tubulina. Se realizó un lavado con glicina ácida (0.1 M, pH 2.5) por 30 minutos a 60°C. Se incubó con anti-tubulina (Sigma) en una dilución de 1:10000 (2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) toda la noche. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS + Tween 20® 0.1%. Se incubó la membrana con un anticuerpo secundario anti-ratón IgG-HRP (Santa Cruz) a una dilución de 1:5000 durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS + Tween 20® 0.1% y se utilizó el método de alta sensibilidad antes descrito.

8.4. Análisis densitométrico y estadístico

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico para cuantificar las bandas que corresponden al contenido de GFAP y α -tubulina mediante el programa *ChemImager 4400*. El valor que arrojó el programa para densitometría para GFAP fue dividido entre el valor para α -tubulina para corregir el error de carga. A los datos obtenidos se les aplicó



METODOLOGÍA Y RESULTADOS

una ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de *Bonferroni*, se utilizó el programa GraphPad Prism 4 para calcular los valores de probabilidad.

9. RESULTADOS

En este trabajo se estudió el cambio en el contenido de GFAP durante la gestación y el inicio de la lactancia en la rata.

El contenido de GFAP en el hipocampo de ratas gestantes aumentó conforme avanza la gestación presentándose una diferencia significativa desde el día 18 y manteniéndose al día 2 de la lactancia (Fig. 9).

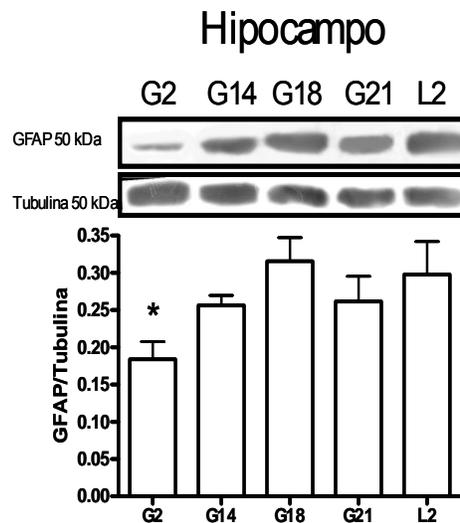


Figura 9. Cambios en el contenido de GFAP en el hipocampo de la rata durante la gestación y al inicio de la lactancia. Western blot representativo de GFAP a los 2, 14, 18, y 21 días de la gestación y al día 2 de la lactancia. La gráfica muestra el análisis densitométrico del contenido de GFAP para cada día de estudio. (*) $P < 0.05$ vs G14, G18 y L2. Media \pm SEM. n=5



Con respecto al hipotálamo el contenido de GFAP se incrementó al día 18 de la gestación y disminuyó al día 21, manteniéndose así hasta el inicio de la lactancia (Fig 10).

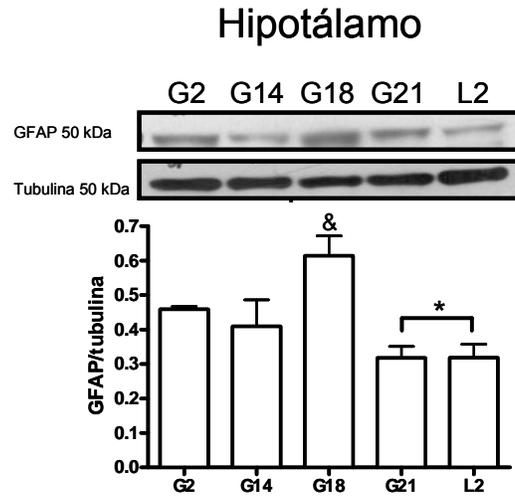


Figura 10. Cambios en el contenido de GFAP en el hipotálamo de la rata durante la gestación y al inicio de la lactancia. Western blot representativo de GFAP a los 2, 14, 18, y 21 días de la gestación y al día 2 de la lactancia. La gráfica muestra el análisis densitométrico del contenido de GFAP para cada día de estudio. (*) $P < 0.05$ vs G2 y G18; (&) vs G2. Media \pm SEM. n=5

En el APO se observó una disminución en el contenido de GFAP en el día 14 de la gestación con respecto a los otros días de este proceso y la lactancia (Fig. 11).

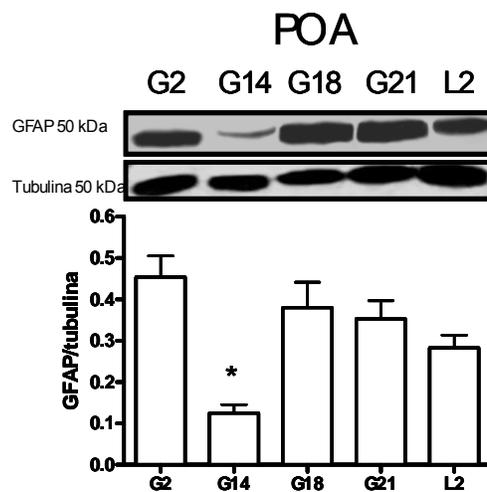


Figura 11. Cambios en el contenido de GFAP en el área preóptica de la rata durante la gestación y al inicio de la lactancia. Western blot representativo de GFAP a los 2, 14, 18, y 21 días de la gestación y al día 2 de la lactancia. La gráfica muestra el análisis densitométrico del contenido de GFAP para cada día de estudio. (*) $P < 0.05$ vs los otros grupos. Media \pm SEM. n=5



El contenido de GFAP se incrementó al día 14 de la gestación y al inicio de la lactancia en la corteza frontal (Fig. 12).

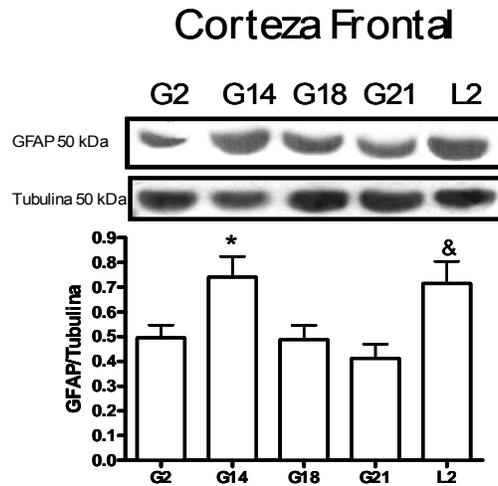


Figura 12. Cambios en el contenido de GFAP en la corteza frontal de la rata durante la gestación y al inicio de la lactancia. Western blot representativo de GFAP a los 2, 14, 18, y 21 días de la gestación y al día 2 de la lactancia. La gráfica muestra el análisis densitométrico del contenido de GFAP para cada día de estudio. (*) $P < 0.05$ vs G2, G18 y G21; (&) $P < 0.05$ vs G2, G18 y G21. Media \pm SEM. n=5

En el cerebelo decrece GFAP durante la gestación y se recupera al inicio de la lactancia (Fig 13).

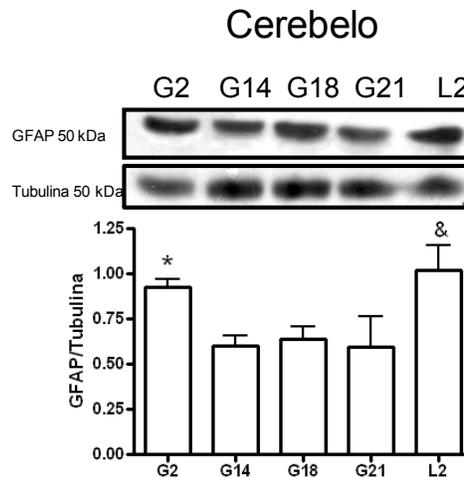


Figura 13. Cambios en el contenido de GFAP en el cerebelo de la rata durante la gestación y al inicio de la lactancia. Western blot representativo de GFAP a los 2, 14, 18, y 21 días de la gestación y al día 2 de la lactancia. La gráfica muestra el análisis densitométrico del contenido de GFAP para cada día de estudio. (*) $P < 0.05$ vs G14 y G18; (&) $P < 0.05$ vs G14 y G18. Media \pm SEM. n=5



10. DISCUSIÓN

En el hipocampo se observó un incremento en el contenido de GFAP durante la gestación que podría estar relacionado con el incremento en la concentración de E2 y P4 durante esta etapa, lo cual concuerda con lo que observaron Arias y colaboradores al analizar cortes de hipocampo, donde la cantidad de astrocitos aumentó durante el proestro, que es cuando hay una mayor concentración de E2 y P4, en comparación con el estro (Arias et al., 2009).

Durante el embarazo la madre debe memorizar sitios de abastecimiento para alimentarse ya que conforme avance la gestación su volumen y su peso corporal serán mayores por lo que el incremento en la expresión de GFAP podría estar relacionado a la actividad sináptica en el hipocampo en esta etapa. Sin embargo, al inicio de la lactancia, cuando los niveles de E2 y P4 decaen los niveles de GFAP se mantienen elevados, lo cual sugiere que el contenido de GFAP no sólo depende de E2 y P4 sino que otros factores pueden causar cambios en la expresión de esta proteína.

Uno de los factores que podría estar relacionado con los cambios en la cantidad de GFAP es la estimulación de las crías a la madre ya que en esta etapa se observan otros comportamientos maternos que no se observan durante la gestación los cuales se ven alterados cuando se retiran las crías de la madre en el periodo post-parto (Fleming et al., 1999). Además en el parto y después de éste hay secreción de oxitocina, la cual podría intervenir en los cambios que sufre la cantidad de GFAP en la transición de la gestación a la lactancia y al inicio de ésta última. Otra hormona que podría estar



relacionada con los cambios que sufre GFAP al día 2 de la lactancia es la prolactina ya que se encuentra en altos niveles durante la lactancia.

El hipotálamo presenta un patrón de expresión para GFAP semejante al del hipocampo hasta el día 18 de la gestación, sin embargo, al día 21 la cantidad de GFAP disminuye significativamente, justo cuando los niveles de P4 disminuyen. El decremento en la expresión de GFAP en el día 21 puede estar relacionada con los procesos que se ven alterados en algunos núcleos hipotalámicos durante la gestación, como lo reportan Purves y colaboradores para el núcleo supraóptico, los cuales son necesarios para la liberación de oxitocina en el momento del parto y en la lactancia (Purves, 2001).

Con respecto al inicio de la lactancia los niveles de GFAP se mantienen similares al día 21 de la gestación donde los niveles de P4 se encuentran en bajas concentraciones. Otro factor que podría estar relacionado con los cambios observados en la lactancia es la disminución de leptina permitiendo un incremento en el NPY, que regula a su vez la ingesta. Se ha visto que los astrocitos tienen la capacidad de expresar diferentes factores que promueven el crecimiento de neuritas como lo es el NPY (Muller et al., 1995).

El comportamiento agresivo que Mathews y colaboradores observaron en los días 16 y 19 de la gestación podría estar relacionado con el incremento en el contenido de GFAP que se observó al día 18 de la gestación en el hipotálamo (Matthews-Felton et al., 1995).



En el APO se observó una disminución significativa al día 14 de la gestación, luego se incrementó al día 18 y continuó con una tendencia a la baja el resto de la gestación. Esto es interesante porque es justo el día en que el E2 empieza a incrementarse de forma significativa en comparación al inicio de la gestación, además se inicia la tercera semana de gestación que es cuando el requerimiento alimenticio es mayor por lo cual pueden existir modificaciones plásticas en esta área relacionadas al consumo de nutrientes. Al igual que lo observado en el hipotálamo, al inicio de la lactancia, el contenido de GFAP es menor en comparación con la gestación.

En la corteza frontal hubo un incremento en la expresión de GFAP en el día 14 de la gestación, contrario a lo que se observó en el APO. A pesar de que la corteza no tiene una entrada sensorial predominante, existe una región relacionada con el comportamiento materno durante la gestación que es la mPFC que, entre otras funciones, interviene en el proceso de atención. Numan y colaboradores reportaron un incremento en la ansiedad al día 15 de la gestación el cual baja al día 18. Así, el incremento en el contenido de GFAP al día 14 podría estar relacionado con el incremento en la ansiedad pues en este proceso se incrementan las facultades perceptivas en la madre (Numan, 1988). Al inicio de la lactancia la cantidad de GFAP vuelve a incrementarse lo cual podría estar relacionado con la estimulación que realizan las crías a la madre.

En el cerebelo se observó que el contenido de GFAP disminuyó durante la gestación aunque se recuperó al inicio de la lactancia cuando existe una estimulación de las crías. El cerebelo participa en procesos donde son necesarios movimientos finos: en el comportamiento materno que se da después del parto son necesarios muchos movimientos finos, la limpieza de las crías, el acarreo de éstas y el amamantamiento.



DISCUSIÓN



Kinsley y colaboradores observaron que al final de la gestación había un incremento en la concentración de espinas dendríticas, sin embargo se desconocen los mecanismos mediante los cuales se genera este incremento (Kinsley and Lambert, 2008). Los cambios que ocurren en el contenido de GFAP podrían ser útiles en la comprensión del complicado proceso que es la espinogénesis no sólo en el hipocampo sino en diferentes regiones del cerebro.



11. CONCLUSIONES

- Existen cambios en el contenido de GFAP en el cerebro de rata durante la gestación y el inicio de la lactancia.
- El patrón de expresión de GFAP es diferente en cada área de estudio durante la gestación y el día 2 de la lactancia.



12. REFERENCIAS

- Afonso VM, Sison M, Lovic V and Fleming AS (2007) Medial prefrontal cortex lesions in the female rat affect sexual and maternal behavior and their sequential organization. *Behav Neurosci* **121**(3):515-526.
- Aguilar Roblero R, Escobar Briones, C. (2002) Organización anatómica y funcional del sistema nervioso, in *Motivación y Conducta* (Aguilar Roblero R, Escobar Briones, C. ed) pp 13-37, Manual Moderno, México.
- Alberts B, Wilson, J., Hunt, Tim. (2008) *Molecular biology of the cell* Garland Science, New York
- Arias C, Zepeda A, Hernandez-Ortega K, Leal-Galicia P, Lojero C and Camacho-Arroyo I (2009) Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus. *Horm Behav* **55**(1):257-263.
- Augustine RA, Ladyman SR and Grattan DR (2008) From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *J Physiol* **586**(2):387-397.
- Balthazart J and Ball GF (2007) Topography in the preoptic region: differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. *Front Neuroendocrinol* **28**(4):161-178.
- Bear MF, Connors, Barry W., Paradiso, Michael A. (2006) *Neuroscience*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Blondel O, Collin C, McCarran WJ, Zhu S, Zamostiano R, Gozes I, Brenneman DE and McKay RD (2000) A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci* **20**(21):8012-8020.
- Bredy TW, Grant RJ, Champagne DL and Meaney MJ (2003) Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *Eur J Neurosci* **18**(10):2903-2909.
- Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE and Lupini CE (1990) Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(20):8003-8007.
- Broad KD, Levy F, Evans G, Kimura T, Keverne EB and Kendrick KM (1999) Previous maternal experience potentiates the effect of parturition on oxytocin receptor mRNA expression in the paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* **11**(10):3725-3737.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ and Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* **22**(1):183-192.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM and Meaney MJ (1998) Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9):5335-5340.
- Dalley JW, Cardinal RN and Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* **28**(7):771-784.
- Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* **33**(7):637-668.
- Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE and Pekny M (1999) Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* **274**(34):23996-24006.
- Eng LF, Ghirnikar RS and Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* **25**(9-10):1439-1451.
- Fleming AS, O'Day DH and Kraemer GW (1999) Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neurosci Biobehav Rev* **23**(5):673-685.
- Genuth SM (2006) Reproducción femenina, in *Fisiología* (Levy MN, Koepfen, Bruce M., Stanton, Bruce A., ed) pp 739-745, Elsevier, España.
- Glaser J, Russell VA, de Villiers AS, Searson JA and Taljaard JJ (1990) Rat brain monoamine and Serotonin S2 receptor changes during pregnancy. *Neurochem Res* **15**(10):949-956.



REFERENCIAS



- Hodgen GD (1988) in *The Physiology of Reproduction* (Knobil E ed), Raven, New York.
- Hong S, Kang UJ, Isacson O and Kim KS (2008) Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. *J Neurochem* **104**(2):316-324.
- Houdebine LM, Djiane J, Dusanter-Fourt I, Martel P, Kelly PA, Devinoy E and Servely JL (1985) Hormonal action controlling mammary activity. *J Dairy Sci* **68**(2):489-500.
- Kalinichev M, Rosenblatt JS and Morrell JI (2000) The medial preoptic area, necessary for adult maternal behavior in rats, is only partially established as a component of the neural circuit that supports maternal behavior in juvenile rats. *Behav Neurosci* **114**(1):196-210.
- Kinsley CH (2008) The neuroplastic maternal brain. *Horm Behav* **54**(1):1-4.
- Kinsley CH and Lambert KG (2008) Reproduction-induced neuroplasticity: natural behavioural and neuronal alterations associated with the production and care of offspring. *J Neuroendocrinol* **20**(4):515-525.
- Kinsley CH, Trainer R, Stafisso-Sandoz G, Quadros P, Marcus LK, Hearon C, Meyer EA, Hester N, Morgan M, Kozub FJ and Lambert KG (2006) Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm Behav* **49**(2):131-142.
- Klopper A, Fuchs, Fritz (1982) Progesterona in *Endocrinología de la Gestación* (Klopper A ed) pp 126-129, Salvat, Barcelona, España.
- Kolb B (1984) Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Res* **320**(1):65-98.
- Krettek JE and Price JL (1977) The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol* **171**(2):157-191.
- Ladyman SR and Grattan DR (2005) Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. *Endocrinology* **146**(9):3868-3874.
- Laping NJ, Teter B, Anderson CP, Osterburg HH, O'Callaghan JP, Johnson SA and Finch CE (1994a) Age-related increases in glial fibrillary acidic protein do not show proportionate changes in transcription rates or DNA methylation in the cerebral cortex and hippocampus of male rats. *J Neurosci Res* **39**(6):710-717.
- Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I and Finch CE (1994b) Glial fibrillary acidic protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathol* **4**(3):259-275.
- Lee MK and Cleveland DW (1996) Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* **19**:187-217.
- Lepekhin EA, Eliasson C, Berthold CH, Berezin V, Bock E and Pekny M (2001) Intermediate filaments regulate astrocyte motility. *J Neurochem* **79**(3):617-625.
- Liem RK and Messing A (2009) Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* **119**(7):1814-1824.
- Liesi P, Dahl D and Vaheri A (1983) Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *J Cell Biol* **96**(3):920-924.
- Magiakou MA, Mastorakos G, Rabin D, Margioris AN, Dubbert B, Calogero AE, Tsigos C, Munson PJ and Chrousos GP (1996) The maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the third trimester of human pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **44**(4):419-428.
- Magistretti PJ (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* **209**(Pt 12):2304-2311.
- Mahesh VB, Brann DW and Hendry LB (1996) Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* **56**(1-6 Spec No):209-219.
- Mann PE and Babb JA (2005) Neural steroid hormone receptor gene expression in pregnant rats. *Brain Res Mol Brain Res* **142**(1):39-46.
- Martínez-Gómez M, Cruz Gómez, Y., Lucio Lucio, R. A., Hudson Thomson, R. (2002) Motivación y Conducta, in *Conducta Maternal* (Escobar Briones RAAR ed) pp 299-317, El Manual Moderno, México.
- Mastorakos G and Ilias I (2000) Maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and the postpartum period. Postpartum-related disorders. *Ann N Y Acad Sci* **900**:95-106.



REFERENCIAS



- Mastorakos G and Ilias I (2003) Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci* **997**:136-149.
- Matthews-Felton T, Corodimas KP, Rosenblatt JS and Morrell JI (1995) Lateral habenula neurons are necessary for the hormonal onset of maternal behavior and for the display of postpartum estrus in naturally parturient female rats. *Behav Neurosci* **109**(6):1172-1188.
- Meddle SL, Bishop VR, Gkoumassi E, van Leeuwen FW and Douglas AJ (2007) Dynamic changes in oxytocin receptor expression and activation at parturition in the rat brain. *Endocrinology* **148**(10):5095-5104.
- Metcalfe J (1988) in *The Physiology of Reproduction* (Knobil E ed), Raven, New York.
- Muller HW, Junghans U and Kappler J (1995) Astroglial neurotrophic and neurite-promoting factors. *Pharmacol Ther* **65**(1):1-18.
- Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y and Pasquale EB (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* **6**(2):153-160.
- Neves G, Cooke SF and Bliss TV (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* **9**(1):65-75.
- Numan M (1988) Neural basis of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* **13**(1-2):47-62.
- Numan M, Numan MJ, Marzella SR and Palumbo A (1998) Expression of c-fos, fos B, and egr-1 in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis during maternal behavior in rats. *Brain Res* **792**(2):348-352.
- Numan M, Roach JK, del Cerro MC, Guillaumon A, Segovia S, Sheehan TP and Numan MJ (1999) Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Res* **830**(2):358-371.
- Numan M and Stolzenberg DS (2009) Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Front Neuroendocrinol* **30**(1):46-64.
- Pawluski JL, Walker SK and Galea LA (2006) Reproductive experience differentially affects spatial reference and working memory performance in the mother. *Horm Behav* **49**(2):143-149.
- Potokar M, Kreft M, Li L, Daniel Andersson J, Pangrsic T, Chowdhury HH, Pekny M and Zorec R (2007) Cytoskeleton and vesicle mobility in astrocytes. *Traffic* **8**(1):12-20.
- Purves D, Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., La Matia, A. S., Mc Namara, J. O., Williams, S. M. (2001) *Neuroscience*. Sinauer Associates.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1473):1545-1564.
- Risberg A, Olsson K, Lyrenas S and Sjoquist M (2009) Plasma vasopressin, oxytocin, estradiol, and progesterone related to water and sodium excretion in normal pregnancy and gestational hypertension. *Acta Obstet Gynecol Scand*:1-8.
- Rosenblatt JS (1980) Hormonal and nonhormonal regulation of maternal behavior: a theoretical survey. *Reprod Nutr Dev* **20**(3B):791-800.
- Rosenblatt JS, Mayer AD and Giordano AL (1988) Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* **13**(1-2):29-46.
- Seagroves TN, Lydon JP, Hovey RC, Vonderhaar BK and Rosen JM (2000) C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. *Mol Endocrinol* **14**(3):359-368.
- Simerly RB and Swanson LW (1986) The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J Comp Neurol* **246**(3):312-342.
- Slezak M, Pfrieder FW and Soltys Z (2006) Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis. *J Physiol Paris* **99**(2-3):84-91.
- Stamm JS (1955) The function of the median cerebral cortex in maternal behavior of rats. *J Comp Physiol Psychol* **48**(4):347-356.
- Steyn FJ, Anderson GM and Grattan DR (2007) Expression of ovarian steroid hormone receptors in tuberoinfundibular dopaminergic neurones during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol* **19**(10):788-793.



REFERENCIAS

- Takemura M, Gomi H, Colucci-Guyon E and Itohara S (2002) Protective role of phosphorylation in turnover of glial fibrillary acidic protein in mice. *J Neurosci* **22**(16):6972-6979.
- Tardy M, Fages C, Le Prince G, Rolland B and Nunez J (1990) Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes. *Adv Exp Med Biol* **265**:41-52.
- Taya K and Greenwald GS (1981) Effect of hypophysectomy on day 12 of pregnancy on ovarian steroidogenesis in the rat. *Biol Reprod* **25**(4):692-698.
- Todd KJ, Serrano A, Lacaille JC and Robitaille R (2006) Glial cells in synaptic plasticity. *J Physiol Paris* **99**(2-3):75-83.
- Toro CT and Deakin JF (2007) Adult neurogenesis and schizophrenia: a window on abnormal early brain development? *Schizophr Res* **90**(1-3):1-14.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS and Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* **291**(5504):657-661.
- Wagner CK, Silverman AJ and Morrell JI (1998) Evidence for estrogen receptor in cell nuclei and axon terminals within the lateral habenula of the rat: regulation during pregnancy. *J Comp Neurol* **392**(3):330-342.