



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RESPUESTA
CELULAR ANTE EXCITOTOXICIDAD POR ÁCIDO KAÍNICO
EN EL HIPOCAMPO DURANTE LA LACTANCIA EN RATTUS
NORVEGICUS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

M. EN C. AMERICA VANOYE CARLO



2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Caracterización molecular de la respuesta celular ante excitotoxicidad por ácido kaínico en el hipocampo durante la lactancia en *Rattus norvegicus*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Marco A. Cerbón Cervantes 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 A. Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Dr. José Bargas Díaz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Clorinda Arias Álvarez	IIB, 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 del Dr. José Rodríguez Álvarez del Instituto de Neurociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos en cultivos primarios de neuronas, y de los integrantes de su grupo de investigación: la Química Rut Fadó y el Dr. Alfredo Miñao.

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

Se reconoce la asesoría técnica de Cristina Gutiérrez del Instituto de Neurociencias de la UAB en la preparación y mantenimiento de cultivos primarios de neuronas corticales e hipocampales.

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Durante la estancia en Barcelona recibí una beca por parte de The Company of Biologist (Cambridge, UK), a través de la revista *Diseases Models and Mechanisms*.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Patricia de Gortari Gallardo	Instituto Nacional de Psiquiatría
Secretario	Dr. Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Rocío Salceda Sacanelles	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina	IIB, UNAM

Era impensable: para imaginar la nada, era menester encontrarse allí, en pleno mundo, con los ojos bien abiertos, y viviente; la nada sólo era una idea en mi cabeza, una idea existente que flotaba en esa inmensidad; esa nada no había venido antes de la existencia, era una existencia como cualquier otra, y aparecida después de muchas otras. Yo gritaba "¡qué porquería, qué porquería!" y me sacudía para desembarazarme de esa porquería pegajosa, pero ella resistía y había tanto, toneladas y toneladas de existencia, indefinidamente; me ahogaba en el fondo de ese inmenso asco. Y entonces, de golpe, el jardín se vació como por un gran agujero, el mundo desapareció de la misma manera que había venido, o bien me desperté; en todo caso, no lo vi más; a mi alrededor quedaba tierra amarilla, de donde brotaban ramas secas, erguidas en el aire.

Jean-Paul Sartre

(La Náusea)

Agradecimientos

Hace tiempo me propuse llegar hasta aquí, aún no se por qué o para qué, pero el plan era simple y perfecto. Ha sido mucho tiempo, lleno de alti-bajos, de incontables oportunidades para comprender esto que llaman vida y numerosos reajustes al proyecto inicial.

Un día me desperté para darme cuenta que había quedado atrapada en una pesadilla, que se extendía rápidamente e invadía mi pasado y mi futuro, quise volver a dormir para despertar en otra realidad, no lo logré. Entonces comencé a rezar, no supe bien a bien para quien eran mis plegarias, ahora que lo pienso quizá a un dios, quizá al tiempo o tan solo fue desesperación. Sin importar el destinatario de mis ruegos obtuve respuesta, primero en mí, después en los demás. Y las palabras que alcanzaron mis oídos y me dieron fuerza para continuar salieron de quienes me han sostenido toda mi vida. Seguí adelante, pero no sola, porque miré alrededor y encontré la sonrisa de personas siempre dispuestas a guiarme por ese camino que debía atravesar. ¿Qué si ya salí de aquel terrible sueño o me estacione en él?, no lo sé; creo estar al final y dispuesta a seguir transformando la realidad.

A mi familia, mi eterno y más sólido soporte, gracias por infundirme la confianza necesaria. Mamá, gracias por estar siempre a mi lado y cuidarme sin importar la distancia. Raquel, Gabriela, Nadia y Alma, gracias por sujetarme cuando estoy a punto de caer. Amare, Camilo, Luca y sobrinos, gracias por su incondicional cariño.

A mis amigos, gracias por escucharme, apoyarme y ayudarme a ver mis errores. Noemí, Sonia y Eli, gracias por todos los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio y por sus consejos en tantas y tantas situaciones. Fabiola y Diana, gracias por todo el tiempo compartido. Pedro, gracias por esas interminables conversaciones en las que no importa la forma.

Víctor, gracias porque invariablemente apareces en el momento justo y permaneces hasta que pasa la tormenta.

A la gente que conocí en esos maravillosos tres meses de frío y trabajo, gracias por su hospitalidad. Rut, gracias porque sin conocerme me abriste tu casa y tu mundo.

Gracias a quienes dejaron una parte de su tiempo y de su ser en mi vida, a quienes estuvieron conmigo al inicio, durante o solo al final de este tiempo, a quien significó una pequeña ilusión o me hizo volar un momento para después dejarme caer, a quien me animó para dar un paso más o me hizo saber que había tomado la ruta equivocada, a todos los que me han hecho conocer el mundo a través de la risa o el llanto.

Mil Gracias

“Caracterización molecular de la respuesta celular ante excitotoxicidad por ácido kaínico en el hipocampo durante la lactancia en *Rattus norvegicus*”

Indice

Abreviaturas	I
Resumen	III
Abstract	IV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
1.1 Glutamato y excitotoxicidad	5
1.2 Receptores AMPA	9
1.2 Cerebro Materno	12
1.3 Receptores de Estrógenos	16
1.4 Oxitocina y Vasopresina	19
3. Planteamiento del problema	24
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos particulares	25
5. Metodología	26
5.1 Metodología de los experimentos <i>in vivo</i>	26
5.1.1 Animales	26
5.1.2 Tratamientos	26
5.1.3 Obtención de Proteína	27
5.1.4 Procesamiento de tejidos para histología	27
5.1.5 Inmunohistoquímica	27
5.1.6 Inmunofluorescencia	28
5.1.7 Western Blot	28
5.1.8 Análisis	28

5.2 Metodología de los experimentos <i>in vitro</i>	20
5.2.1 Cultivo Celular	29
5.2.2 Tratamientos	30
5.2.3 Viabilidad Celular	30
5.2.4 Evaluación de la Muerte Neuronal	30
5.2.5 Extracción de RNA y RT-PCR	31
5.2.6 Western Blot	31
5.2.7 Inmunocitofluorescencia	32
5.2.8 Análisis Estadístico	32
6. Resultados	33
6.1 Expresión de las subunidades de los receptores AMPA	33
6.2 Análisis de la expresión de receptores a estrógenos	41
6.2.1 Receptor de Estrógenos Alfa	41
6.2.2 Receptor de Estrógenos Beta	44
6.3 Efecto de Oxitocina y Vasopresina	48
7. Discusión	56
7.1 Receptores AMPA	56
7.2 Receptores Estrógenos	60
7.3 Oxitocina y Vasopresina	63
8. Conclusión	67
9. Referencias	68
Anexos	77

Índice de Figuras

Figura i. Familia de receptores de glutamato	6
Figura ii. Permeabilidad a Ca^{+2} en receptores AMPA	10
Figura iii. Neuroprotección durante la lactancia	15
Fig. 1. La Expresión de GluR1 disminuye en el hipocampo de animales lactantes	34
Fig. 2. La subunidad GluR1 no cambia su localización con la administración de kainato	36
Fig. 3. La expresión de GluR2 disminuye en el hipocampo después del tratamiento con kainato	37
Fig. 4. El kainato no modifica la localización subcelular de la subunidad GluR2	38
Fig. 5. Análisis de la expresión de GluR1 y GluR2 por inmunofluorescencia	40
Fig. 6. Expresión del ER- α en el hipocampo	42
Fig. 7. Localización celular de ER- α	43
Fig. 8. Expresión del ER- β en el hipocampo	45
Fig. 9. Localización subcelular de ER- β en el hipocampo	46
Fig. 10. Relocalización celular del ER- β neuronas hipocampales	47
Fig. 11. Expresión de AVPRs y OXTR en cultivos neuronales	49
Fig. 12. Localización de AVPRs y OXTR en cultivos de neuronas corticales	50
Fig. 13. Localización de AVPRs y OXTR en cultivos de neuronas hipocampales	51
Fig. 14. Efecto de AVP en la viabilidad celular	54
Fig. 15. Efecto de OXT en la viabilidad celular	55

1. Introducción

La neurodegeneración es un proceso complejo que conduce a diversos estados crónicos de enfermedad. Una definición convencional implica la muerte progresiva de las neuronas, misma que usualmente afecta a una población específica de células nerviosas, cuya vulnerabilidad determina las manifestaciones clínicas de una enfermedad neurodegenerativa particular (Matthews and Scallet, 1991; Aarts et al., 2003; Mocchegiani et al., 2005; Kwak and Weiss, 2006; Joseph et al., 2009).

Debido a la prevalencia, morbilidad y mortalidad, así como problemas sociales, éticos y personales que conllevan las afecciones neurodegenerativas, representan un problema de salud pública y suponen un reto a la medicina moderna. Esfuerzos considerables han sido dirigidos hacia la identificación de estrategias adecuadas para atender las condiciones patológicas del SNC (Perez-Navarro et al., 2006; Villmann and Becker, 2007; Barten and Albright, 2008; Qin et al., 2008; Yacoubian and Standaert, 2009).

Los factores que subyacen al fenómeno de neurodegeneración pueden ser clasificados como genéticos, ambientales, biológicos, metabólicos, excitotóxicos, autoinmunes así como senescencia. Cada uno de estos factores juega un papel crucial en la etiología de la degeneración neuronal, pero con una influencia que varía entre las diferentes patologías. Numerosos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado la participación de diferentes mecanismos en el daño neuronal observable en condiciones neurodegenerativas, entre los que sobresalen los disturbios en la homeostasis de calcio, el estrés oxidante, fenómenos de inflamación, apoptosis, irrupción del metabolismo energético, agregación de proteínas y excitotoxicidad (Aarts et al., 2003; Mergenthaler et al., 2004; Salinska et al., 2005; Kwak and Weiss, 2006; Besancon et al., 2008; Gil and Rego, 2008; Wojda et al., 2008; Dong et al., 2009).

El término excitotoxicidad fue acuñado en 1969 por Olney, y define la degeneración neuronal producida por aminoácidos excitadores. El glutamato, un aminoácido excitador, es el principal neurotransmisor excitador en el SNC de mamíferos. La respuesta a glutamato ocurre

a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos. La activación de los receptores ionotrópicos permite la permeabilidad de sodio, potasio o calcio. Aunque hay evidencia de que en el fenómeno de excitotoxicidad participan diferentes miembros de la superfamilia de receptores de glutamato, los receptores ionotrópicos han sido reconocidos como elementos clave de este proceso. Existen tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato: receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR), receptores 2-amino-3-(3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-il) propionato (AMPA) y receptores de kainato (Choi, 1987; Choi and Hartley, 1993; Hynd et al., 2004; Matute et al., 2005; Petrovic et al., 2005; Wojda et al., 2008).

El ácido kaínico (KA) es un agonista cíclico del glutamato capaz de despolarizar a las neuronas de manera pre- y postsináptica a través de su interacción con los receptores ionotrópicos AMPA y kainato. La administración sistémica o intracerebral de KA en roedores, causa actividad epileptiforme en las región CA3 del hipocampo, misma que se propaga a otras estructuras del sistema límbico y deriva en un pérdida celular en un patrón similar al que se ha encontrado en pacientes que sufren epilepsia de lóbulo temporal, por lo que ha sido ampliamente utilizada como modelo para estudio de los mecanismos celulares responsables del daño celular por excitotoxicidad (Lerma, 2003; Mayer, 2004; Wang et al., 2005).

Aunque diversos estudios experimentales en materia de neuroprotección y neurorescate señalan que, un considerable número de sustancias son capaces de contrarrestar y antagonizar la excitotoxicidad responsable de la degeneración neuronal, su empleo ha tenido poco éxito, por lo que el estudio de mecanismos endógenos de neuroprotección ha emergido como una aproximación terapéutica prometedora. En este sentido se ha demostrado que las hormonas esteroides ováricas, progesterona y estradiol tienen un efecto protector ante estímulos excitotóxicos, mientras que los glucocorticoides pueden exacerbar el daño neuronal inducido por los mismos estímulos (García-Segura et al., 2001; Weill-Engerer et al., 2002; Yang et al., 2003; Zausinger et al., 2003; Veiga et al., 2004; Weigl et al., 2005; Wise et al., 2005).

Con la finalidad de conocer el efecto de la susceptibilidad a daño neuronal en una condición fisiológica caracterizada por bajos niveles de hormonas ováricas esteroides y una alta

concentración relativa de glucocorticoides, como lo es el periodo de lactancia, en un estudio previo se exploró la posibilidad de que durante este proceso se modifique el daño excitotóxico, inducido por la administración sistémica de KA, en el hipocampo. Para ello, se evaluó el daño celular en las diferentes regiones hipocampales, CA1, CA3 y el hilus del giro dentado, en cerebros de ratas adultas, 24h después de la administración sistémica de KA durante la última semana de la lactancia, contrastando con el daño inducido por el mismo tratamiento en el hipocampo de animales vírgenes. Los resultados obtenidos en el estudio, mostraron una pérdida importante de neuronas en las diferentes áreas del hipocampo de animales tratados con KA durante la fase del diestro 1, principalmente en los estratos de neuronas piramidales. Por el contrario, el tratamiento no mostró una disminución significativa de la densidad neuronal y tampoco un incremento de la presencia de marcadores de daño neuronal en el hipocampo de animales tratados durante el día 19 de la lactancia, especialmente en la región CA1. Lo anterior sugirió que la lactancia puede ser una condición fisiológica de neuroprotección ante daño neuronal de índole excitotóxico y por tanto un modelo natural para el estudio de mecanismos endógenos de neuroprotección (Vanoye-Carlo et al., 2008).

En el presente estudio se exploraron algunos cambios que pudieran estar relacionados los mecanismos neuroprotectores en el hipocampo de la rata lactante, tales como cambios en la expresión de las subunidades de receptores AMPA y de los receptores de estrógenos; así como la posible participación de la oxitocina, la principal hormona responsable del mantenimiento de la lactancia.

Las subunidades de receptores AMPA, GluR1 y GluR2, son las más abundantes en el área hipocampal y participan en la respuesta neuronal ante estímulos dañinos como isquemia y excitotoxicidad. Al evaluarse la expresión y localización de estas subunidades en las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo dorsal de animales en metaestro y el día 19 de lactancia; se observó que en animales lactantes, 24 h después del tratamiento con KA hay una disminución significativa de la expresión de ambas subunidades en los estratos de neuronas piramidales y granulares, lo que no se observó en el hipocampo de animales vírgenes. Este resultado sugiere que durante la lactancia existe una reducción de la expresión de las subunidades GluR1 y

GluR2 de receptores AMPA en respuesta a la administración de KA, misma que pudiera relacionarse a la neuroprotección previamente observada.

Por otro lado, se conoce que las funciones biológicas de los estrógenos son mediadas a través de los receptores de estrógenos alfa y beta, y se ha demostrado que ambos receptores participan en mecanismos de neuroprotección por estrógenos; por lo que en el presente estudio, también se evaluó la expresión de ambos receptores en las regiones CA1, CA3 y GD. En los animales lactantes tratados con KA, se observaron incrementos significativos en los niveles de la expresión de ER beta, en las regiones CA1 y el GD, no así en el CA3, ni en los niveles de expresión de ER alfa. También se detectó una re-localización del receptor ER beta, de un patrón perinuclear a un patrón citoplasmático-nuclear, lo que sugiere que ER beta podría tener una función relevante en el fenómeno de neuroprotección, observado en el hipocampo de animales lactantes después de la administración de KA.

Los neuropéptidos oxitocina y vasopresina han sido implicados en la regulación del comportamiento social en mamíferos así como en los fenómenos de plasticidad del cerebro materno. El efecto de ambas hormonas en la sobrevivencia neuronal fue evaluado a través de un modelo *in vitro* de excitotoxicidad. Utilizando cultivos primarios de neuronas hipocampales y corticales, obtenidas de cerebros de ratas en el día fetal 17, se realizaron tratamientos agudos y crónicos de oxitocina y vasopresina para evaluar el impacto de estos péptidos en la sobrevivencia neuronal, ante estímulos neurotóxicos con KA y glutamato. La evaluación de muerte neuronal mostró que la oxitocina incrementa la sobrevivencia celular en cultivos de neuronas hipocampales tratados con glutamato, no así la vasopresina. Dichos resultados sugieren que la oxitocina podría ser una molécula implicada en la neuroprotección durante la lactancia.

Los resultados obtenidos sugieren que la neuroprotección del hipocampo en ratas lactantes, pudiera estar relacionada a cambios celulares en respuesta al estímulo excitotóxico tales como la disminución de la expresión de receptores AMPA y el incremento y relocalización de receptores de ER- β , además de a la acción de hormonas propias de la lactancia como la oxitocina.

2. Antecedentes

2.1. 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 la terminal sináptica de neuronas en concentraciones milimolares. La participación del Glu en el SNC incluye varias formas de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo (LTP) y la participa en la determinación de la morfología de las neuronas durante la ontogenia en el SNC (Lerma et al., 1997; Arundine and Tymianski, 2003).

El Glu posee también propiedades neurotóxicas y puede producir daño neuronal por incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteración de la organización del citoesqueleto y la disfunción mitocondrial y la activación de señales que conducen a la muerte celular por necrosis o apoptosis. Las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica se han relacionado con el daño neuronal observado 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 lateral amiotrófica (Hynd et al., 2004; Anborgh et al., 2005; Petrovic et al., 2005; Wojda et al., 2008).

Actualmente, se conoce que el Glu interactúa con receptores que se encuentran acoplados a sistemas de señalización asociados a proteínas G (metabotrópicos) y canales catiónicos activados por ligando denominados receptores ionotrópicos (iGluRs). La activación de este último tipo de receptores, conduce a una rápida movilización de iones de sodio y calcio en la célula. Estudios farmacológicos, biofísicos y moleculares sustentan la existencia de tres familias diferentes de iGluRs las cuales han sido nombradas de acuerdo al agonista que induce su activación, a saber: receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores tipo AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) y receptores tipo kainato (Arundine and Tymianski, 2004; Matute et al., 2005).

Las proteínas que conforman los iGluRs 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 un extremo carboxilo terminal intracelular. Los segmentos membranales 1, 3 y 4 atraviesan la membrana mientras que el segmento 2 forma una horquilla sin cruzarla, constituyendo 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 (Mayer, 2004).

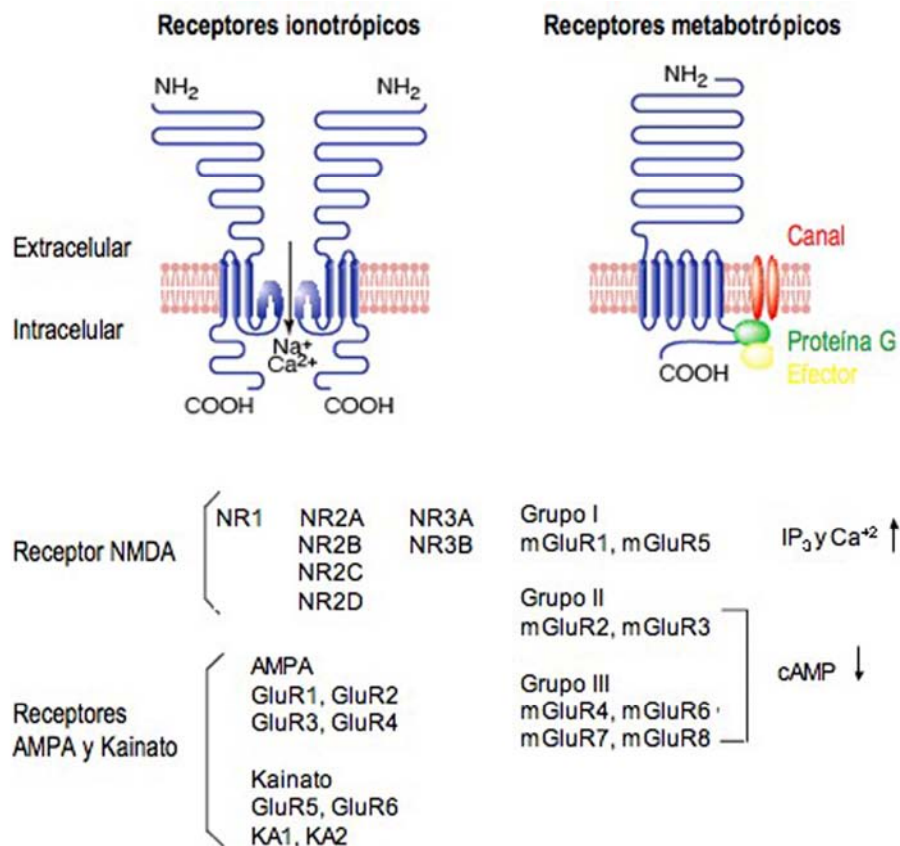


Figura i. Familia de receptores de glutamato. Se ilustran los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato así como las subunidades conocidas y los mecanismos primarios de transducción de señales de estos receptores. El glutamato activa canales permeables a iones de calcio, y sodio (receptores ionotrópicos). La activación de los receptores acoplados a proteínas G (receptores metabotrópicos) activa la enzima fosfolipasa C (PLC) y a la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, lo que conduce a un aumento en la concentración de IP₃ y calcio y la disminución de cAMP. Tomado de Nakanishi, et al. 2005 (modificado).

Gran parte de la toxicidad relacionada con glutamato es atribuida a la activación de receptores ionotrópicos, principalmente del tipo NMDA, estos receptores son canales lentos altamente permeables a Ca^{+2} y Na^{+} . Este tipo de receptores además de tener una cinética lenta y alta permeabilidad a calcio presentan inhibición dependiente de voltaje por un ión magnesio, co-activación por glicina, activación por poliaminas, inhibición por zinc y gran conductancia. La alta permeabilidad a calcio que presentan los receptores NMDA contribuye a la despolarización membranal y por ende al incremento en las concentraciones intracelulares de calcio, fenómeno asociado a los efectos fisiológicos y patológicos de la señalización de NMDA (Gass et al., 1993; Wallis et al., 1994; Lu et al., 1996; Fukuda et al., 1998; Mahanty and Sah, 1998).

Los receptores NMDA presentan una estructura tetramérica, de manera general, están conformados por dos subunidades NR1 y varias combinaciones de dos subunidades NR2(A-D), en algunos casos presentan la subunidad NR3 (A,B). La señalización por los receptores NMDA dirige, en gran medida, la plasticidad sináptica y participa en la generación de diferentes condiciones patológicas. De manera particular, la subunidad NR2 parece tener un papel fundamental en este tipo de procesos.

Los efectos de las subunidades NR2A y NR2B han sido ampliamente explorados en áreas de estudio como la plasticidad sináptica y en condiciones neurodegenerativas entre las que se incluyen epilepsia, Huntington e isquemia. En modelos de isquemia se ha logrado caracterizar la participación de NR2A en neuroprotección por preconditionamiento al estímulo, mientras que se ha observado que la subunidad NR2B aparentemente juega un papel importante en la inducción de muerte neuronal. Asimismo se ha reportado que en neuronas maduras, la subunidad NR2A se localiza en sitios sinápticos, mientras que la subunidad NR2B abunda en sitios extrasinápticos, por lo que se ha sugerido que la participación de los receptores NMDA en la terminal sináptica es vital para la sobrevivencia celular mientras que su actividad en sitios extrasinápticos está fuertemente ligada a cascadas de señalización que conllevan a la muerte neuronal. Los receptores a NMDA requieren despolarización membranal para su activación, misma que en muchos casos está ligada a la activación de receptores AMPA (Misra et al., 2000; Scott et al., 2001; Li et al., 2002; Bresler et al., 2004; Kohr, 2006).

El ácido kaínico, un análogo cíclico de glutamato, es una potente neurotoxina inductora de patrones convulsivos que conduce a la pérdida de células y astrogliosis, fenómenos característicos de la condición neurogenerativa, que se presenta en humanos, denominada epilepsia de lóbulo temporal. El kainato es capaz de inducir la despolarización de neuronas en forma pre- y postsináptica a través de la activación de los receptores a kainato (KARs) y los receptores AMPA (Ben-Ari and Cossart, 2000; Ben-Ari, 2008).

La administración sistémica de KA 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 áreas del cerebro, particularmente en el hipocampo y sus regiones CA1 y CA3 y en el hilus del giro dentado (GD). El efecto del kainato en el SNC ha sido ampliamente estudiado en la región hipocampal mediante el uso de sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha reportado que las regiones CA1 y CA3 además del hilus del giro dentado, son altamente sensibles a daño neuronal, lo que sugieren que la inducción de excitotoxicidad por la administración sistémica de ácido kaínico puede ser utilizada como modelo de estudio para conocer los mecanismos que subyacen a la muerte y sobrevivencia celular en el SNC ante estímulos dañinos. (Ben-Ari and Cossart, 2000; Frerking and Nicoll, 2000; Liu et al., 2001; Chen et al., 2002).

Los receptores a kainato están conformados por subunidades que presentan gran homología con las subunidades de los receptores tipo NMDA y AMPA, éstas pueden ser divididas en subunidades de alta (KA1 y KA2) y baja afinidad (GluR5-GluR7) por ácido kaínico. A diferencia de los receptores NMDA y AMPA, la función de los receptores de kainato no está bien estudiada debido, hasta hace algunos años, a la falta de inhibidores específicos que permitieran aislar la respuesta celular mediada por estos receptores. Sin embargo, actualmente se sabe que en ausencia de receptores AMPA funcionales, el kainato induce una corriente de desactivación lenta y desensibilización rápida en neuronas hipocampales, presumiblemente mediada a través de la activación de receptores a kainato (Zagulska-Szymczak et al., 2001; Braga et al., 2003; Jaskolski et al., 2005).

Los receptores a kainato se localizan tanto de manera pre- como post-sináptica en las células neuronales. A nivel presináptico, algunos subtipos de KARs facilitan la transmisión glutamatérgica y la plasticidad neuronal a corto plazo, mientras que otros regulan de manera negativa la transmisión GABAérgica hacia los estratos piramidales. A nivel de post-sinápsis en condiciones de liberación endógena de glutamato, los receptores a kainato participan en la excitabilidad de células piramidales e interneuronas GABAérgicas. En general se ha considerado que los receptores a kainato pueden modular la actividad de redes neuronales en direcciones opuestas (Paternain et al., 2000; Zagulska-Szymczak et al., 2001; Goldin et al., 2007; Ben-Ari, 2008).

2.1 Receptores AMPA

Los receptores AMPA median la transmisión sináptica rápida en sinapsis de tipo excitador en el SNC y presentan un papel crucial durante el desarrollo neuronal, los procesos de plasticidad sináptica y remodelación estructural. Los receptores AMPA son tetrámeros constituidos por las subunidades GluR1-4 (A-D) codificadas por genes separados, mismos que pueden presentar splicing alternativo y edición de RNA. Las subunidades de los receptores AMPA presentan un extremo amino largo que conforma el dominio extracelular, tres dominios transmembranales, una región de horquilla que forma la región que delimita al poro (dominio membranar 2) y un dominio intracelular conformado por el extremo carboxilo terminal.

Los receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2 son permeables a iones de calcio y zinc y presentan una cinética rápida además de una relación de corriente-voltaje (I-V) no lineal con rectificación externa, misma que se debe al bloqueo del voltaje por la acción de poliaminas intracelulares (fig.ii). La subunidad GluR2 de estos receptores confiere impermeabilidad a calcio y zinc debido a la presencia de un residuo de arginina en el dominio membranar 2 que delimita el poro iónico e influencia la cinética del canal y su conductancia, asimismo, repercute en el ensamble del receptor y el tráfico y liberación del mismo desde el retículo endoplasmático hasta los sitios de sinapsis (Hollmann et al., 1991; Burnashev et al., 1992b; Burnashev et al., 1992a).

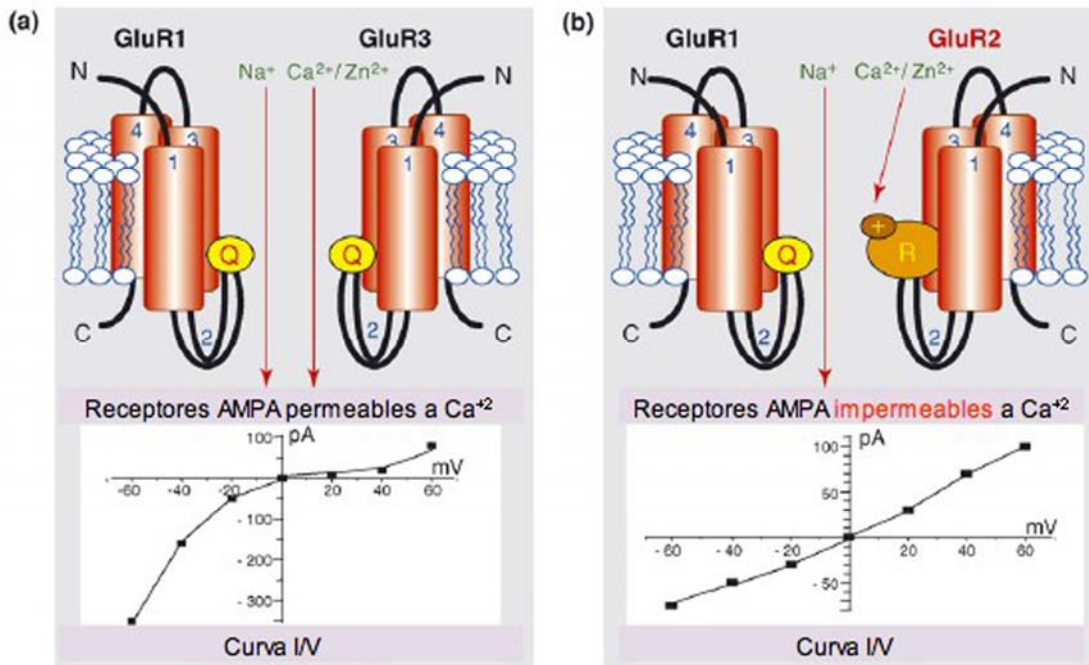


Figura ii. Permeabilidad a Ca⁺² en receptores AMPA. (a) Los receptores tipo AMPA que carecen de la subunidad GluR2 son permeables a iones de Ca⁺² y Zn⁺² y presentan una relación de corriente-voltaje (I-V) no lineal con rectificación externa. (b) En los receptores AMPA que presentan la subunidad GluR2 el flujo de Ca⁺² y Zn⁺² es limitada por la presencia de un residuo R en el sitio de edición Q/R. La relación I-V de estos receptores es lineal. Tomado de Liu, et al. 2007 (modificado).

Las neuronas de la neocorteza, el hipocampo, la amígdala y el cerebelo, expresan principalmente, receptores AMPA impermeables a calcio que presentan la subunidad GluR2. En estas células la disminución en la expresión de la subunidad GluR2, confiere vulnerabilidad ante insultos neuronales. Por el contrario, las neuronas no espinosas de SNC, incluyendo las interneuronas de espiga rápida del hipocampo, neocorteza y amígdala, las células esteladas de cerebelo, las interneuronas del cuerno dorsal y las interneuronas colinérgicas del estriado entre otras, expresan receptores AMPA permeables a calcio que carecen de la subunidad GluR2. En éstas células la señalización de calcio mediada por receptores AMPA es rápida y compartimentalizada, dada principalmente por bombas extrusivas de calcio, y crucial para la plasticidad sináptica (Geiger et al., 1995; Mahanty and Sah, 1998).

Las subunidades que componen a los receptores AMPA, así como su permeabilidad a calcio, cambian durante el desarrollo y en respuesta a actividad neuronal. Estos cambios se dan a través de la redistribución de las subunidades que componen a los receptores y a la actividad y síntesis de proteínas reguladoras de los mismos. Tanto la composición y permeabilidad de estos receptores se ve afectada por diferentes tipos de daño neuronal, como son la isquemia, la excitotoxicidad, lesiones de médula espinal, consumo de drogas y fármacos anti-psicóticos, los corticoesteroides y enfermedades de índole neurodegenerativo (Fitzgerald et al., 1996; Kwak and Weiss, 2006).

Diversos estudios señalan una importante participación de los receptores AMPA permeables a calcio en la excitotoxicidad asociada a varias alteraciones neurológicas y a enfermedades neurodegenerativas. En modelos de isquemia global transitoria se ha observado que la presencia de este tipo de receptores AMPA, induce muerte neuronal en células piramidales de la región CA1, asociada a deficiencias cognitivas. Una de las características primarias de este fenómeno es el aumento intracelular de calcio durante el periodo de isquemia y un aumento también de los iones de zinc libres en la células de la región CA1 entre las 24 y las 48 h después del periodo de isquemia, cambios que se dan de manera previa a la muerte celular (Pellegrini-Giampietro et al., 1992; Tanaka et al., 2000; Peng et al., 2006; Zhang et al., 2009)

En condiciones fisiológicas, los principales estratos neuronales del hipocampo expresan receptores AMPA impermeables a calcio. Ha sido reportado que los insultos isquémicos inducen la regulación negativa de la expresión de GluR2 y un cambio en la composición de los receptores AMPA, así como un aumento en la permeabilidad a zinc y calcio y de la sensibilidad a poliaminas (Gorter et al., 1997; Peng et al., 2006).

Además del papel que se atribuye a los receptores AMPA en el daño neuronal durante periodos de isquemia global, los cambios en la expresión de estos han sido asociados con la muerte neuronal generada a través de diferentes daños neurológicos y enfermedades, entre ellos, se incluyen la epilepsia, fenómenos de excitotoxicidad, esclerosis amiotrófica lateral y Alzheimer. De manera importante, ha sido reportado que durante las crisis convulsivas se da una regulación negativa de la expresión de la subunidad GluR2 en las regiones CA1 y CA3

del hipocampo y ésta es previa a la muerte neuronal (Pellegrini-Giampietro et al., 1992; Bennett et al., 1996; Gorter et al., 1997; Pellegrini-Giampietro et al., 1997).

2.2 El Cerebro materno

El ciclo reproductivo en mamíferos es un proceso complejo que comprende varias etapas como son el cortejo, el apareamiento, la ovulación, la gestación, el parto y la 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 (Stern and Lonstein, 2001; Voogt et al., 2001; Fleming et al., 2002)

Se ha considerado que el comportamiento materno es una situación mayor de adaptación y por ende un proceso multidimensional que conlleva cambios tanto a nivel corporal como cerebral y cuyo objetivo es asegurar la sobrevivencia del linaje y con ello el éxito reproductivo de la especie. La experiencia materna involucra la adquisición de nuevas conductas que le permiten a la madre llevar a cabo una gran variedad de actividades encaminadas al cuidado de la progenie, entre ellas el agrupar y limpiar a las crías y su protección ante depredadores mediante la construcción del nido, un estado continuo de alerta y la agresión intensificada ante potenciales predadores intra o inter-especie.

Además de lo relacionado al cuidado e interacción con las crías en el nido, la nueva madre ha de proveer el alimento, actividad que implica abandonar el lugar seguro que es su nido y a su progenie. Este tipo de conductas han sido relacionados con un aumento en las capacidades predatorias y de orientación espacial así como una reducción de la ansiedad inherente a la decisión de salir del nido dejando a las crías (Keverne, 2001a, b; Kinsley et al., 2008).

El cerebro materno ha sido estudiado como un modelo natural de plasticidad neuronal, de acuerdo al concepto de Kinsley, la habilidad natural del cerebro para modificar su organización y/o procesos y satisfacer las demandas del ambiente cambiante. Algunos de los cambios en el cerebro, relacionados a la experiencia materna (gestación y lactancia), han sido

el incremento en el grosor de la corteza cerebral durante la gestación y la reorganización de la corteza somatosensorial debida a la estimulación por el contacto con las crías, así como un incremento en la función hipocampal observada a través de LTP y aumento en la densidad de espinas dendríticas (Diamond et al., 1971);(Xerri et al., 1994).

Diversos estudios sugieren que la expresión del comportamiento materno, tanto en la etapa gestacional como durante la lactancia (posparto) se encuentra relacionado a las fluctuaciones hormonales. Los niveles de las hormonas reproductivas, entre las que se incluyen estrógenos (E2), progesterona (P4), lactógeno placentario (PL), prolactina (PRL) y oxitocina (OT), cambian con el estado reproductivo del animal. Aunado a ello, existe un componente epigenético, denominado transmisión matrilineal del comportamiento materno, mismo que se encuentra asociado a la interacción de la madre con las crías después del parto (Neville et al., 2002; Weaver et al., 2004; Champagne, 2008).

Se ha observado que durante la gestación y el posparto, la región hipocampal presenta cambios morfológicos importantes en el área CA1, donde la densidad de espinas dendríticas se encuentra aumentada en ratas en la fase tardía de la gestación y al día 5 posparto en comparación con ratas vírgenes que han sido tratadas con E2 y P4, hallazgo que ha sido interpretado como un reflejo de la plasticidad neuronal del hipocampo en estas etapas reproductivas (Kinsley et al., 2006; Pawluski and Galea, 2006).

Se ha demostrado también que el estrés y la ansiedad, factores que pueden interferir con los procesos de aprendizaje y memoria, se encuentran reguladas a la baja en hembras con experiencia materna, además de que la actividad neuronal, medida por la expresión de c-fos, en algunas áreas como son la región CA3 del hipocampo y la amígdala basolateral, se encuentra reducida en hembras que han parido bajo condiciones de estrés (Kinsley et al., 2008).

Los efectos neuronales de la experiencia materna facilitan el aprendizaje y la memoria, en ratas, principalmente de índole espacial, fenómeno en el que se ha implicado la activación de la vía de MAP cinasas en la región hipocampal en respuesta a la exposición a oxitocina,

además de la persistencia de esta adquisición a través del tiempo (Kinsley et al., 1999; Tomizawa et al., 2003; Gatewood et al., 2005; Kinsley et al., 2008).

En un estudio previo exploramos la posibilidad de que durante la lactancia, en ratas adultas, se modifique el daño excitotóxico inducido por la administración sistémica de kainato. Se utilizaron ratas vírgenes en la etapa diestro 1 (metaestro) del ciclo estral como control para evaluar el impacto de la administración de kainato, en la región dorsal del hipocampo, durante la fase final de la lactancia debido a que presentan un perfil hormonal similar de hormonas esteroides ováricas, sin embargo los animales en lactancia presenta niveles mayores de corticoesteroides.

Haciendo uso de tres métodos diferentes para evaluar daño celular el análisis de las mismas estructuras hipocampales a nivel rostro-caudal señala un menor daño en el hipocampo de los animales en lactancia en comparación con el daño registrado para el hipocampo de los animales vírgenes, 24 h después de la administración sistémica de kainato (fig. iii).

Asimismo, la evaluación de las manifestaciones del efecto de la administración de kainato, evaluada de acuerdo a la escala de Zhang (1997), muestra que los animales vírgenes presentan los signos correspondientes a los niveles 3-5, mientras que los animales lactantes no sobrepasan el nivel 2. Estos resultados muestran que la susceptibilidad a daño neuronal por excitotoxicidad es menor en el hipocampo de animales lactantes en comparación con los animales vírgenes.

Evidencia de neuroprotección durante la maternidad, ha sido previamente reportada por Berzaghi y colaboradores en 1987, cuyos estudios señalan una menor frecuencia de actividad espontánea recurrente en el hipocampo dorsal durante las crisis inducidas por administración de kainato. Aunado a lo anterior, Standley en 1999 señala una reducción de los sitios de unión a kainato en la región hipocampal durante las crisis inducidas por la administración de NMDA en animales gestantes.

Estos datos sugieren que la plasticidad del cerebro materno pudiera favorecer la disminución

de daño excitotóxico en el hipocampo a través de cambios en la expresión de receptores de glutamato y la fluctuación de hormonas como estrógenos, progesterona, oxitocina y prolactina, cuyos efectos en la cito-arquitectura, la plasticidad sináptica y cambios en el comportamiento han sido ampliamente estudiados.

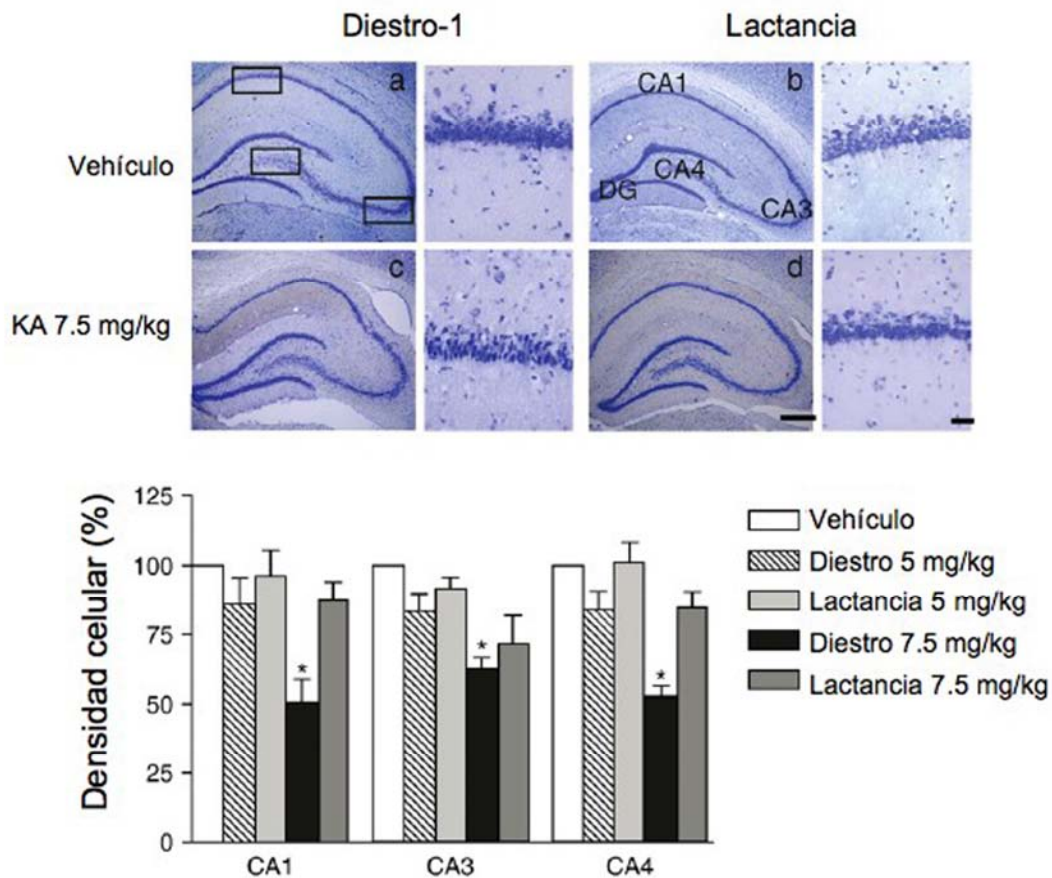


Figura iii. Neuroprotección durante la lactancia. Regiones hipocámpales de animales vírgenes (a,c) y lactantes (b, d), administradas con vehículo o kainato (5 mg/kg o 7.5 mg/kg). La administración sistémica de kainato induce de manera significativa la pérdida de neuronas piramidales en la región CA1 en animales vírgenes. Aparentemente las neuronas del hipocampo de animales lactantes solo fueron afectadas por la dosis de 7.5 mg/kg. Las microfotografías a la derecha de cada imagen panorámica muestra una amplificación del CA1. Escala = 400 y 50 μ m. La densidad celular se representa en la gráfica como porcentaje con respecto al tejido control y se muestra la pérdida neuronal por kainato en el hipocampo de animales vírgenes. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. * $p < 0.05$. (tomado de Vanoye-Carlo, 2008).

2.3 Receptores de Estrógenos

Los estrógenos, son hormonas esteroides que poseen una amplia gama de efectos tanto fisiológicos como patológicos en diferentes tejidos y órganos, incluyendo el sistema reproductivo, cardiovascular, inmune, óseo, el tracto gastrointestinal y respiratorio y el sistema nervioso central, particularmente el 17 β -estradiol (E_2). La acción de los estrógenos es mediada a través de dos receptores estructuralmente relacionados y pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares, los receptores de estrógenos (ERs) alfa y beta (ER- α y ER- β) que funcionan como factores de transcripción activados por ligando.

Los ERs pueden unir directamente a sus secuencias blanco de DNA en el núcleo celular o interactuar con otras proteínas para alterar la activación génica, este tipo de acciones genómicas ocurren de manera lenta, de modo que el proceso lleva de horas a días. Sin embargo, se conoce también que los estrógenos pueden producir efectos de tipo no genómico, mismos que se caracterizan por ocurrir de manera rápida, es decir en el orden de segundos a minutos, y que pueden ser mediados por ERs extranucleares o por receptores no clásicos unidos a la membrana celular (Kelly and Ronnekleiv, 2009; Suzuki et al., 2009; Waters et al., 2009).

Los mecanismos genómicos requieren una serie de eventos: la unión de la hormona a su receptor, la translocación de los ERs hacia el núcleo celular, su posterior dimerización e interacción con los elementos de unión a estrógenos (EREs) en los promotores de los genes regulados. Los mecanismos indirectos o no genómicos consisten en la activación de diferentes vías de señalización tales como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la vía Akt, la activación de la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB), entre otras. También ha sido reportado que los ERs pueden modular la expresión de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Merchenthaler et al., 2003; Mize et al., 2003; D'Astous et al., 2006; Suzuki et al., 2006; Thakur and Sharma, 2006).

Los estrógenos y sus receptores pueden activar funciones celulares a través de mecanismos genómicos y no genómicos. En sistema nervioso central, los estrógenos endógenos o

exógenos, regulan varios efectos sobre la plasticidad neuronal relacionada al aprendizaje entre los que se incluye la excitabilidad, procesos de memoria, la densidad de espinas dendríticas y sinapsis, así como de neuroprotección en modelos de isquemia neuronal, neurogénesis, neurodegeneración y envejecimiento (Weiland et al., 1997; Gundlach et al., 2000; Markou et al., 2005; Brann et al., 2007; Hojo et al., 2008).

Los ERs se encuentran ampliamente distribuidos en cerebro y médula espinal. En el cerebro de roedores, la distribución de los receptores de estrógenos ha sido identificada por ensayos autoradiográficos, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, encontrando la mayor expresión de estos receptores en diferentes regiones del sistema límbico, como son hipocampo, amígdala y septum lateral (Woolley and McEwen, 1994; Merchenthaler et al., 2003; Zhao et al., 2004; Markou et al., 2005; Brann et al., 2007; Yao et al., 2007; Hojo et al., 2008).

Se ha demostrado que los estrógenos tienen importantes efectos en el hipocampo. La región CA1 del hipocampo ha sido descrita como un área especialmente susceptible a los efectos del estradiol. Altos niveles de esta hormona producen un incremento de la densidad de espinas dendríticas en el stratum radiatum y cambios en el tamaño y la forma de las espinas. Aunado a lo anterior, el estradiol también tiene un efecto en la modulación de la expresión de proteínas sinápticas en modelos *in vitro*.

Las dos isoformas de ERs han sido identificadas en el hipocampo. El ER- α se encuentra presente de manera nuclear y extranuclear en células piramidales, granulares e inhibitorias, mientras que el ER- β presenta una expresión preferencial en sitios extranucleares de neuronas inhibitorias y piramidales y granulares. La activación de ambas isoformas de ERs ha sido implicada en procesos de aprendizaje y memoria además de fenómenos de neuroprotección (Hazell et al., 2009; Kelly and Ronnekleiv, 2009; Smith et al., 2009; Suzuki et al., 2009; Waters et al., 2009).

La contribución de los ERs en neuroprotección ha sido atribuida principalmente a la regulación en la expresión de moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas, de una manera directa o indirecta, así como la regulación de la transcripción de genes, involucrados en sobrevivencia neuronal, que presentan elementos de respuesta a estrógenos. Entre estos genes

se encuentran el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Yao et al., 2007; Zhao and Brinton, 2007; Morissette et al., 2008; Raz et al., 2008; Sawe et al., 2008; Aguirre and Baudry, 2009; Dominguez et al., 2009; Lebesgue et al., 2009).

El estradiol en las células neuronales, a través de sus receptores, puede activar vías de señalización asociadas a factores de crecimiento. En éste sentido, las vía más estudiada han sido las cascadas de ERK/MAPK y PI3K/Akt. La activación de la vía ERK/MAPK por estímulos extracelulares como factores de crecimiento, neurotransmisores o insultos neuronales, permite la activación de la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) mediante la fosforilación de sus residuos Ser133 y Ser144. Esta misma vía puede ser activada por estradiol promoviendo la fosforilación sostenida de CREB y la regulación transcripcional de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Se han demostrado que la activación de la vía ERK/MAPK, en la región CA1 del hipocampo, por administración de estradiol permite la sobrevivencia neuronal ante isquemia (Ciriza et al., 2004; Suzuki et al., 2006; Yao et al., 2007; Quesada et al., 2008; Sawe et al., 2008; De Nicola et al., 2009; Dominguez et al., 2009; Lebesgue et al., 2009).

Adicionalmente, se ha sugerido que existe una comunicación entre los ERs y los receptores a IGF-1, misma que es fundamental para la actividad tanto del estradiol como de IGF-1 debido a que ambas moléculas actúan de manera sinérgica en la remodelación sináptica, la sobrevivencia y diferenciación neuronal. A este respecto, García-Segura y colaboradores en 2006, demostraron que los receptores a IGF-1 son necesarios, en la protección por estradiol, de neuronas del hilus del giro dentado en el hipocampo ante daño inducido por crisis convulsivas. La transactivación de los receptores a IGF-1 mediante receptores de estrógenos asociados a membrana celular, induce la activación de la vía de señalización ERK-MAPK dando lugar a la fosforilación de CREB cuya participación en neuroprotección ha sido ampliamente reportada (Garcia-Segura et al., 2006; Garcia-Segura et al., 2007; Gonzalez et al., 2008; Lebesgue et al., 2009).

Diversos estudios señalan que en la sobrevivencia celular promovida por hormonas y factores

de crecimiento se encuentra implicada la vía de señalización PI3K-Akt. El estradiol promueve la activación de esta vía en diferentes tipos celulares, incluyendo neuronas. La proteína PI3K es activada mediante la fosforilación de la cinasa de serina-treonina Akt, misma que ha sido relacionada a la sobrevivencia celular a través de la inactivación de moléculas implicados en muerte celular como son los factores de transcripción de la familia de factores de transcripción Forkhead y GSK-3 (D'Astous et al., 2006; Quesada et al., 2008; Lebesgue et al., 2009).

Se conoce que la vía PI3K/Akt puede ser activada por neurotrofinas como BDNF y se ha propuesto que existe una estrecha relación entre la neuroprotección inducida por estradiol y la expresión de neurotrofinas, de manera que la transactivación del receptor a IGF-1 mediante receptores membranales a estrógenos permite la señalización celular por la vía ERK/MAPK que estimula la regulación positiva de BDNF, molécula capaz de activar la vía PI3K/Akt mediante su receptor trkB (Garcia-Segura et al., 2006; Gonzalez et al., 2008; Dominguez et al., 2009; Lebesgue et al., 2009).

2.4 Oxitocina y Vasopresina

La oxitocina (OT/OXT) es una hormona peptídica secretada a circulación desde la glándula pituitaria posterior, cuyas acciones clásicamente estudiadas son la contracción uterina durante el parto y la liberación de leche durante la lactancia, mismas que son inducidas a través de la activación de su receptor, OTR/OXTR (Alberi et al., 1997; Gimpl and Fahrenholz, 2001). Además de estos prominentes efectos en el tracto reproductivo, la oxitocina tiene otras influencias. Actualmente se conoce que existe una amplia distribución del receptor a oxitocina en el SNC con importantes efectos en el comportamiento reproductivo y social (Gimpl and Fahrenholz, 2001).

Los genes que codifican para los péptidos vasopresina (VP/AVP) y OT se encuentran en el mismo locus cromosómico y su transcripción ocurre en direcciones opuestas. La distancia intergénica entre estos genes varía de 3 a 12 kb en el ratón, humano y rata. Este tipo de

arreglo genómico sugiere que el origen de los genes es la duplicación de un gen ancestral seguido de la inversión de uno de ellos.

La regulación de gen que codifica para OT ha sido estudiada en sistemas heterólogos y ratones transgénicos. Los promotores de rata y humano presentan sitios de elementos de respuesta a receptor estrógenos alfa y beta, receptor a hormona tiroidea y los receptores a ácido retinoico RARa y RARb (Richard and Zingg, 1990; Burger et al., 2000).

El receptor a OT es un polipéptido que presenta 7 segmentos transmembranales y pertenece a la clase I de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). En el caso de la rata, la expresión del gen que codifica al receptor de oxitocina presenta múltiples sitios putativos de elementos de respuesta a interleucina-1 beta IL-1 , al factor nuclear de expresión para interleucina-6 (NF-IL6) y elementos de respuesta de fase aguda (APRE). En el extremo 5', se localiza un elemento de respuesta a AMPc (CRE), así como varios elementos reguladores potenciales entre los que se incluyen sitios AP-1, AP-2, AP-3, AP-4, una región ERE y un elemento incompleto de respuesta a esteroides. La vía de señalización por receptor a oxitocina se encuentra acoplada a proteínas del tipo Gq/11 y los sistemas de segundos mensajeros IP3 y calcio (Thibonnier et al., 1994; Thibonnier et al., 1998a; Thibonnier et al., 1998b).

Evidencia morfológica y electrofisiológica sugiere que la OT juega un papel importante como neurotransmisor y neuromodulador en el cerebro de la rata. Por autoradiografía ha sido demostrado que el receptor a oxitocina se encuentran presente en numerosas regiones del sistema nervioso central, incluyendo el sistema olfativo, el ganglio basal, el sistema límbico, el hipotálamo, el tallo cerebral y la médula espinal. El OTR es menos abundante en el hipocampo y otras regiones del sistema límbico con respecto a otras áreas del cerebro. Si bien no han sido reportadas diferencias sexuales en la densidad de estos receptores en el cerebro de manera general, se conoce que en algunas estructuras como el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH), la amígdala central, la cama núcleo de la stria terminalis (BNST) y el tubérculo olfativo, la modulación de este receptor es influenciada por estrógenos y testosterona (Crowley and Armstrong, 1992; Zaninetti and Raggenbass, 2000).

Los registros electrofisiológicos realizados *in situ* y en sistemas *in vitro* han revelado que la OT puede influenciar las propiedades bioeléctricas de poblaciones neuronales (Gimpl and Fahrenholz, 2001). La oxitocina puede incrementar la excitabilidad de motoneuronas preganglionares parasimpáticas a través de una corriente sostenida de sodio en forma independiente a la activación de fosfolipasas e inducida en parte por la activación de la adenilato ciclasa. La OT puede también reducir el intervalo de liberación de neurotransmisor en neuronas supraópticas y reducir la amplitud pero no la frecuencia de eventos sinápticos inhibidores mediados por receptores GABA (Blumenstein et al., 2004).

En hipocampo, se ha identificado a la región CA1 y al subiculum como sitios de gran afinidad por oxitocina, y se conoce que la oxitocina a través de su receptor es capaz de inducir la actividad de interneuronas del estrato piramidal y en algunas interneuronas del *stratum oriens* aumentando la transmisión sináptica inhibitoria en la vecindad de las neuronas piramidales por medio de un incremento de la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias GABAérgicas (Wang and Hatton, 2005).

Los receptores a oxitocina en ciertas áreas del sistema nervioso central pueden responder tanto a AVP como a OT en formas opuestas. En el hipocampo ventral, se sabe que la activación de OTRs por vasopresina tiene efecto facilitador en la consolidación de la memoria, mientras que su activación por oxitocina induce atenuación del proceso. Adicionalmente, se ha propuesto que en la región hipocámpal, la oxitocina y la arginina-vasopresina, puede actuar a través de los receptores AVP1 y los OTR.

La AVP, al igual que la OT, puede actuar tanto como una hormona o como un neuromodulador. A manera de hormona, los principales blancos de la vasopresina se encuentran localizados de manera periférica en órganos y tejidos como son los riñones, los vasos sanguíneos, el hígado y la pituitaria anterior (Barberis and Tribollet, 1996; Thibonnier et al., 1998b; Hibert et al., 1999).

Los receptores a vasopresina (VPRs/AVPRs), al igual que los OTRs, pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. En el caso de los receptores a vasopresina, se

distinguen dos grande subtipos, VP1 (V1, AVPR1) y VP2 (V2, AVPR2), mismos que se distribuyen en sistema nervioso y tejidos periféricos. Los receptores de vasopresina tipo 1 se subdividen a su vez en receptores de vasopresina V1A , los cuales actúan por medio de la activación de la fosfolipasa C induciendo movilización de calcio y son abundantes en músculo liso e hígado; y los receptores de vasopresina V1B, que se encuentran acoplados a la enzima fosfolipasa C y que son abundantes en la glándula pituitaria anterior. Los receptores de vasopresina V2, activan la adenilato ciclasa y son abundantes principalmente en riñón. Con menor afinidad, la vasopresina es también capaz de unirse a receptores de oxitocina (Thibonnier, 1990; Barberis et al., 1998; Thibonnier et al., 1998a; Thibonnier et al., 1998b; Thibonnier et al., 2002).

En el ANC, la vasopresina actúa principalmente a través de los AVPR1A, sin embargo la presencia de AVPR1B en algunas estructuras del cerebro ha sido reportada. En general, los AVPR1 son abundante en hipocampo y sistema límbico. A nivel central la AVP participa en el mantenimiento de funciones autonómicas como la regulación cardiovascular, la regulación de la temperatura corporal y la regulación del flujo de agua en la neocorteza, sin embargo actualmente se conoce que la AVP también está involucrada en la modulación de funciones cognitivas y en aspectos del comportamiento, como es el comportamiento sexual, el cuidado parental y el reconocimiento social así como en procesos de memoria, ansiedad y depresión (Brinton and McEwen, 1989; Barberis and Tribollet, 1996; Tribollet et al., 1997; Hibert et al., 1999; Alescio-Lautier et al., 2000; Thibonnier et al., 2002).

A través del uso de sistemas *in vitro*, se ha demostrado que la AVP es capaz de excitar poblaciones de motoneuronas e incrementar los estímulos sinápticos de carácter inhibitor también en motoneuronas, por lo que se ha considerado que puede regular, de manera dual, la función de las redes neuronales involucradas en el control motor. De igual forma en amígdala y septo lateral se ha demostrado este carácter dual de la AVP, efecto que ha sido relacionado a la modulación del miedo y la ansiedad por este nonapéptido (Appenrodt et al., 1998; Hatton and Li, 1998; Hibert et al., 1999; Muller et al., 1999; Alescio-Lautier et al., 2000; Kombian et al., 2000; Raggenbass, 2001; Joels et al., 2008).

Asimismo se ha reportado que la vasopresina ejerce acciones neurotróficas en neuronas hipocampales en sistemas *in vitro*, tales como el aumento del número de neuritas además de un incremento en la longitud, diámetro, complejidad morfológica y puntos de bifurcación de las mismas. El mecanismo de acción sugerido como factor neurotrófico, es a través de la activación de la PKC y la inducción de factores de transcripción como c-jun y c-fos (Brinton et al., 1994c, b; Brinton et al., 1994a).

3. Planteamiento del Problema

Las afecciones del sistema nervioso central, tales como epilepsia, trauma y patologías neurodegenerativas constituyen un problema de salud pública. En este tipo de condiciones, se ha asociado el fenómeno de excitotoxicidad como uno de los principales mecanismos que subyacen al daño neuronal.

Esfuerzos considerables han sido dirigidos hacia el diseño de procedimientos adecuados para atender las condiciones patológicas del SNC. En éste sentido, la identificación de moléculas farmacológicas para la reducción de daño cerebral por excitotoxicidad ha recibido mucha atención, sin embargo se han empleado con poco éxito, por lo que el estudio de mecanismos endógenos de neuroprotección ha emergido como una aproximación terapéutica prometedora.

En un estudio previo, demostramos que durante la lactancia, en el hipocampo de la rata adulta se presenta menor daño neuronal en respuesta a la administración sistémica de kainato, en comparación al daño celular que ocurre en el hipocampo de animales vírgenes con el mismo tratamiento. Esto sugiere que la lactancia puede ser una condición fisiológica de neuroprotección ante daño neuronal de índole excitotóxico y por tanto un modelo natural para el estudio de mecanismos endógenos de neuroprotección .

El objetivo del presente estudio es contribuir al conocimiento de los mecanismos endógenos de neuroprotección, a través de la caracterización de la respuesta celular del hipocampo de la rata lactante, en relación a la expresión de los receptores de glutamato tipo AMPA, la expresión de los receptores de estrógenos α y β , así como la participación de los neuromoduladores oxitocina y vasopresina en la sobrevivencia neuronal, ante estímulos excitotóxicos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Caracterizar la respuesta celular del hipocampo de la rata lactante, en relación a la expresión de los receptores de glutamato tipo AMPA, la expresión de los receptores de estrógenos α y β , así como la participación de los neuromoduladores oxitocina y vasopresina en la sobrevivencia neuronal, después de la administración sistémica de ácido kaínico.

4.2 Objetivos Particulares

4.2.1 Comparar la expresión y localización celular de las subunidad GluR1 y GluR2 de los receptores AMPA en las regiones hipocampales de ratas tratadas con ácido kaínico durante la lactancia y el diestro 1, y asociar las diferencias de expresión con el efecto neuroprotector observado durante la lactancia.

4.2.2 Comparar la expresión y localización celular de los receptores de estrógenos alfa y beta (ER- α y ER- β) en las regiones hipocampales de ratas tratadas con ácido kaínico durante la lactancia y el diestro 1, y asociar las diferencias de expresión con el efecto neuroprotector observado durante la lactancia.

4.2.3 Evaluar el efecto de la oxitocina y la vasopresina en la sobrevivencia neuronal inducida por excitotoxicidad en cultivos neuronales primarios.

5. Metodología

5.1 Metodología de los experimentos *in vivo*

5.1.1 *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 (12 hrs/12 hrs), temperatura estándar (22°C) y comida, *ad libitum*. 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 se mantuvieron en condiciones estándar de luz y temperatura (22°C) y comida *ad libitum*.

Los comités institucionales de cuidado y uso de animales, de la Facultad de Química y del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, aprobaron los protocolos experimentales. Los animales fueron manipulados de acuerdo con la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y la guía oficial mexicana de la secretaría de agricultura (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) publicada en 2001. Se tomaron las medidas necesarias para minimizar el número de animales usados y su sufrimiento.

5.1.2 *Tratamientos*. La lactancia en la rata tiene una duración de tres semanas o 21 días. Hacia el final de la lactancia, entre los días 16 al 20 se presentan concentraciones de hormonas ováricas, estradiol (~10 pg/ml) y progesterona (<10 ng/ml), similares a las que se detectan en suero de animales hembras vírgenes en la etapa de metaestro del ciclo estral (~15 ng/ml y 15 pg/ml respectivamente), y niveles de corticoesterona en sangre significativamente mayores a los detectados en los animales vírgenes (>300ng/ml). Ratas hembras vírgenes y en lactancia, en metaestro y día 19 de la lactancia, fueron inyectadas vía intraperitoneal (i.p) con PBS (vehículo) o ácido kaínico (kainato) en dosis de 7.5 mg/kg disuelto en PBS.

5.1.3 Obtención de proteína. Las ratas hembras de la cepa Wistar de 10-12 semanas de edad y ratas primigestas en lactancia se sacrificaron por decapitación, el cerebro fue removido, se disecaron las regiones CA1, CA3 y el GD de la parte media del hipocampo en ambos hemisferios para la posterior extracción de proteína. El hipocampo fue homogenizado en sonicador con buffer de lisis para proteína y centrifugado a 4 grados centígrados. El sobrenadante se recuperó y almacenó a -80 grados centígrados. La proteína fue cuantificada por espectofotómetro mediante el reactivo de Bradford utilizando como referencia una curva de albúmina.

5.1.4 Procesamiento de tejido para histología. Los animales se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital y se perfundieron vía aorta ascendente con 250 ml de PBS seguido del mismo volumen de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer de fosfatos. Los cerebros se removieron y posfijaron 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 μ m de grosor en hipocampo medio en criostato. Los cortes fueron almacenados a -20°C en solución crioprotectora (0.05 M PBS, 40% etilenglicol, 20% sacarosa). Antes de cualquier procedimiento, los tejidos se lavaron 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) almacenándose en PBS a 4°C durante toda la noche a fin de eliminar los residuos de la solución crioprotectora.

5.1.5 Inmunohistoquímica. Las muestras fueron montadas y lavadas como ya se ha descrito. La peroxidasa endógena fue bloqueada con H₂O₂ al 1% en H₂O desionizada durante 30 minutos a t.a, posteriormente los tejidos fueron tratados con NaBH₄ 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. Los tejidos fueron incubados con anticuerpo primario en solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-pCREB (1:100, Sigma) y anti-ER- α (1:100, Sta Cruz) durante 24 h a 4°C y anti ER- β (1:50, Sta Cruz) durante 48 h a 4°C. El tejido fue lavado con PBS e incubado con el anticuerpo secundario biotilado correspondiente durante 1 h en PBS a temperatura ambiente. Posterior al enjuague con PBS las muestras se incubaron 30 min 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.

5.1.6 Inmunofluorescencia. Las muestras fueron tratadas con citrato de sodio 0.1% en H₂O durante 30 minutos a 4°C; posteriormente, se dio un tratamiento con Tritón X-100 al 3% en PBS durante 30 minutos y se preincubaron con solución de bloqueo en PBS por 30 minutos. La incubación con el anticuerpo de conejo anti-GluR1 y anti-GluR2 (1:100, Chemicon) se realizó solución de bloqueo durante toda la noche. Las muestras fueron lavadas en PBS e incubadas en oscuridad durante 3 h con el anticuerpo anti-conejo rodaminado (1:100, Chemicon), seguido de lavados con PBS y su posterior incubación en una solución de Hoechst 33258 (1µg/ml; Molecular Probes) en PBS durante 5 minutos a t.a. para ser cubiertos con medio de montaje DAKO y analizados en microscopio de fluorescencia.

5.1.7. Western blot. Se utilizaron 30 µg de proteína total y se separaron mediante SDS-PAGE en gradiente discontinuo de 8% a 12 %. La transferencia se realizó en membranas de PVF (Millipore). Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la detección de las subunidades de receptores AMPA y los ERs: GluR1 (1:1000, Millipore), GluR2 (1:2000, Millipore), GluR3 (1:500, Millipore), ER-α (1:400, Sta Cruz) y ER-β (1:500, Sta Cruz) en TBS o/n a 4°C y beta-actina (1:5000, Sta Cruz) en TBS-Tween 20 (0.1%) durante 30 minutos. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti conejo y anti-ratón (1:10,000). Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia en películas de rayos-X y la densidad óptica de las bandas obtenidas fue cuantificada para obtener la cantidad de proteína.

5.1.8 Análisis. Las placas fueron digitalizadas por medio de un escáner en resolución de 300 dpi y el uso de una máscara no lineal de enfoque. La normalización de los datos se realizó haciendo uso de la expresión de la proteína beta-actina como control interno de carga. La densitometría para Western blot se llevó a cabo mediante el programa KODAK 1D Analysis Software, el contraste y el brillo fueron optimizados en el mismo programa. El análisis estadístico se realizó a través de una prueba de ANOVA de una sola vía seguida de la prueba

de comparación múltiple Newman-Keuls. Las diferencias obtenidas con una $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas.

En el caso de inmunofluorescencia, las áreas hipocampales fueron delimitadas de acuerdo al atlas de Swanson (2003) considerando -2.2 -2.8 mm desde Bregma (Swanson, 2003). Las secciones de tejido correspondientes a estas coordenadas fueron incluidas en la cuantificación, asegurando que las regiones de interés fuesen equivalentes entre animales y experimentos. Para el análisis densitométrico se utilizó el software Image J y microfotografías tomadas con una magnificación 20X en 3 rebanadas de tejido por cada animal, se consideró la integración densitométrica en valores de grises. La expresión de las proteínas de interés fue expresada como el promedio de las unidades densitométricas arbitrarias \pm la correspondiente desviación estándar (SD). El análisis estadístico se realizó a través de una prueba de ANOVA de una sola vía seguida de la prueba de comparación múltiple Newman-Keuls. Las diferencias obtenidas con una $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas.

5.2 Metodología de experimentos in vitro

5.2.1 Cultivos Celulares. Se obtuvieron cerebros de fetos de ratas al día 17 de gestación, la región hipocampal y la corteza fueron disecadas. El hipocampo y la corteza cerebral se disociaron de manera independiente a través de digestión enzimática y procedimientos mecánicos posterior al retiro de meninges. Las células disociadas fueron resuspendidas a una densidad de 0.2×10^6 células/ml en BME suplementado con FCS al 10%, 50U/ml de penicilina/estreptomicina, 2mM de glutamina y 10 mM de glucosa, y distribuidas en placas tratadas previamente con poli-L-lisina 10 μ g/ml. Los cultivos fueron incubados a 37°C con 100% de humedad y una atmósfera de 95% aire/5% CO₂ durante 2 horas. El medio fue reemplazado por Neurobasal suplementado con B27 al 10%, 50U de penicilina/estreptomicina, 2 mM de glutamina y 10 mM de glucosa. El medio se reemplazó al 50% cada tercer día *in vitro* (DIV). Los experimentos se realizaron en cultivos neuronales maduros (11-13 DIV).

5.2.2. Tratamientos. En cultivos neuronales corticales e hipocampales (DIV 11) se indujo daño celular mediante la aplicación de glutamato (Sigma; 100 μ M) más glicina (Sigma; 10 μ M) o ácido kaínico (Sigma; 100 μ M) durante 24 h (tratamiento crónico). Los cultivos neuronales de hipocampo y corteza fueron tratados con los nonapéptidos, arginina vasopresina (Sigma; 50, 100, 500 y 1000 nM) y oxitocina (Sigma; 30, 100, 300 y 1000 nM) mediante la aplicación directa de las hormonas 24 h (tratamiento crónico) y 2 h (tratamiento agudo) antes de la administración ser expuestos a glutamato o kainato. Los reactivos, glutamato, kainato, glicina, arginina vasopresina y oxitocina fueron disueltos en PBS.

5.2.3 Viabilidad Celular. La viabilidad celular fue evaluada por ensayo de MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium]. A cultivos de neuronas hipocampales y cultivos de neuronas corticales en placas de 48 pozos se agregó MTT en concentración de 0.2 mg/ml e incubó durante 40 minutos a 37°C. El medio fue retirado y se añadió DMSO para solubilizar el formazán producto de la reacción. La mezcla de formazán-DMSO fue cuantificado en un lector de placas a 570 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de células viables (sobrevivencia).

5.2.4 Evaluación de muerte neuronal. La presencia de células necróticas en los cultivos, fue analizada mediante el colorante fluorescente ioduro de propidio (PI), un compuesto altamente polar capaz de incorporarse al DNA de las células cuando la membrana plasmática se encuentra dañada, característica típica de necrosis. El PI fue agregado al cultivo celular en concentración 10 μ M después del tratamiento con excitotóxicos, durante 16 h. El medio se retiro y las células fueron fijadas con PFA 4% en PBS frío durante 15 minutos. Después de 2 lavados con PBS frío, se realizó contra tinción con Hoechst 33258 en concentración 2 μ g/ml en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. La distinción entre células necróticas y apoptóticas se realizó por microscopía de fluorescencia atendiendo a los cambios morfológicos que caracterizan los núcleos de células en apoptosis, las células con cromatina condensada o fragmentada fueron considerados apoptóticas. Las células positivas a tinción con PI sin núcleo fragmentado o condensado fueron consideradas como necróticas. Los resultados fueron expresados como porcentaje.

5.2.5 Extracción de RNA y RT-PCR. Se utilizaron cultivos neuronales de hipocampo y corteza al DIV 8, 10 y 12. Las células fueron lisadas agregando directamente a cultivos en placas de 3.5 cm de diámetro 1 ml de TRIZOL® y pasando varias veces el lisado a través de la pipeta. El RNA obtenido se disolvió en H₂O-DEPC y almacenó a -80°C. La síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó utilizando 1µg de RNA y la transcriptasa reversa Superscript II de Invitrogen y oligo (dT). En la amplificación por PCR se utilizó la Taq polimerasa de DNA, recombinante, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las condiciones de amplificación de los receptores 1a y 1b para vasopresina (avpr1a y avpr1b) consistieron en 1 ciclo de 95°C 1 min; 35 ciclos de 95°C 30s, 60 C 1 min, 72°C 30s, seguido de 1 ciclo de 72°C 5 min. Para la amplificación del receptor a oxitocina (oxtr), se utilizó un ciclo de 95°C 1 min; 40 ciclos de 95°C 1min, 60°C 1 min, 72°C 1min y un ciclo de 72°C por 5 min. En el caso de la amplificación de 18S rRNA se utilizó un ciclo de 95°C 1 minuto; 25 ciclos de 95°C 1min, 60°C 1 min, 72°C 1min y un ciclo de 72°C por 5 min. El volumen final de cada reacción fue 50 µl con una concentración 1 µM de cada oligo y 2 unidades de Taq DNA polimerasa. Los oligos utilizados fueron: Avpr1a (200 pb, 5'ggctgcttgggtacatgct; 5'tcttcacagtgcggatcttg), Avpr1b (202 pb, 5'cgtggctaggtaggatgaa; 5'agctgaggcagctacctggaa), Oxtr (179 pb, 5'ttcttcgtgcagatgtggag; 5'taacgagcagagcagcagaa) y 18s rRna (469 pb, 5'tcaagaacgaaagtccggagg; 5'ggacatctaaggcatcaca). Los productos de PCR (25 µl) fueron resueltos en geles de agarosa al 2% y teñidos con SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen) en buffer TAE 1X.

5.2.6 Western blot. Los cultivos de neuronas corticales e hipocampales de DIV 8, 10 y 12 fueron homogeneizados en buffer de lisis compuesto por 20 mM Tris pH 7.5 1 M, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA e inhibidores de proteasas y fosfatasas. La cuantificación de la proteína obtenida se realizó mediante ensayo de Bradford, 30 µg de proteína de cada muestra fueron separados por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham Biosciences). Los blots se bloquero en leche libre de grasa al 5% en TBS 0.05% de Tween-20 durante 1 h a temperatura ambiente y fueron incubados a 4°C toda la noche en anticuerpo primario-TBS. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: poli clonal de conejo AVPR1a (LS-C40158, Lifespan Biosciences, 1 :1000), poli clonal de conejo AVPR1b (LS-C40157, Lifespan Biosciences, 1 :1000), poli

clonal de conejo OXTR (sc-33209, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), poli clonal de conejo fosfo-p42/ MAP cinasa (Thr202/Tyr204) (#9101, Cell Signalling Technology, 1:1000), poli clonal de conejo p42/44 MAP cinasa (#9102; Cell Signalling Technology; 1:1000), poli clonal de conejo phospho-CREB (Ser133) (#9191; Cell Signalling Technology; 1:1000), poli clonal de conejo CREB (#9192; Cell Signalling Technology; 1:1000) y monoclonal de ratón GAPDH (clona 6C5, 4300; Ambion Inc, 1: 40,000). Después de 3 lavados con TBS 0.05% Tween-20, las membranas fueron incubadas en anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano diluidos en TBS 0.05% Tween-20 y revelados con ECL™ Western Blotting detection Reagents (Amersham Biosciences).

5.2.7 Inmunocitofluorescencia. Los cultivos de neuronas hipocampales y corticales al DIV 8, 10 y 12 fueron fijados en 4% de PFA en PBS por 15 min a temperatura ambiente. Después de que las células se lavaron, se incubaron en PBS-glicina 0.1 M durante 10 min seguido de 3 lavados con TBS 0.01% de Tween-20 y permeabilizadas con TBS 0.01% tween-20 y 0,1% de Tritón X-100. Las células fueron bloqueadas a 4°C por 1h en TBS 0.01% de Tween-20 y 0.5% de suero normal de cabra (solución de bloqueo). El anticuerpo primario se incubó toda la noche en solución de bloqueo a 4°C, los anticuerpos primarios utilizados fueron: AVPR1a (LS-C40158, Lifespan Biosciences, 1:100), AVPR1b (LS-C40157, Lifespan Biosciences, 1:100), OXTR (sc-33209, Santa Cruz Biotechnology, 1:100) y phospho-CREB (Ser133) (#9191; Cell Signalling Technology; 1:1000). Después de 3 lavados con TBS 0.01% Tween-20, las células se incubaron en anticuerpo secundario rodaminado (1:500) en solución de bloqueo y contrateñidas con Hoechst 33258 (2 µg/ml) en TBS 0.01% Tween-20 durante 5 minutos a temperatura ambiente.

5.2.8 Análisis Estadístico. El promedio±el error estándar (SE) de los valores obtenidos para viabilidad celular, obtenidos por ensayo de MTT en cada tratamiento, fueron comparados mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple Newman-Keuls. Las diferencias obtenidas con una $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas.

6. Resultados

6.1 Expresión de las subunidades de los receptores AMPA

La expresión relativa de las diferentes subunidades que conforman los receptores de glutamato tipo AMPA, fue estudiada mediante la técnica de Western blot en el hipocampo de ratas vírgenes y ratas en la última etapa de la lactancia.

Se ha reportado que la subunidad GluR1 forma parte de receptores de glutamato tipo AMPA con alta permeabilidad a calcio, por lo que la expresión de esta subunidad ha sido relacionada a la muerte neuronal por estímulos excitotóxicos. En este estudio se observó que la subunidad GluR1 presenta una mayor expresión en el hipocampo de ratas lactantes con respecto a la cuantificada en la misma estructura cerebral de ratas vírgenes.

En el hipocampo de animales lactantes, las regiones donde se expresa con mayor abundancia la subunidad GluR1 son el CA1 y el GD, mientras que la región CA3 presenta una menor expresión de la misma. Aparentemente, el tratamiento con kainato no modifica esta diferencia de expresión de GluR1 por regiones, ya que la región CA3 presenta una menor expresión después del tratamiento en comparación con las regiones CA1 y el GD. Sin embargo, sí se observó una disminución considerable de la expresión de esta proteína en las regiones CA1 y en el GD 24 h después del tratamiento en comparación con el vehículo (fig. 1).

Con respecto a la expresión de la subunidad GluR1 en ratas vírgenes, se pudo observar que los animales que recibieron tratamiento con vehículo presentan una menor expresión de la proteína en la región CA3 con respecto a la detectada en GD y que es ésta última área en la que la expresión de GluR1 es más abundante. El tratamiento con kainato modifica de manera significativa la expresión de la subunidad GluR1, incrementando los niveles detectados especialmente en la región CA1 y en el GD (fig. 1).

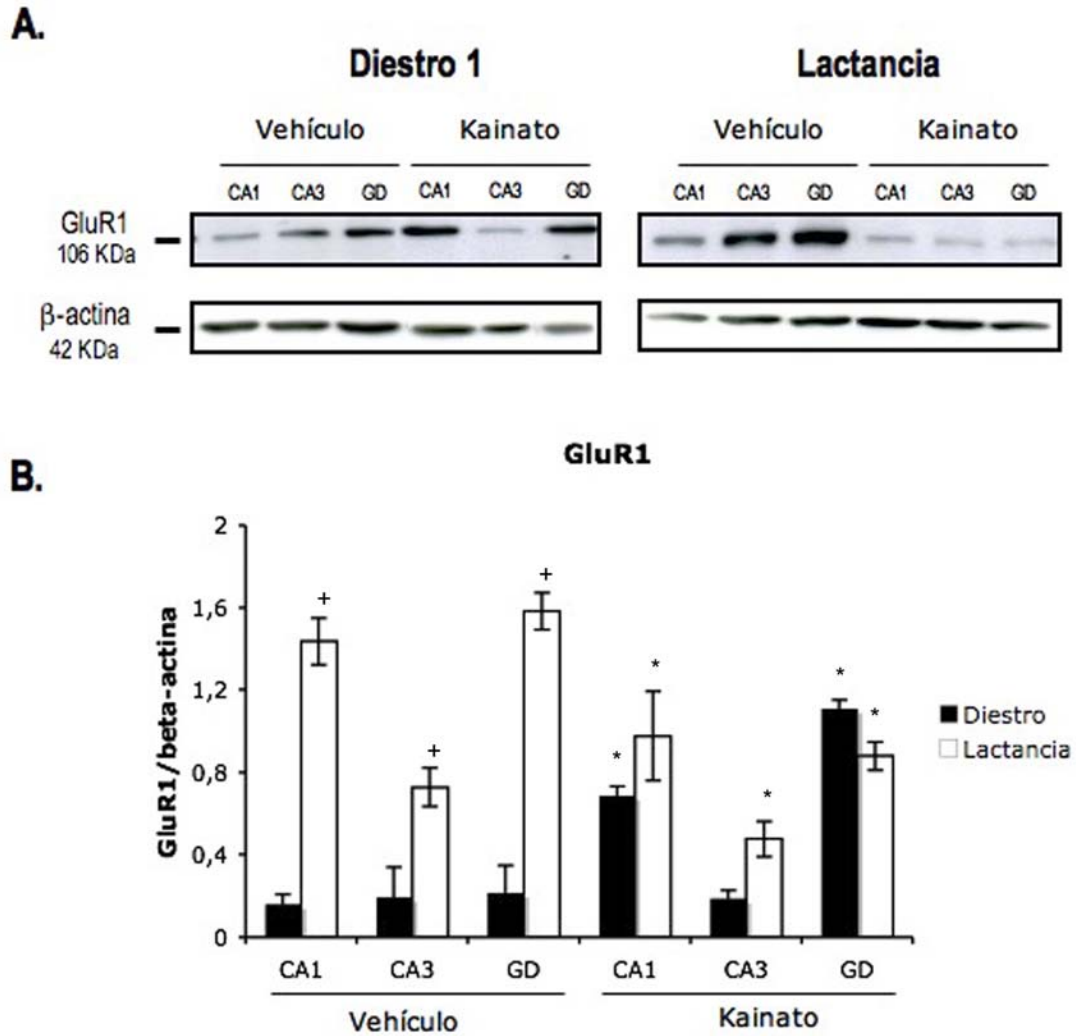


Figura 1. La Expresión de GluR1 disminuye en el hipocampo de animales lactantes. (A) Western blot representativo de cinco experimentos independientes, se muestra la expresión de GluR1 y beta-actina en hipocampo de ratas vírgenes y ratas en lactancia: tratadas con vehículo o kainato 7.5 mg/kg. (B) El análisis densitométrico de la expresión de GluR1 en el hipocampo de ratas lactantes y diestro indica una mayor expresión de esta subunidad en el hipocampo de ratas en lactancia, principalmente en las regiones CA1 y GD en comparación con las ratas en diestro 1, así mismo se observa una menor expresión de la subunidad en la región CA3 en ambas condiciones. La expresión de GluR1 en el hipocampo de animales en lactancia muestra una disminución después del tratamiento con kainato en comparación con los niveles de expresión en condiciones basales y tratamiento con vehículo. En el hipocampo de animales vírgenes, el tratamiento con kainato modifica el patrón de expresión, aumentándola en las regiones CA1 y en el GD. +Diestro-1 vs lactantes ; *vehículo vs kainato ($p < 0.05$).

Las diferencias en los niveles de la proteína GluR1, detectados por western blot, fueron corroborados mediante el uso de inmunofluorescencia, asimismo esta técnica fue empleada para detectar el patrón de expresión de la subunidad a nivel subcelular. En general se observa a la subunidad GluR1 de los receptores AMPA, localizada en la membrana de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 y en neuronas granulares e hilares en el giro dentado del hipocampo de animales en diestro 1 y animales en lactancia, los tratamientos no afectan la localización subcelular de la subunidad GluR1 (fig. 2).

La cuantificación de la intensidad del inmunomarcaje, corroboró los datos obtenidos por western blot, ya que se detectó una mayor intensidad de fluorescencia en los hipocampos de animales lactantes en comparación con la detectada en animales vírgenes. Los datos obtenidos de tejidos de animales que recibieron tratamiento con kainato muestran una disminución significativa de la expresión de GluR1 en las tres áreas del hipocampo de ratas lactantes, mientras que para animales vírgenes los niveles de expresión de la proteína tienden al incremento, particularmente en las regiones CA1 y el GD (fig. 5A).

La expresión de la subunidad, GluR2 que confiere impermeabilidad a calcio en los receptores AMPA, fue medida mediante western blot e inmunofluorescencia, de igual modo, se detectó su localización subcelular mediante esta técnica. Los niveles de expresión relativa observados por western blot para esta subunidad, en hipocampo de ratas lactantes y diestro-1, 24 horas después del tratamiento con vehículo o kainato presentan diferencias importantes. Los animales vírgenes tratados con vehículo muestran una mayor expresión de GluR2 en la región CA3 cuando la proteína es detectada por medio de western blot, estos niveles de expresión son significativamente mayores con respecto a las áreas del CA1 y el GD del hipocampo de animales vírgenes así como con respecto a la expresión detectada en la misma área en animales lactantes. El cambio más importante se observa 24 h después del tratamiento con el cual parece inducir una drástica regulación negativa de la subunidad GluR2 en las tres áreas del hipocampo de las ratas en lactancia. En el hipocampo de ratas vírgenes solo se observan una disminución significativa de la expresión de GluR2 en el área CA3 después del tratamiento con kainato, no así en la región del CA1 ni en el GD (fig. 3).

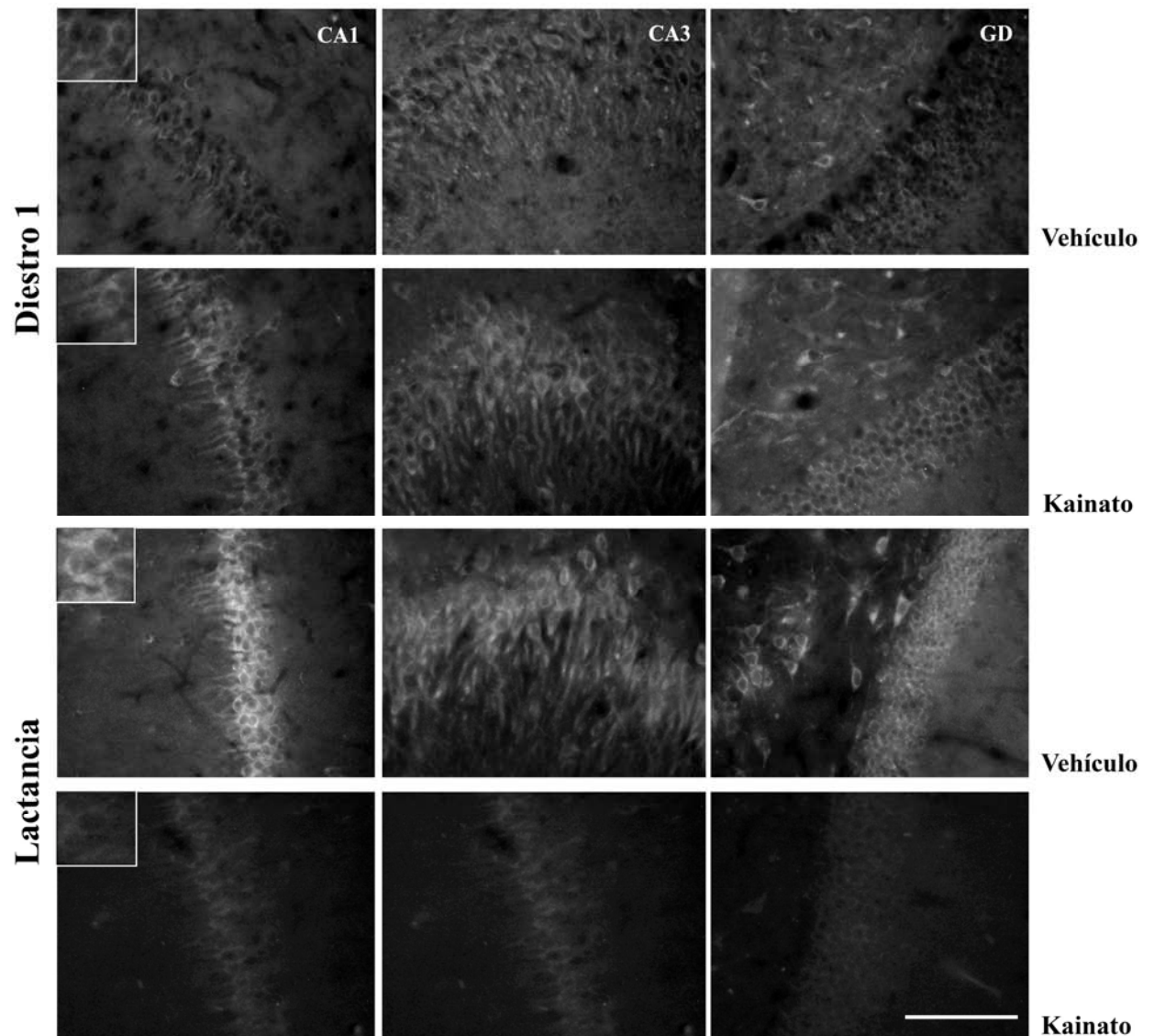


Figura 2. La subunidad GluR1 no cambia su localización con la administración de kainato. A. Mediante inmunofluorescencia la subunidad GluR1 fue visualizada en tejidos de hipocampo de ratas en diestro y lactancia. Se muestran las regiones hipocámpales CA1, CA3 y el GD de ratas en diestro 1 y lactancia 24h después de la administración sistémica de vehículo o kainato. La subunidad GluR1 se localiza principalmente en la membrana de neuronas piramidales, granulares e hilares, los tratamientos no modifican su localización. En la esquina superior izquierda de las microfotografías correspondientes a CA1, se muestra un acercamiento de las células piramidales. Escala=100 μ m.

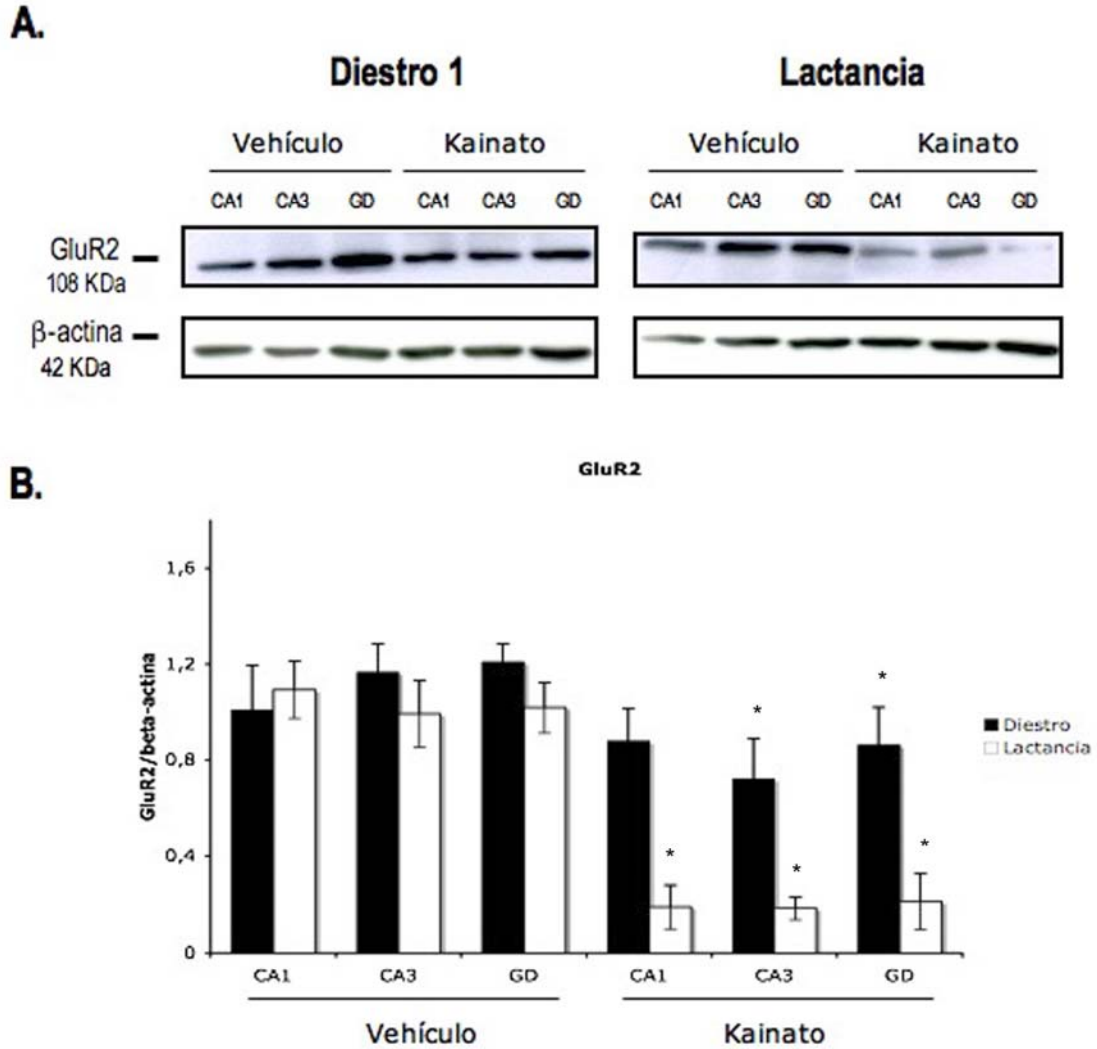


Figura 3. La expresión de GluR2 disminuye en el hipocampo después del tratamiento con kainato. (A) Western blot representativo de cinco experimentos independientes. El análisis densitométrico de la expresión de GluR2 en el hipocampo de ratas lactantes y diestro indica mayores niveles de expresión similares en condiciones basales que se mantienen con el tratamiento con vehículo. (B) El tratamiento con kainato disminuye significativamente los niveles de expresión de GluR2 en las regiones CA3 y el GD, así como en las tres regiones del hipocampo de ratas en lactancia. *Vehículo vs kainato ($p < 0.05$).

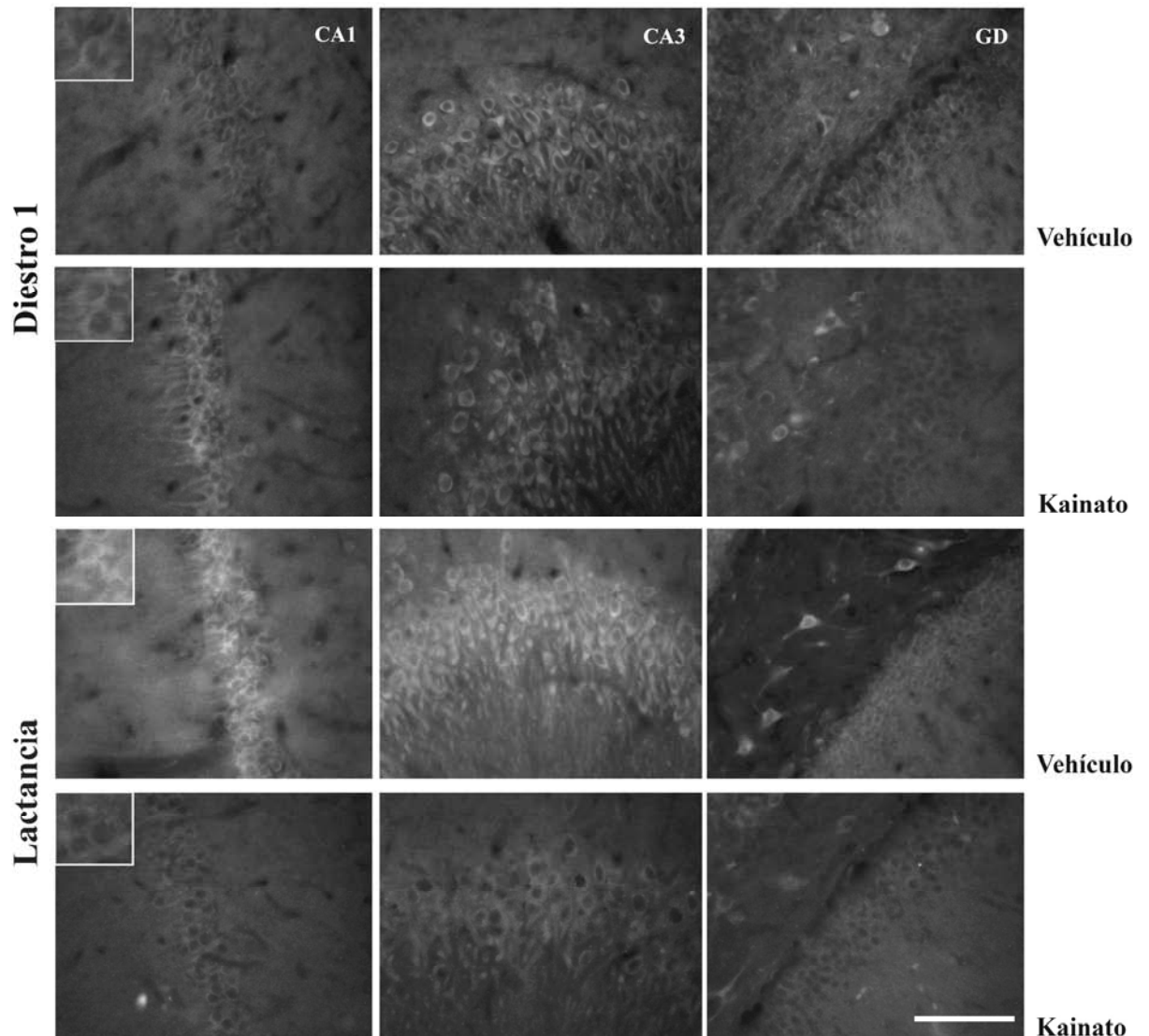
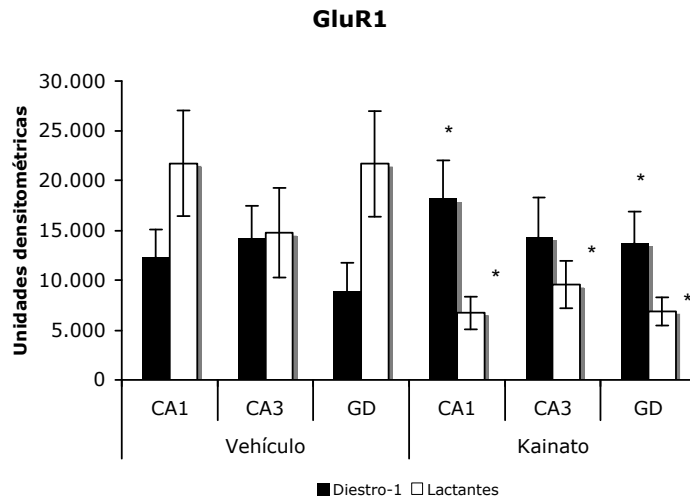


Figura 4. El kainato no modifica la localización subcelular de la subunidad GluR2. Mediante inmunofluorescencia la subunidad GluR2 fue visualizada en tejidos de hipocampo de ratas en diestro y lactancia. Se muestran las regiones hipocámpales CA1, CA3 y el GD de ratas en diestro 1 y lactancia después de la administración sistémica de vehículo o kainato. La subunidad GluR2 se localiza principalmente en la membrana de neuronas piramidales, granulares e hilares, los tratamientos no modifican su localización. En la esquina superior izquierda de las microfotografías correspondientes a CA1, se muestra un acercamiento de las células piramidales. Escala=100 μ m.

La localización subcelular de la subunidad GluR2 detectada por inmunofluorescencia es principalmente membranal y se observa en las células de los estratos neuronales principales del hipocampo, es decir en neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 y en las neuronas granulares e hilares de la región del giro dentado. La ubicación membranal de la subunidad GluR2 no varía en los tejidos de animales en diestro 1 con los tratamientos con vehículo o kainato (fig. 4).

En cuanto a la inmunolocalización de la subunidad GluR2 en tejidos de animales durante la lactancia, se aprecia su presencia en la membrana, misma que se ve drásticamente disminuida después de 24 h de haberse administrado kainato vía sistémica (figura 4). La cuantificación del inmunomarcaje corrobora la disminución en la expresión de GluR2 en el hipocampo de animales lactantes tratados con kainato en comparación con la expresión de la proteína en el hipocampo de animales lactantes tratados con vehículo y animales vírgenes administrados con vehículo o kainato (fig. 5B).

A.



B.

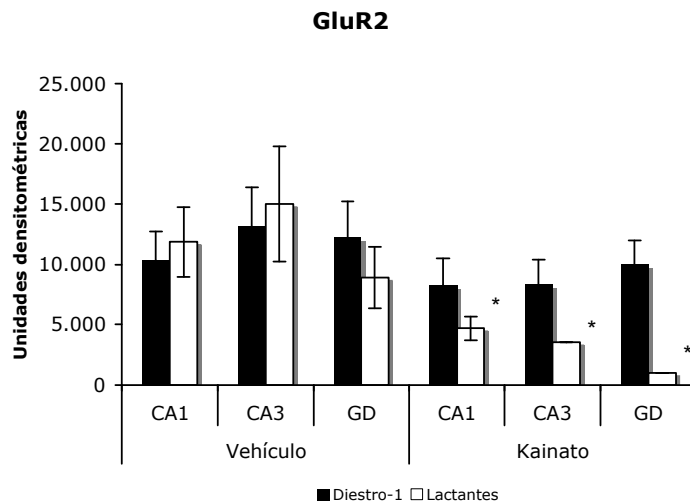


Figura 5. Análisis de la expresión de GluR1 y GluR2 por inmunofluorescencia. A. Análisis cuantitativo de la expresión de GluR1 en las diferentes áreas del hipocampo de animales vírgenes y lactantes después del tratamiento con kainato. En el hipocampo de animales vírgenes hay un incremento significativo en las regiones CA1 y el GD, mientras que en el hipocampo de animales lactantes el tratamiento con kainato reduce la expresión de esta subunidad en CA1, CA3 y el GD. Análisis cuantitativo de la expresión de GluR2 en las diferentes regiones del hipocampo de animales vírgenes y lactantes después del tratamiento con kainato. En animales lactantes tratados con kainato se observa una reducción significativa de la expresión de la proteína en las tres regiones hipocampales, CA1, CA3 y el GD en comparación con la registrada en animales no tratados. *Vehículo vs kainato, ($p < 0.05$).

6.2 Análisis de la expresión de receptores de estrógenos

6.2.1 Receptor de estrógenos alfa

El nivel de expresión de ER- en extractos totales de proteína de las regiones CA1, CA3 y GD del hipocampo dorsal, fue analizado mediante la técnica de western blot (fig. 6A). Los resultados mostraron que durante los animales vírgenes presentan una mayor expresión de este receptor en el área CA1 del hipocampo, en comparación con la observada las regiones CA3 y el GD. Veinticuatro horas después del tratamiento con kainato, la expresión del ER- no presentó modificaciones significativas (fig. 6B).

Los animales lactantes muestran una expresión del ER- similar a la detectada en las áreas CA3 y el GD del hipocampo de ratas en metaestro, mientras que la región CA1 presenta una menor expresión de este receptor (fig. 6A). El tratamiento kainato no afecta de manera significativa la expresión de este receptor (fig. 6B).

Para evaluar la distribución del receptor de estrógenos alfa en el hipocampo, se realizó una inmunohistoquímica. El ER- fue detectado en el núcleo de neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 y en las neuronas granulares y del hilus en el GD, del hipocampo de animales vírgenes y de animales durante la lactancia (fig. 7 a-d; i-l) administrados con vehículo.

En los animales vírgenes también se observó inmunoreactividad para ER- en las proyecciones axonales de neuronas hilares y piramidales (fig. 7a-d). El tratamiento con kainato restringe la localización del ER- al núcleo de la célula (fig. 7e-h). En el hipocampo de animales lactantes tratados con kainato vía sistémica, el patrón de expresión de ER- es preferentemente nuclear (fig. 7 m-p).

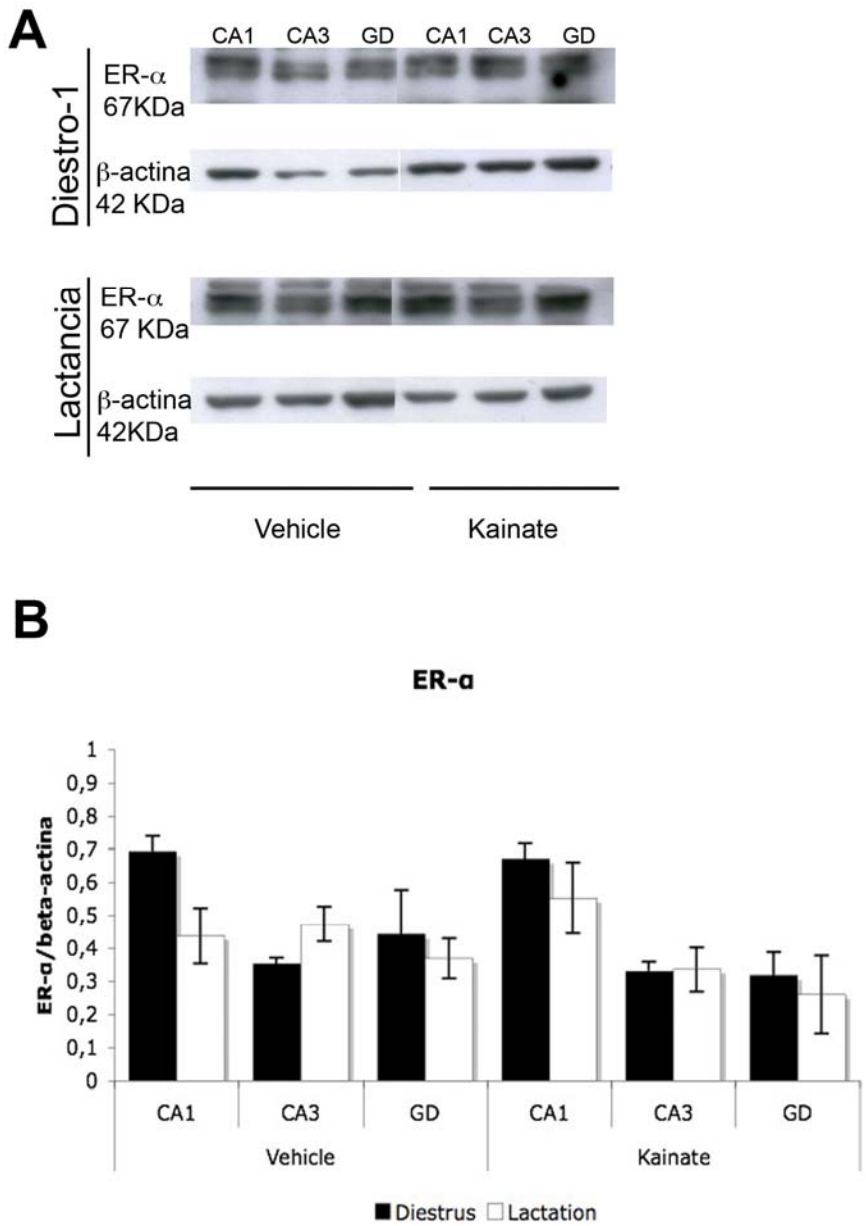


Figura 6. Expresión del ER- α en el hipocampo. A) La expresión del ER- α fue medida por Western blot, en las regiones CA1, CA3 y el GD del hipocampo, en ratas vírgenes y lactantes 24 h después de la administración sistémica de vehículo o kainato. Se muestra un blot representativo de cinco experimentos independientes. B) Análisis densitométrico del Western blot. Los datos representan la media \pm SD de cinco animales diferentes por tratamiento. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ER- α después del tratamiento con kainato en animales vírgenes ni en animales lactantes.

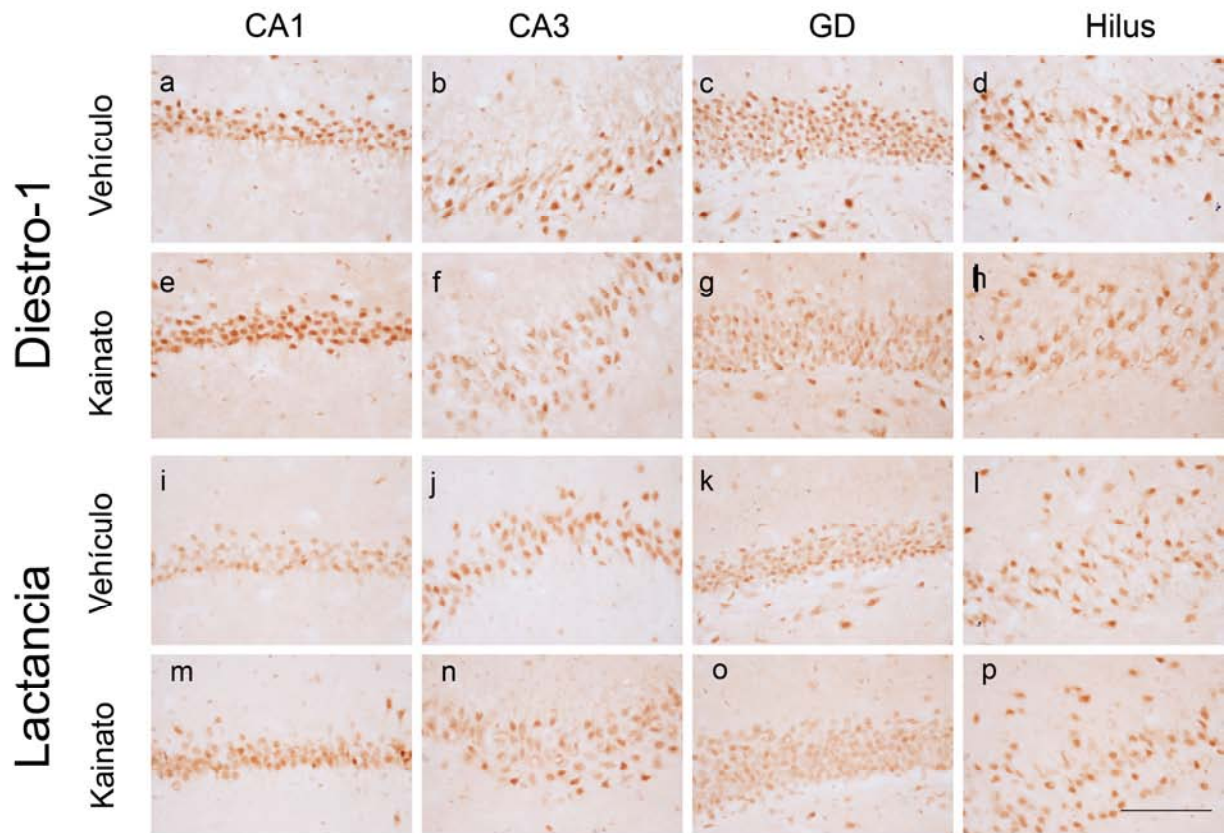


Figura 7. Localización celular de ER- α . La proteína ER- α fue detectada *in situ* mediante inmunohistoquímica en el hipocampo dorsal de ratas vírgenes (a-h) y lactantes (i-p), después de la administración de vehículo (a-d; i-l) o kainato (e-h; m-p), en células piramidales de los estratos CA1 (a, e, i y m) y CA3 (b,f, j y n) y células granulares del GD (c, g, k y o) y en la región del hilus (d, h, l y p). ER- α se encuentra preferencialmente localizado en el núcleo de las neuronas y el tratamiento con kainato no afectó su distribución a nivel celular. Escala = 100 μ m.

6.2.2 Receptor de estrógenos beta

La expresión del receptor de estrógenos beta fue evaluada, en proteína total de extractos de las diferentes regiones del hipocampo dorsal de animales en el ciclo estral y lactancia, mediante la técnica de western blot (fig. 8A). Los animales vírgenes mostraron bajos niveles de expresión del ER- en la región hipocampal CA1, CA3 y el GD. El tratamiento sistémico con ácido kaínico durante el diestro-1 indujo una disminución en la expresión de ER- , visible 24 horas después de su administración en la región CA1, mientras que el área del GD mostró un incremento en la expresión de este receptor (fig. 8B). En animales lactantes la proteína del receptor de estrógenos beta en el hipocampo mostró niveles similares en las regiones CA1, CA3 y el GD a los registrados durante el metaestro. El tratamiento con kainato incremento de manera significativa los niveles de ER- en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, no así en el GD (fig. 8B).

La localización del receptor de estrógenos beta, en el hipocampo dorsal de animales vírgenes y lactantes, fue visualizada mediante inmunohistoquímica. El hipocampo de ratas vírgenes, mostró una marcada localización perinuclear de la proteína ER- en las células del estrato piramidal de las regiones CA1 y CA3. Adicionalmente se observó inmunoreactividad positiva en estratos de interneuronas. En el área del giro dentado, la expresión de ER- mostró localización perinuclear tanto en neuronas del hilus como en neuronas granulares (fig. 8 a-d). El tratamiento con kainato no afectó la distribución del ER- (fig. 8e-h).

El hipocampo de ratas lactantes presenta una distribución perinuclear en neuronas piramidales y granulares e hilares de las regiones CA1 y CA3 y el giro dentado respectivamente (fig. 9i-l; 10A). La inmunoreactividad fue positiva en las proyecciones axonales de los estratos principales del hipocampo y en estratos de interneuronas. La administración de kainato cambia drásticamente la distribución de ER- en las regiones hipocampales (10 A). Cerca del 30% de las neuronas del estrato principal de las diferentes regiones hipocampales, mostró localización citoplasmática de ER- antes del tratamiento con kainato (10 B). Después de 24 hrs de la administración sistémica de ácido kaínico se observó una redistribución celular del ER- en los principales estratos neuronales del hipocampo, en

un patrón nuclear y citoplasmático en cerca del 75% de las neuronas piramidales, granulares e hilares (fig. 9m-p; 10).

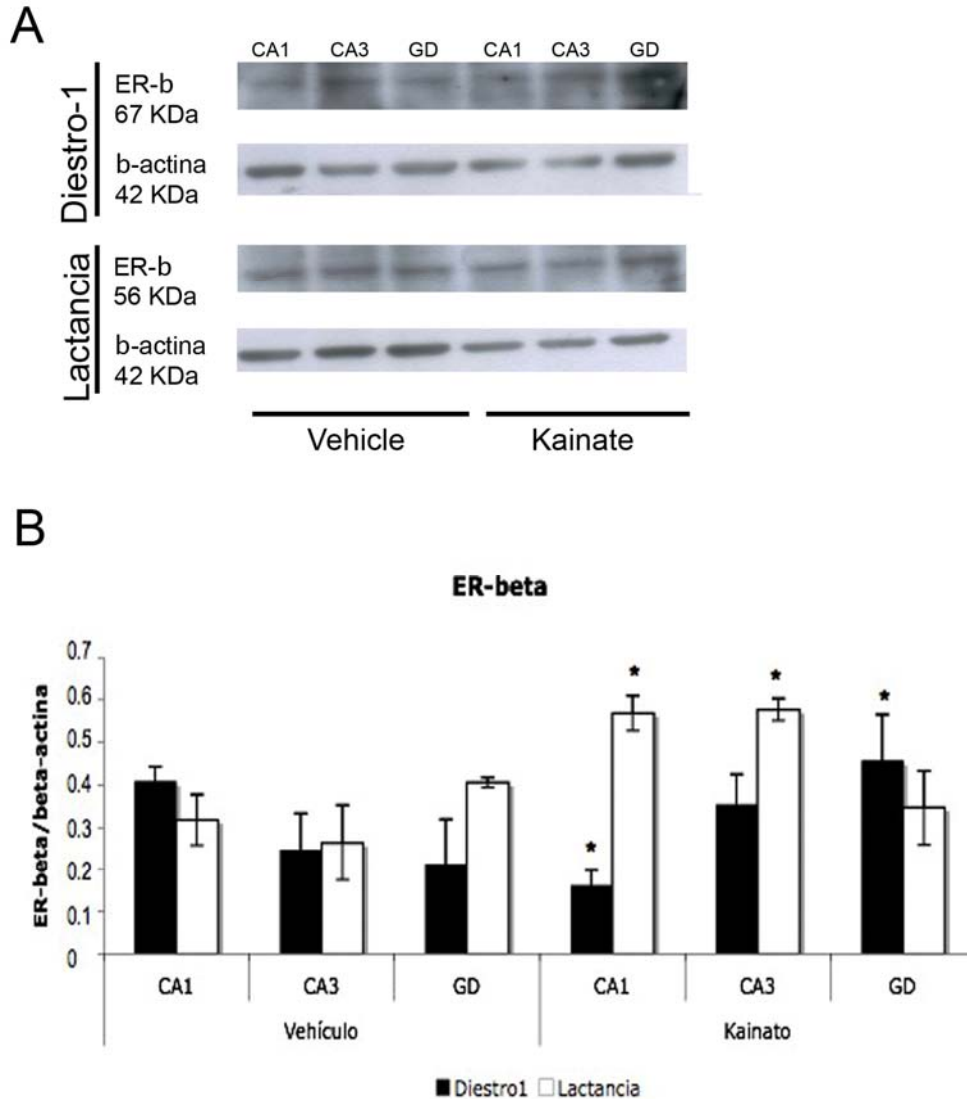


Figura 8. Expresión del ER- en el hipocampo. A) La expresión del ER- fue analizada mediante Western blot en las regiones en las regiones CA1, CA3 y el GD del hipocampo, en ratas vírgenes y lactantes 24 h después de la administración sistémica de vehículo o kainato. Se muestra un blot representativo de cinco experimentos independientes. B) Análisis densitométrico del Western blot. Los datos representan la media \pm SD de cinco animales por tratamiento. En el hipocampo de animales vírgenes, después del tratamiento con kainato, la expresión de ER- disminuyó significativamente en la región CA1 e incrementó en la región del GD. En animales lactantes el mismo tratamiento aumentó la expresión de ER- en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Vehículo vs kainato $*p < 0.05$.

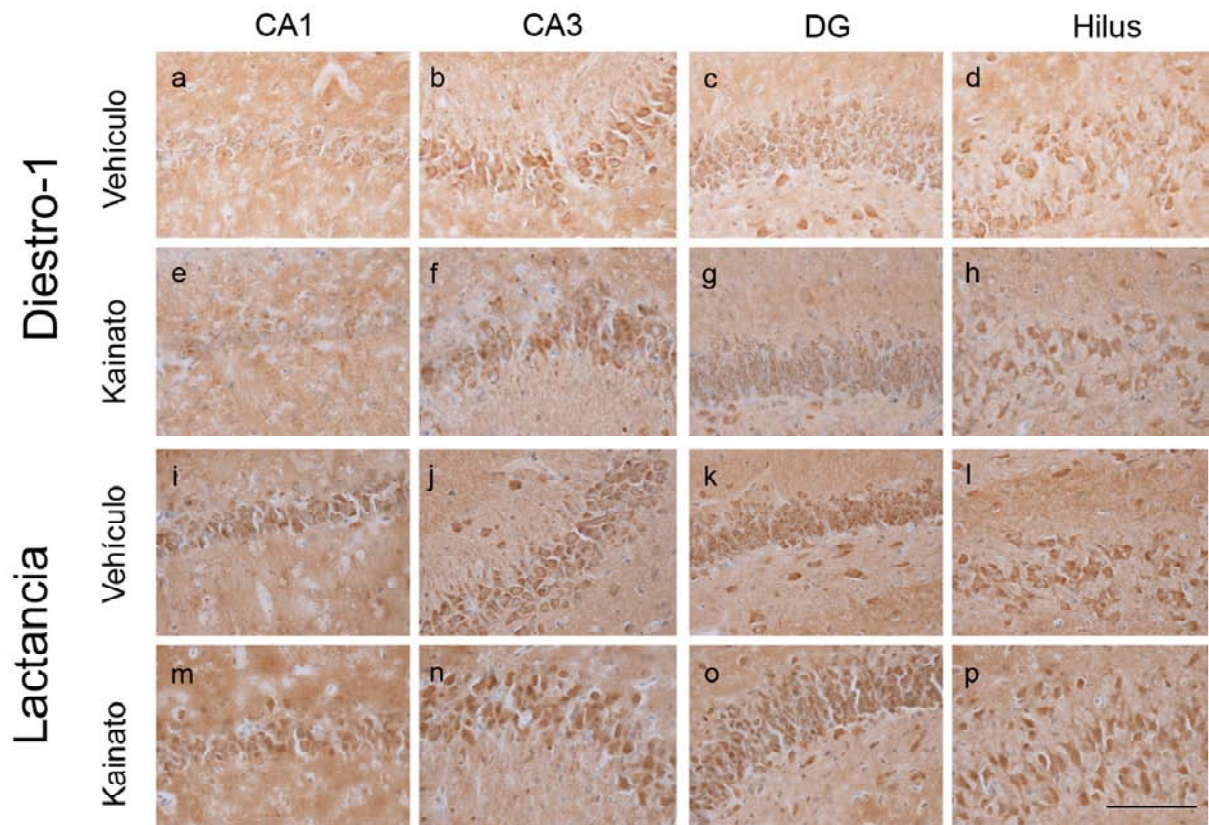


Figura 9. Localización subcelular de ER- en el hipocampo. La proteína ER- fue detectada *in situ* mediante inmunohistoquímica en el hipocampo dorsal de ratas vírgenes (a-h) y lactantes (i-p), después de la administración de vehículo (a-d; i-l) o kainato (e-h; m-p), en células piramidales de los estratos CA1 (a, e, i y m) y CA3 (b,f, j y n) y células granulares del GD (c, g, k y o) y la región del hilus (d, h, l y p). El ER- mostró un patrón de distribución perinuclear en ratas vírgenes, mientras que en ratas lactantes, la inmunoreactividad de ER- fue detectada en la región perinuclear y en las proyecciones axonales de neuronas piramidales y granulares. Así mismo, ER- se localizó en estratos interneuronales. El patrón de localización de ER- en ratas vírgenes no se afectó con la administración de kainato. En el hipocampo de las ratas lactantes, se observó una relocalización de ER-, de un patrón perinuclear, a su expresión tanto en citoplasma como en núcleo, después de la administración de kainato. Escala =100 μ m.

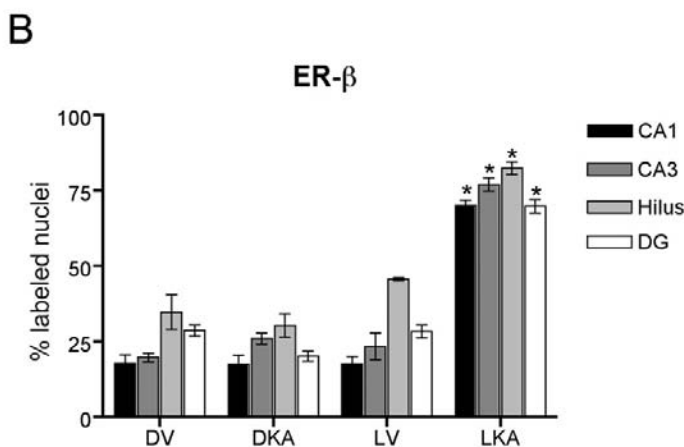
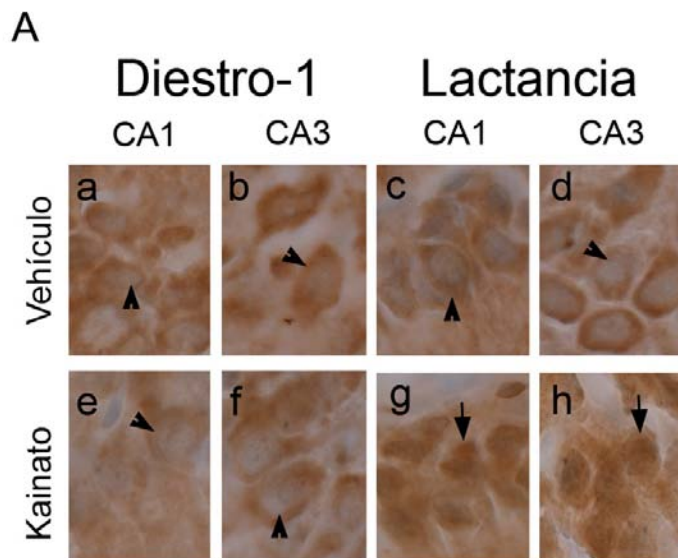


Figura 10. Relocalización celular del ER-β en neuronas hipocampales. **A)** El hipocampo de ratas en metaestro mostraron una localización de ER-β, preferencialmente citoplasmática en las principales regiones hipocampales (a, b), y el tratamiento con kainato no afectó la distribución de la proteína (e, f). El hipocampo de las ratas lactantes mostró una distribución citoplasmática en el soma de neuronas piramidales, granulares e hilares de las regiones CA1, CA3 y el GD (c, d). De manera interesante, la detección de ER-β en el núcleo de las neuronas hipocampales incrementó 24 h después de la administración de ácido kaínico (g, h). **B)** Porcentaje de neuronas positivas a inmunoreactividad para ER-β en CA1, CA3 y el GD de ratas en diestro-1 (D) y ratas lactantes (L) administradas con vehículo (V) o kainato (KA). Tratamiento con vehículo (V) vs. Tratamiento con kainato * $p < 0.001$. Las cabezas de flecha indican células con tinción citoplasmática; las flechas indican tinción nuclear

6.3 Efecto de Oxitocina y Vasopresina

La expresión de los receptores para vasopresina (AVPR1a y AVPR1b) y para oxitocina (OXTR), fue evaluada en cultivos de neuronas de hipocampo y neuronas de corteza a los DIV 8, 10 y 12 mediante RT-PCR y western blot. La presencia de mRNA para los tres receptores, así como la expresión de la proteína fue confirmada en los DIV 8, 10 y 12 (fig.11). El mRNA para el receptor AVPR1a mostró mayores niveles en cultivos de neuronas hipocámpales en los DIV 8, 10 y 12, mientras que el mRNA para OXTR presenta un incremento en los DIV 10 y 12 tanto en neuronas hipocámpales como corticales. El mRNA para AVPR1b mantiene una expresión estable durante los DIV 8, 10 y 12 (fig. 11A).

Mediante western blot se detectó la expresión de las proteínas correspondientes a AVPR1a, AVPR1b y OXTR en los DIV 8, 10 y 12. En cultivos de neuronas corticales e hipocámpales, AVPR1a muestra una expresión constante durante los tiempos muestreados, asimismo, se detectaron niveles constantes de la proteína OXTR durante los DIV 8, 10 y 12. Por el contrario, AVPR1b mantiene una mayor expresión en los DIV 8, 10 y 12 en cultivos de neuronas hipocámpales en comparación con los niveles de expresión detectados en cultivos de neuronas corticales durante los mismos días (fig. 11B).

La localización subcelular de los receptores a vasopresina y oxitocina fue analizada por inmunofluorescencia en cultivos de neuronas hipocámpales y corticales en los DIV 8, 10 y 12 (figs. 12 y 13). En neuronas corticales el AVPR1a se localiza en el soma y proyecciones neuronales al DIV 8, esta misma expresión se mantiene hasta el DIV 12.

La proteína correspondiente al AVPR1b se expresa principalmente en las proyecciones neuronales, aunque su expresión es también visible en el soma de algunas neuronas, la localización de esta proteína no varía desde el DIV 8 hasta el DIV 12. El receptor a oxitocina se presenta en un patrón principalmente perinuclear-somático, su expresión también es visible en las proyecciones neuronales (fig. 12).

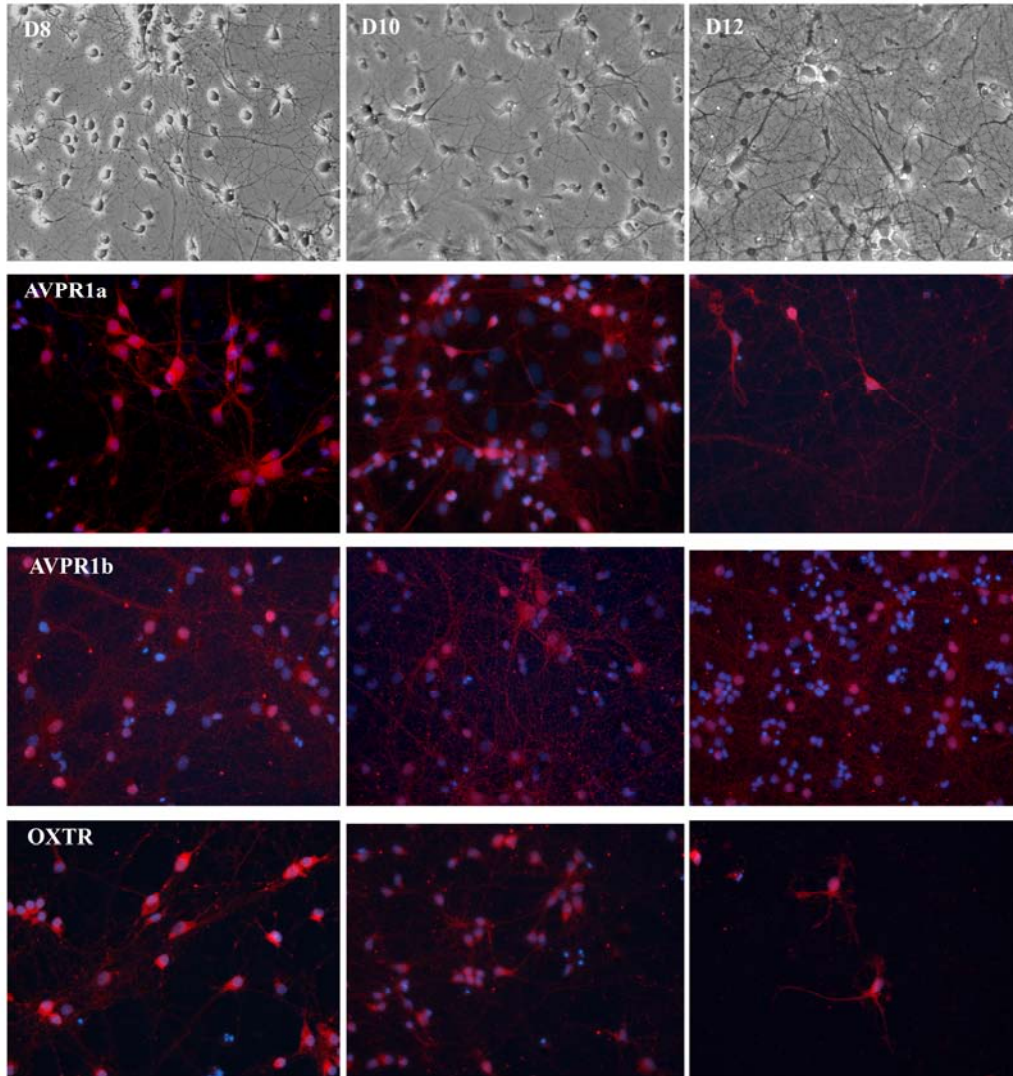


Figura 11. Localización de AVPRs y OXTR en cultivos de neuronas corticales. La expresión de AVPR1a y AVPR1b fue analizada en cultivos primarios de neuronas corticales mediante inmunofluorescencia. La presencia de AVPR1a se observa principalmente en el soma y en las proyecciones neuronales. AVPR1b se localiza preferencialmente en las proyecciones neuronales, axones y dendritas. OXTR muestra un patrón citoplasmático con mayor inmunomarcaje en la zona perinuclear. D 8-12 (días 8-12); en azul tinción de núcleos con Hoeschst ; en rojo inmunomarcaje para AVPR 1a y 1b y OXTR. Escala = 100 μ m.

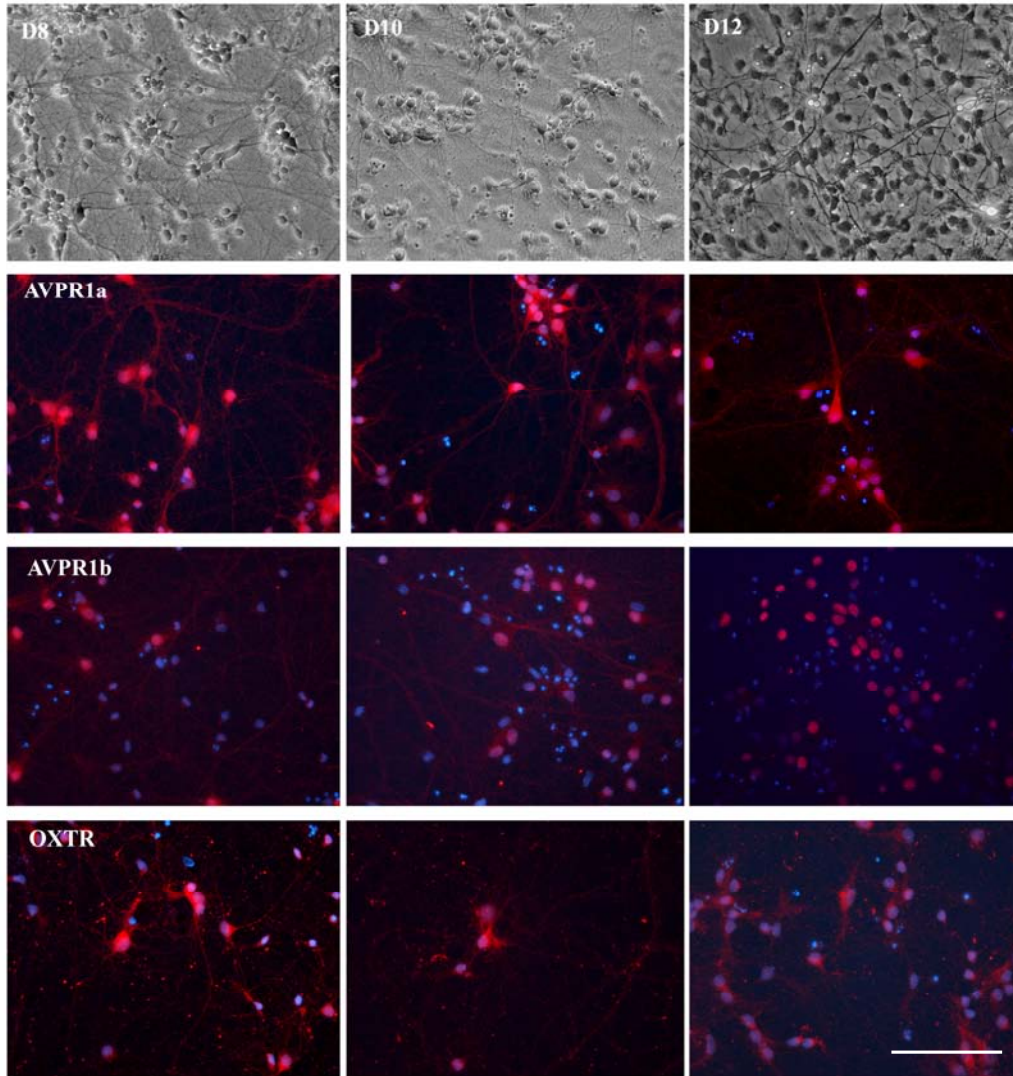


Figura 12. Localización de AVPRs y OXTR en cultivos de neuronas hipocampales. La expresión de AVPR1a y AVPR1b fue analizada en cultivos primarios de neuronas hipocampales mediante inmunofluorescencia. La presencia de AVPR1a se observa principalmente en el soma y en las proyecciones neuronales. AVPR1b se localiza preferencialmente en las proyecciones neuronales, axones y dendritas del DIV 8 al DIV 10, su localización se restringe al núcleo celular hacia el DIV 12. OXTR muestra un patrón citoplasmático con mayor inmunomarcaje en la zona perinuclear. D 8-12 (días 8-12); en azul tinción de núcleos con Hoeschst ; en rojo inmunomarcaje para AVPR 1a y 1b y OXTR. Escala = 100 μ m.

En neuronas hipocampales, la expresión de AVPR1a se observa de manera muy intensa en el soma y núcleo de las células, las proyecciones neuronales, axones y dendritas, también presentan inmuno-marcaje, mismo que se mantiene del DIV 8 al 12 (fig 13). La proteína AVPR1b, en neurona de hipocampo, durante los DIV 8 y 10 se localiza principalmente en las proyecciones celulares, su expresión también se advierte en los núcleos de las neuronas, de manera interesante, hacia el DIV 12, la localización de esta proteína se restringe al núcleo celular. La expresión del OXTR se observó tanto en el soma como en las proyecciones de las neuronas hipocampales, su localización se mantuvo sin cambios aparentes del DIV 8 al DIV 12 (fig. 13).

En cultivos neuronales corticales e hipocampales (DIV 11) se indujo daño celular mediante la aplicación de glutamato o ácido kaínico durante 24 h. Los cultivos neuronales de hipocampo y corteza fueron tratados con los nonapéptidos, arginina vasopresina (25, 50, 100, 250, 500 y 1000 nM) y oxitocina (15, 30, 50, 100, 150, 300, 500 y 1000 nM) mediante la aplicación directa de las hormonas 24 h (tratamiento crónico) y 2 h (tratamiento agudo) antes de la administración de glutamato o kainato. La viabilidad celular fue evaluada por ensayo de MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium]. El tratamiento con AVP, tanto agudo como crónico, no mostró efectos sobre la viabilidad celular. Las concentraciones de AVP utilizadas en el tratamiento de los cultivos primarios de neuronas corticales no afectó la muerte celular producida por el tratamiento crónico con glutamato o kainato (fig .14A). En el caso de los tratamientos con AVP de cultivos primarios de neuronas hipocampales, se observó una disminución significativa de la muerte celular cuando la hormona es administrada en dosis menores a 100nM tanto 2h como 24h antes de la aplicación de glutamato (fig. 14B). Asimismo, se observó una disminución significativa de la muerte celular inducida por kainato en los tratamientos crónicos con AVP, efecto no observable cuando el pretratamiento es agudo (fig 14B).

Cultivos primarios de neuronas hipocampales y corticales fueron tratados con OXT en forma crónica y aguda, previo a la inducción de muerte celular por glutamato o kainato. El tratamiento crónico con OXT concentraciones menores a 100nM en neuronas corticales

reduce la muerte celular inducida por glutamato en alrededor de un 10-20%, efecto no observado con un tratamiento agudo con la hormona (fig. 15A).

En cultivos de neuronas hipocampales, el pre-tratamiento agudo con OXT presenta un marcado efecto en la disminución de la muerte neuronal inducida por glutamato, este efecto es mayor cuando se utilizan dosis menores a 100nM de OXT (fig. 15B). Los tratamientos crónicos con OXT en cultivos de neuronas hipocampales no mostraron un efecto significativo en la disminución de la muerte celular inducida por glutamato o kainato (fig. 15B)

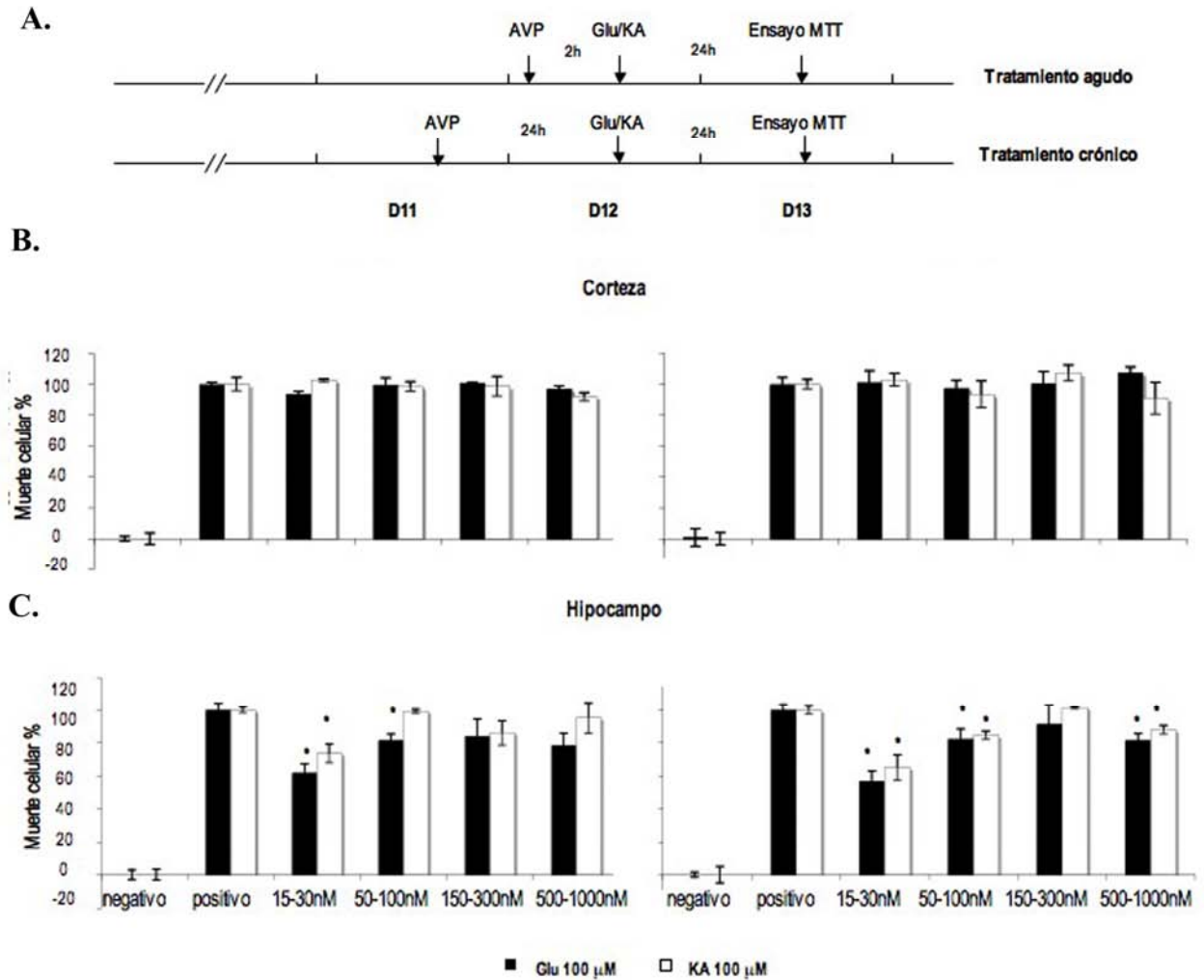


Figura 14. La AVP incrementa la viabilidad de neuronas hipocampales. (A) Cultivos de neuronas corticales e hipocampales fueron tratados con AVP de manera previa a la aplicación de excitotóxicos. El tratamiento crónico se dio 24 h (D 11) antes de la aplicación de glutamato o kainato mientras que en el tratamiento agudo la aplicación de AVP fue 2 h (D12) antes de la inducción de daño celular. Los ensayos de viabilidad por MTT se llevaron a cabo 24 h después de la aplicación de excitotóxicos (D 13). (B) Los pretratamientos agudo (2 h) y crónico (24 h) de AVP no afectaron la muerte celular inducida por excitotóxicos en cultivos de neuronas corticales. (C) En cultivos de neuronas hipocampales los pretratamientos con AVP crónico y agudo con dosis menores a 100nM disminuyen la muerte celular de manera significativa. D 11-13 (día 11-13); *pretratados vs no tratados (positivo) ; $p < 0.05$

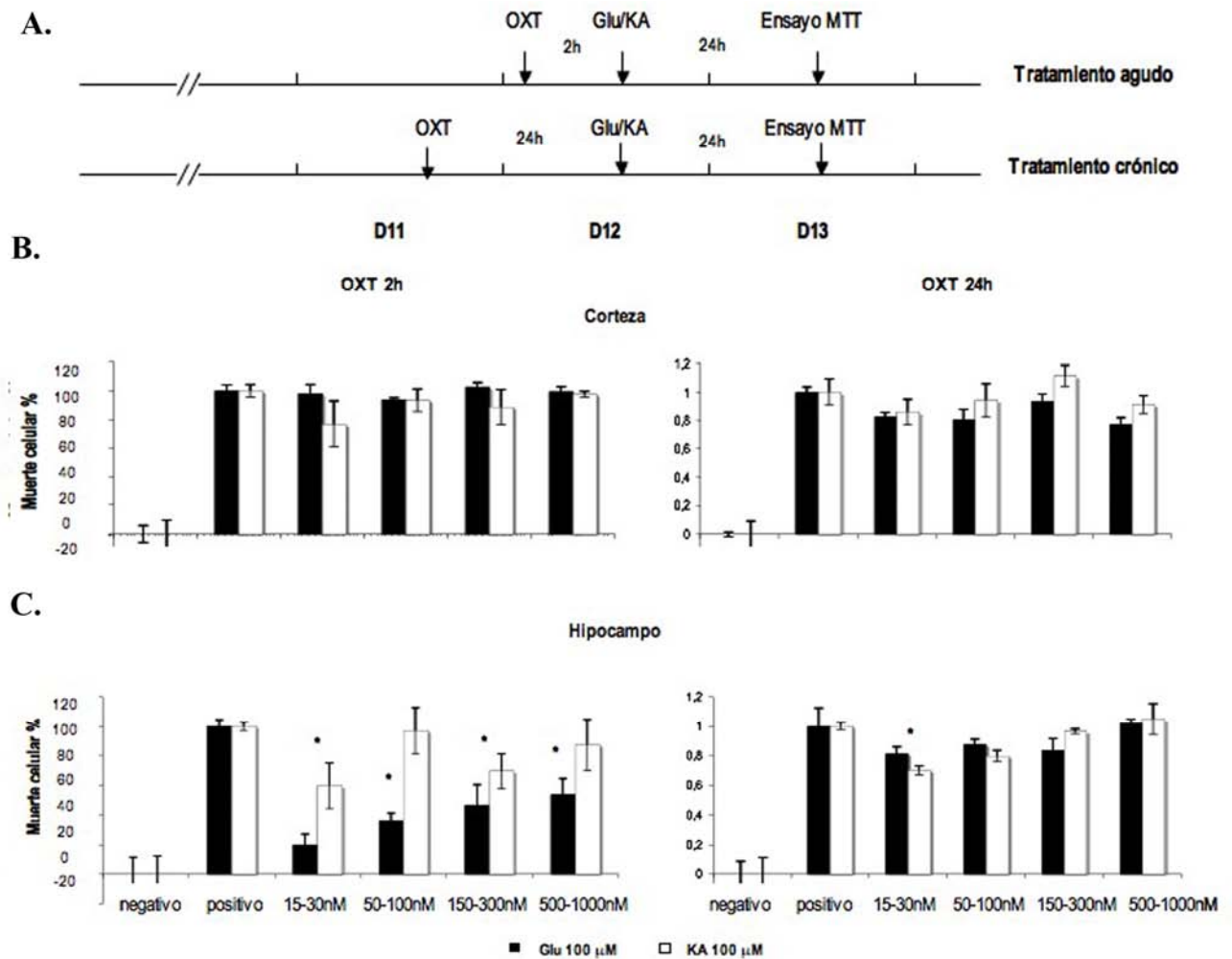


Figura 15. La OXT disminuye la muerte neuronal. (A) Cultivos de neuronas corticales e hipocámpales fueron tratados con AVP de manera previa a la aplicación de excitotóxicos. El tratamiento crónico se dio 24 h (D 11) antes de la aplicación de glutamato o kainato mientras que en el tratamiento agudo la aplicación de AVP fue 2 h (D12) antes de la inducción de daño celular. Los ensayos de viabilidad por MTT se llevaron a cabo 24 h después de la aplicación de excitotóxicos (D 13). (B) Los pretratamientos con OXT en cultivos de neuronas corticales 2h antes de la inducción de muerte celular por glutamato no disminuyen la muerte celular. Por el contrario, los tratamientos crónicos No se observó disminución de la muerte neuronal inducida por kainato con pretratamientos agudos de OXT o tratamientos crónicos reducen la muerte neuronal por excitotoxicidad. (C) En cultivos de neuronas hipocámpales los pretratamientos agudos con OXT impactan de manera significativa en la disminución de la muerte neuronal inducida por glutamato, efecto que no se observó en tratamientos crónicos. D 11-13 (día 11-13); *pretratados vs no tratados (positivo) ; $p < 0.05$

7. Discusión

La muerte celular, en sistema nervioso central, por activación excesiva de receptores de glutamato ha sido denominada excitotoxicidad. Este tipo de daño está asociado con un incremento en las concentraciones de calcio intracelular libre, fenómeno que produce la activación anormal de diferentes proteasas, fosfolipasas, endonucleasas y proteínas con actividad de cinasas y fosfatasas que llevan a la muerte neuronal (Martin et al., 1998; Wojda et al., 2008).

Una de las estructuras de SNC que presenta mayor vulnerabilidad a daño por excitotoxicidad es el sistema límbico, particularmente el hipocampo, lo anterior debido a la abundancia de receptores de glutamato de carácter ionotrópico. En un estudio previo, demostramos que durante la lactancia, en ratas adultas, existe un efecto neuroprotector ante la excitotoxicidad inducida por la administración sistémica de kainato, por lo que en éste trabajo exploramos algunos cambios en la región hipocampal que pudieran estar relacionados a la neuroprotección mencionada (Vanoye-Carlo et al., 2008).

7.2 Receptores AMPA

Los receptores AMPA y los receptores de kainato son en especial abundantes en la región hipocampal. Los primeros se encuentran presentes en alrededor del 60% de las sinapsis y juegan un papel importante en el establecimiento de potenciación a largo plazo (LTP). Asimismo se conoce que su activación es fundamental en procesos neurodegenerativos iniciados por isquemia y una serie de condiciones patológicas entre las que sobresalen la epilepsia y el Alzheimer (Sprengel and Seeburg, 1993; Martin et al., 1998; Weiss and Sensi, 2000).

En este trabajo, estudiamos los cambios en la expresión de los receptores AMPA, en el hipocampo de ratas vírgenes y ratas durante la lactancia, 24 h después de ser tratadas vía sistémica con kainato. De manera particular se estudiaron los cambios en la expresión de las

subunidades GluR1 y GluR2, mismas que se presentan en alrededor de un 80% del total de receptores AMPA presentes en el hipocampo. Lo anterior con el objetivo de investigar si existía una regulación diferencial en las condiciones ya mencionadas y su probable participación con el efecto neuroprotector en hipocampo, observado durante la etapa de lactancia.

Utilizando la técnica de Western blot, se encontró que la subunidad GluR1 disminuye su expresión en las regiones CA1, CA3 y el GD del hipocampo, 24 h después de la administración sistémica de kainato en ratas durante el día 19 de la lactancia. Por el contrario, en el hipocampo de ratas vírgenes, la administración sistémica de kainato durante la etapa de diestro 1, incrementó la expresión de la subunidad GluR1 a las 24 h, este incremento se observó en las regiones CA1 y en el GD, mientras que la región CA3 no presentó cambios significativos.

La caracterización de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA, a nivel molecular y fisiológico, señala que esta subunidad permite una alta permeabilidad de los receptores a los iones de calcio y zinc, mismos que han sido relacionados a daño mitocondrial y propuestos como la principal vía de daño celular por excitotoxicidad.

Estudios de la expresión de las subunidades que conforman los receptores AMPA, utilizando tanto modelos *in vitro* como modelos *in vivo*, demuestran que la sobreexpresión de esta subunidad incrementa el daño celular inducido por excitotoxicidad, asimismo se ha reportado que posterior a un insulto neuronal se da una regulación a la alta en la expresión de GluR1, cambio que favorece la muerte neuronal.

En un estudio previo, demostramos que las ratas vírgenes administradas con kainato, presentan un mayor grado de daño neuronal en los principales estratos neuronales de las regiones CA1 y el GD en comparación con el grado de daño observable, bajo el mismo tratamiento, en el hipocampo de animales lactantes.

El incremento en la expresión de GluR1 en las regiones CA1 y el GD en animales vírgenes, 24 h después de la administración sistémica de kainato, podría estar relacionado a la mayor susceptibilidad a daño celular por excitotoxicidad en dichas áreas. De la misma forma, la reducción de la expresión de GluR1 en las regiones CA1 y el GD del hipocampo de animales lactantes después del tratamiento con kainato correlaciona con un menor daño observable en estas mismas regiones. Cabe mencionar que el aumento en la expresión de GluR1 en el CA1 y el GD, detectado por medio de Western blot, no se refleja de manera significativa en los datos de expresión de la subunidad analizada por inmunofluorescencia, lo cual posiblemente se deba a que la inmunofluorescencia es un ensayo menos sensible para cuantificación de proteína.

La caracterización de la subunidad GluR2 de los receptores AMPA, ha permitido demostrar que la presencia de esta subunidad en el arreglo tetramérico de estos receptores ionotrópicos, reduce la permeabilidad de calcio y zinc. Aunque la subunidad GluR2 se encuentra presente en aproximadamente 80% de los receptores AMPA presentes en el hipocampo, se conoce que estímulos dañinos pueden afectar la expresión de GluR2 de manera negativa. Además, ha sido reportado que este mismo tipo de estímulos inhibe la edición del sitio Q/R en esta subunidad, fenómeno que revierte la impermeabilidad a calcio y zinc en esta subunidad. La sobreexpresión de GluR2 ha sido relacionada a la protección neuronal ante daño excitotóxico en la región CA1 del hipocampo, mientras que una reducción en su expresión se ha asociado con un incremento en la susceptibilidad a daño celular (Liu et al., 2006; Sprengel, 2006).

En este trabajo se demostró que la expresión de GluR2 es semejante en las tres áreas hipocámpales en animales vírgenes en comparación con animales lactantes y que el tratamiento con kainato reduce la expresión de GluR2 tanto en el hipocampo de animales vírgenes como de animales lactantes. Sin embargo, esta reducción de la expresión de GluR2 es mucho mayor en animales lactantes en comparación con lo encontrado en animales vírgenes.

Los resultados descritos podrían parecer contradictorios, pues se esperaría que los animales lactantes presenten un menor daño neuronal en el hipocampo después del tratamiento con

kainato por una disminución de la expresión de la subunidad GluR1 y un incremento en la subunidad que confiere impermeabilidad a calcio, es decir, GluR2. Sin embargo debe considerarse que los mecanismos de inserción y remoción de los receptores AMPA se encuentran estrechamente relacionado con la fosforilación de ambas subunidad.

Para la subunidad GluR1 se ha reportado que la fosforilación de la Ser 818 incrementa la presencia de receptores AMPA en sitios sinápticos, mientras que una fosforilación de la Ser 845 de GluR1 favorece su remoción. En el caso de la subunidad GluR2, la fosforilación de la Tyr 876 permite la internalización de los receptores AMPA y la fosforilación de la Ser 880 ha sido relacionada a la reinsertión de estos receptores. Una vez que los receptores AMPA han sido internalizados pueden ser reciclados o bien degradados vía lisosomal (Ashby et al., 2004; Palmer et al., 2004; Terashima et al., 2004; Noh et al., 2005) .

Los resultados reportados en este trabajo sugieren cambios importantes en la presencia de receptores AMPA en el hipocampo de ratas vírgenes y ratas lactantes después de 24h de la administración sistémica de kainato, cambios que podrían estar relacionados a una dinámica diferencial de la inserción y remoción de receptores AMPA en respuesta al excitotóxico. En el caso de los datos encontrados en animales vírgenes, el incremento de la expresión de la subunidad GluR1 y la disminución de la subunidad GluR2 pudieran estar asociados a un recambio de las subunidades que conforman los receptores AMPA que favorezca el incremento de calcio intracelular y por tanto se relacione a una mayor vulnerabilidad neuronal, principalmente en las áreas CA1 y el GD.

Por el contrario, la disminución de la subunidad GluR1 observada en las regiones CA1 y el GD del hipocampo de animales lactantes tratados con kainato, aunado a la drástica disminución en la expresión de la subunidad GluR2, pudiera estar asociada con la internalización de los receptores y su posterior degradación vía lisosomal, fenómeno que inhibiría la respuesta del sistema hipocampal a la administración del agonista de glutamato y permitiría un menor daño y muerte celular asociados a excitotoxicidad.

El estudio del mecanismo por el cual la administración de kainato reduce la expresión de GluR1 y GluR2 en el hipocampo de animales lactantes, requiere del análisis del fenómeno a

tiempos menores de 24 h y del uso de otro tipo de estrategias. En éste caso podrían utilizarse inhibidores de la vía lisosomal para evitar su degradación y determinar si existen cambios en la localización subcelular de la proteína después de la administración de kainato, asimismo el problema podría ser abordado mediante el análisis de los cambios en los niveles de mRNA de ambas subunidades. En el caso de la subunidad GluR2 puede resultar interesante estudiar los cambios en la edición del sitio Q/R que pudieran derivar de la administración sistémica de kainato tanto en animales lactantes como vírgenes a través de técnicas electrofisiológicas o bien de la detección del mRNA editado por RT-PCR.

7.2 Receptores de Estrógenos

Diversos estudios han demostrado una estrecha relación entre los receptores de estrógenos y el comportamiento en mamíferos. Se ha reportado que estrógenos son reguladores importantes del temperamento en humanos y primates no humanos de manera dependiente de la edad y el estado reproductivo del sujeto (Lund et al., 2005).

La influencia de estas hormonas se ha atribuido a la activación de sus receptores, ER- α y ER- β . En SNC se conoce que la expresión de los ERs es abundante, de manera particular, el hipocampo presenta la expresión de ambos tipos de receptores tanto en sitios presinápticos como postsinápticos, siendo predominante el ER- β especialmente en las regiones CA1 y CA3 y en estratos de interneuronas. La presencia de ER- α en el hipocampo ha sido ampliamente estudiada y asociada a mecanismos neuroprotectores en diferentes condiciones de daño neuronal como son isquemia, excitotoxicidad y Alzheimer (Mehra et al., 2005; Jelks et al., 2007; Liu et al., 2008).

Más recientemente, estudios como los reportados por Cimarosti y Zhang han permitido establecer la contribución del ER- β en la neuroprotección mediada por estrógenos. Así mismo, se conoce que los ERs juegan un papel importante en procesos de plasticidad sináptica. En hipocampo ha sido reportada su participación en la facilitación de LTP en la vía CA1-CA3 y el incremento en la densidad de espinas dendríticas y sinaptogénesis (Zhang et

al., 2004; Cimarosti et al., 2006; Jelks et al., 2007; Zhang et al., 2007).

En el cerebro materno el estradiol modifica el tamaño y forma de las neuronas, así como los potenciales de membrana y la actividad eléctrica en diversos núcleos talámicos, mientras que en hipocampo se le ha asociado con la formación de espinas dendríticas principalmente en la región CA1, el incremento en la expresión de BDNF y la disminución de la reacción astrogliar y de procesos apoptóticos, a través de la activación de sus receptores. En este trabajo, estudiamos los cambios en la expresión de el ER- α y ER- β en las diferentes regiones de hipocampo en respuesta al tratamiento sistémico con kainato tanto en tejido de ratas vírgenes como de animales durante la etapa de lactancia.

Los resultados obtenidos señalan que el receptor de estrógenos beta incrementa significativamente su expresión en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, 24 h después del tratamiento con kainato, en ratas lactantes, no así en la región del GD en comparación con animales vírgenes. Por el contrario, la expresión del receptor de estrógenos alfa no presenta cambios en su expresión. Adicionalmente, se encontró que el receptor de estrógenos beta presenta una relocalización en las neuronas hipocampales, tanto piramidales como granulares, después del tratamiento con kainato en animales lactantes, este cambio de localización va de un patrón claramente perinuclear a una inmunodetección aparentemente citoplasmática y nuclear.

El incremento en la expresión de ER- β en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo de animales lactantes tratados con kainato concuerda reportes previos que sustentan un papel importante de este receptor en el hipocampo. El receptor de estrógenos alfa como el receptor de estrógenos beta, están involucrados en la activación de mecanismos celulares inducidos por estrógenos en neuronas. Sin embargo, ha sido demostrado que la activación de cada receptor induce respuestas diferentes: Zhao y Brinton, recientemente reportaron que en neuronas hipocampales la neuroprotección por estrógenos, ante daño celular por glutamato, es dependiente de la fosforilación de ERK a través de la activación preferencial de ER- β . Este hallazgo es consistente con observaciones en modelos in vivo, que sugieren un papel fundamental de ER- β en la regulación de neurogénesis y desarrollo del sistema nervioso

central, entre otros procesos de plasticidad neuronal (Irwin et al., 2008; Waters et al., 2009).

En otros modelos de daño neuronal, como isquemia, se ha demostrado que los estrógenos son moléculas con efectos neuroprotectores. Cimarosti y colaboradores reportaron variaciones en la expresión de ER- α y ER- β en cultivos organotípicos de hipocampo de rata tratados con estradiol y expuestos a privación de oxígeno y glucosa. En este estudio se observó que los niveles de ER- α disminuyeron significativamente después de la privación de oxígeno y glucosa tanto en condiciones control como con el tratamiento con estradiol, mientras que la expresión de ER- β aumentó significativamente en cultivos tratados con estradiol. Estos hallazgos sugieren fuertemente que la neuroprotección inducida por estrógenos en condiciones de isquemia involucra la regulación positiva de la expresión de ER β , y por consecuencia, de los genes influenciados por éste receptor así como la activación de procesos celulares en los que participa.

De manera similar, en este estudio encontramos que, mientras el ER- α presenta solo ligeros cambios en su expresión, después del tratamiento con kainato, en el hipocampo de animales vírgenes y lactantes, el ER- β presentó un incremento considerable en su expresión en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratas lactantes después de la exposición a kainato, indicando una importante participación de ésta proteína en el proceso de neuroprotección.

Además de lo ya expuesto, otros estudios al respecto de neuroprotección por estrógenos en hipocampo utilizando isquemia cerebral en macacos adultos, muestran que la expresión de ER- α en neuronas piramidales de la región CA1 disminuye después de la exposición al estímulo dañino, mientras que la inmunoreactividad para ER- β incrementa notablemente en los estratos de interneuronas, radiado y molecular de la región CA1, además de que su expresión es detectada en microglia y astrocitos. Estos estudios sugieren que el ER- β es el principal receptor de estrógenos responsable de las acciones de estrógenos en el hipocampo de primates no humanos.

Los resultados reportados en este estudio, indican que en el hipocampo de ratas lactantes administradas por vía sistémica con kainato, después de 24 h presentan cambios en la

expresión del ER β , así como una relocalización celular de la proteína, de un patrón perinuclear a una inmunoreactividad visible en citoplasma y núcleo. Estos cambios pueden modular de manera importante la función neuronal y por tanto estar involucrados en la neuroprotección observada durante la lactancia en esta región del cerebro.

Por lo anterior resulta importante evaluar la participación de neuroesteroides en el fenómeno de protección durante la lactancia. En el caso de E2, entre los días 12 y 20 de la lactancia (L12-20) no se reportan cambios en su concentración en plasma y los niveles en circulación son similares a los que se presentan en animales vírgenes, sin embargo un análisis de los niveles de esta hormona a nivel de hipocampo resultaría útil en la comprensión de los cambios de observados en la expresión de ERs. Asimismo, la P4 es un potente neuroesteroide cuya contribución en neuroprotección ha sido ampliamente reportada y en animales lactante los niveles en circulación de esta hormona se mantienen elevados hasta el día 16 de la lactancia por lo que sería importante explorar la participación de P4 en la neuroprotección durante la lactancia (Stoffel-Wagner, 2003; Singh, 2005; Vanoye-Carlo et al., 2008).

7.3 Oxitocina y Vasopresina

La oxitocina y vasopresina son hormonas peptídicas sintetizadas en neuronas magnocelulares de los núcleos talámicos supraóptico y paraventricular y liberadas a circulación desde la glándula pituitaria. Ha sido reportado que ambos péptidos tienen una importante participación en SNC, puesto que pueden actuar como neurotransmisores y neuromoduladores. Durante la lactancia en ratas, se da un incremento en los niveles circulantes de ambas hormonas, especialmente de OT, misma que alcanza niveles de 500 pg/ml en plasma durante la secreción de leche. En el cerebro, ha sido reportado que durante la lactancia, hay un incremento considerable en la expresión de oxitocina y vasopresina en el núcleo paraventricular, medido a través de mRNA, en comparación con el encontrado en animales vírgenes (Leng et al., 2008; Neumann, 2008).

En este trabajo exploramos la participación de oxitocina y vasopresina en la neuroprotección neuronal a través de un modelo de daño excitotóxico *in vitro*. Se utilizando cultivos primarios de neuronas hipocampales y corticales, mismos que fueron tratados con oxitocina o vasopresina de manera aguda y crónica de manera previa a la inducción de muerte neuronal por excitotóxicos.

En cultivos primarios de neuronas corticales los tratamientos con AVP u OT no tuvieron efecto sobre la viabilidad neuronal. En cultivos primarios de neuronas hipocampales se observó que la AVP redujo la muerte celular inducida por glutamato cuando el tratamiento fue agudo o crónico, mientras que la oxitocina favoreció la sobrevivencia neuronal de manera más drástica cuando el tratamiento fue aplicado de manera aguda.

Los resultados obtenidos utilizando en un modelo *in vitro* de daño neuronal, sugieren que las hormonas peptídicas, oxitocina y vasopresina, favorecen la sobrevivencia de neuronas hipocampales ante la excitotoxicidad.

Se ha propuesto que el sistema nervioso central durante la maternidad sufre importantes procesos de remodelación y plasticidad que permiten a la nueva madre atender las demandas de la progenie y asegurar la sobrevivencia tanto de sí misma como de las cría. Entre estos cambios se cuenta un cambio en el balance de los comportamientos de ansiedad y agresividad, así como la adquisición de conductas encaminadas al cuidado de las crías, fenómenos a los que se ha ligado la participación tanto de oxitocina como de vasopresina (Brett and Baxendale, 2001).

La expresión de los receptores de vasopresina AVPR1a y AVPR1b ha sido reportada en diferentes áreas del sistema límbico, entre estas resalta su presencia en el hipocampo, área en la cual se ha reportado la influencia de vasopresina en procesos de memoria. En el cerebro materno, Treit y colaboradores estudiaron la participación de los receptores AVPR1a y AVPR1b en la regulación de ansiedad, encontrando una participación diferencial de ambos receptores a lo largo del hipocampo. En esta misma área cerebral diversos estudios señalan un papel importante del receptor AVPR1a en la generación de edema después de un estímulo

dañino, asimismo se ha reportado este efecto en la corteza cerebral (Brinton et al., 1994a; Thibonnier et al., 1998a; Thibonnier et al., 1998b).

A nivel de actividad neuronal, se conoce que AVPR1a media procesos de excitación neuronal en diversas áreas como son algunos núcleos talámicos, el septo lateral y medula espinal entre otros a través de la liberación de Glu. Por el contrario, aunque de la función de AVPR1b no se conoce mucho, algunos reportes señalan posee efectos ansiolíticos.

Nuestros resultados señalan una disminución de la muerte neuronal en cultivos de neuronas hipocampales tratadas con AVP previo a la exposición a excitotóxicos, no así en los cultivos de neuronas corticales. Este efecto pudiera estar relacionado a la activación de AVPR1b y sus propiedades ansiolíticas, pues de manera interesante se observó que éste receptor se expresa más en neuronas hipocampales en comparación con su expresión en neuronas corticales. Raggenbass y colaboradores han propuesto que la vasopresina es capaz de alterar las propiedades bioeléctricas de las neuronas de manera que facilita la excitabilidad o inhibición neuronal, es decir que la vasopresina más que neurotransmisor es un neuromodulador. Tal es el caso de las neuronas de los pares VII y XII del tallo cerebral y las motoneuronas espinales, en las que la vasopresina facilita la transmisión gabaérgica y glicinérgica a través del receptor AVPR1a. Otro posible escenario es la participación de AVP en la sobrevivencia neuronal a través de la activación del OXTR (Raggenbass, 2001, 2008) .

En el cerebro materno se ha reportado que la oxitocina, a través de su receptor, participa en procesos de memoria y aprendizaje, Tomizawa y colaboradores estudiaron el papel de la oxitocina en potenciación a largo plazo y su relación con la expresión de pCREB y posiblemente en la expresión de BDNF. Asimismo, numerosos estudios sustentan la participación de oxitocina en inhibición neuronal. En bulbo olfativo se ha reportado un incremento en la inhibición GABAérgica de células mitrales a través de un mecanismo presináptico en respuesta a oxitocina, mientras que en médula espinal se atribuido a la activación de OXTR en neuronas GABAérgicas de las láminas I y II un incremento en la liberación de GABA y los subsecuentes efectos nociceptivos (Tomizawa et al., 2003).

De manera importante para este trabajo, en el que se encontró una fuerte inhibición de la muerte neuronal producida por glutamato en cultivos de neuronas hipocampales pretratadas con oxitocina, Zaninetti y colaboradores reportaron que en la región hipocampal CA1, los estratos de interneuronas responden a oxitocina incrementando su actividad GABAérgica y por ende la inhibición de neuronas piramidales (Zaninetti and Raggenbass, 2000).

El efecto neuroprotector en neuronas hipocampales, mediado por los neuropéptidos AVP y OXT que se observó en los experimentos utilizando un modelo *in vitro*, sugiere que estas hormonas podrían participar en la neuroprotección ante administración sistémica de kainato durante la lactancia en el hipocampo de la rata. Sin embargo es importante extender el estudio al modelo *in vivo* con la finalidad de corroborar la participación de estas hormonas en el fenómeno de neuroprotección durante la lactancia, asimismo es necesario dilucidar la participación de los diferentes receptores a través de los que estos nonapéptidos actúan en hipocampo.

8. Conclusiones

La sobrevivencia neuronal en el hipocampo de ratas lactantes, 24h después de la administración sistémica con kainato, podría estar asociada con una disminución en la expresión de las subunidades GluR1 y GluR2 que conforman los receptores AMPA.

Los cambios en la expresión y la relocalización de ER beta, sugieren su participación en los mecanismos de neuroprotección en el hipocampo durante la lactancia.

El efecto de los nonapéptidos, oxitocina y vasopresina, sobre la muerte neuronal producida por excitotóxicos en cultivos primarios de neuronas hipocampales indica la posible participación de estas hormona en la neuroprotección durante la lactancia .

9. Referencias

- Aarts MM, Arundine M, Tymianski M (2003) Novel concepts in excitotoxic neurodegeneration after stroke. *Expert Rev Mol Med* 5:1-22.
- Aguirre CC, Baudry M (2009) Progesterone reverses 17beta-estradiol-mediated neuroprotection and BDNF induction in cultured hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 29:447-454.
- Alberi S, Dreifuss JJ, Raggenbass M (1997) The oxytocin-induced inward current in vagal neurons of the rat is mediated by G protein activation but not by an increase in the intracellular calcium concentration. *Eur J Neurosci* 9:2605-2612.
- Alescio-Lautier B, Paban V, Soumireu-Mourat B (2000) Neuromodulation of memory in the hippocampus by vasopressin. *Eur J Pharmacol* 405:63-72.
- Anborgh PH, Godin C, Pampillo M, Dhami GK, Dale LB, Cregan SP, Truant R, Ferguson SS (2005) Inhibition of Metabotropic Glutamate Receptor Signaling by the Huntingtin-binding Protein Optineurin. *J Biol Chem* 280:34840-34848.
- Appenrodt E, Schnabel R, Schwarzberg H (1998) Vasopressin administration modulates anxiety-related behavior in rats. *Physiol Behav* 64:543-547.
- Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325-337.
- Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 61:657-668.
- Ashby MC, De La Rue SA, Ralph GS, Uney J, Collingridge GL, Henley JM (2004) Removal of AMPA receptors (AMPA receptors) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs. *J Neurosci* 24:5172-5176.
- Barberis C, Tribollet E (1996) Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 10:119-154.
- Barberis C, Mouillac B, Durroux T (1998) Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 156:223-229.
- Barten DM, Albright CF (2008) Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 37:171-186.
- Ben-Ari Y (2008) Epilepsies and neuronal plasticity: for better or for worse? *Dialogues Clin Neurosci* 10:17-27.
- Ben-Ari Y, Cossart R (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23:580-587.
- Bennett MV, Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Aronica E, Connor JA, Zukin RS (1996) The GluR2 hypothesis: Ca(++)-permeable AMPA receptors in delayed neurodegeneration. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:373-384.
- Besancon E, Guo S, Lok J, Tymianski M, Lo EH (2008) Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends Pharmacol Sci* 29:268-275.
- Blumenstein Y, Maximyuk OP, Lozovaya N, Yatsenko NM, Kanevsky N, Krishtal O, Dascal N (2004) Intracellular Na⁺ inhibits voltage-dependent N-type Ca²⁺ channels by a G protein betagamma subunit-dependent mechanism. *J Physiol* 556:121-134.
- Braga MF, Aroniadou-Anderjaska V, Xie J, Li H (2003) Bidirectional modulation of GABA release by presynaptic glutamate receptor 5 kainate receptors in the basolateral amygdala. *J Neurosci* 23:442-452.
- Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM (2007) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 72:381-405.

- Bresler T, Shapira M, Boeckers T, Dresbach T, Futter M, Garner CC, Rosenblum K, Gundelfinger ED, Ziv NE (2004) Postsynaptic density assembly is fundamentally different from presynaptic active zone assembly. *J Neurosci* 24:1507-1520.
- Brett M, Baxendale S (2001) Motherhood and memory: a review. *Psychoneuroendocrinology* 26:339-362.
- Brinton RD, Monreal AW, Fernandez JG (1994a) Vasopressin-induced neurotrophism in cultured hippocampal neurons via V1 receptor activation. *J Neurobiol* 25:380-394.
- Brinton RD, Gonzalez TM, Cheung WS (1994b) Vasopressin-induced calcium signaling in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 661:274-282.
- Brinton RD, Gonzalez TM, Cheung WS (1994c) Vasopressin-induced calcium signaling in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 667:151-159.
- Brinton RE, McEwen BS (1989) Vasopressin neuromodulation in the hippocampus. *J Neurosci* 9:752-759.
- Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F (2000) Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci* 57:1577-1592.
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992a) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189-198.
- Burnashev N, Khodorova A, Jonas P, Helm PJ, Wisden W, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992b) Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* 256:1566-1570.
- Champagne FA (2008) Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Front Neuroendocrinol* 29:386-397.
- Chen Z, Ljunggren HG, Bogdanovic N, Nennesmo I, Winblad B, Zhu J (2002) Excitotoxic neurodegeneration induced by intranasal administration of kainic acid in C57BL/6 mice. *Brain Res* 931:135-145.
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.
- Choi DW, Hartley DM (1993) Calcium and glutamate-induced cortical neuronal death. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 71:23-34.
- Cimarosti H, O'Shea RD, Jones NM, Horn AP, Simao F, Zamin LL, Nassif M, Frozza R, Netto CA, Beart PM, Salbego C (2006) The effects of estradiol on estrogen receptor and glutamate transporter expression in organotypic hippocampal cultures exposed to oxygen--glucose deprivation. *Neurochem Res* 31:483-490.
- Ciriza I, Carrero P, Azcoitia I, Lundeen SG, Garcia-Segura LM (2004) Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *J Neurobiol* 61:209-221.
- Crowley WR, Armstrong WE (1992) Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. *Endocr Rev* 13:33-65.
- D'Astous M, Mendez P, Morissette M, Garcia-Segura LM, Di Paolo T (2006) Implication of the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B signaling pathway in the neuroprotective effect of estradiol in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. *Mol Pharmacol* 69:1492-1498.
- De Nicola AF, Pietranera L, Beauquis J, Ferrini MG, Saravia FE (2009) Steroid protection in aging and age-associated diseases. *Exp Gerontol* 44:34-40.
- Diamond MC, Johnson RE, Ingham C (1971) Brain plasticity induced by environment and pregnancy. *Int J Neurosci* 2:171-178.
- Dominguez R, Hu E, Zhou M, Baudry M (2009) 17beta-estradiol-mediated neuroprotection and ERK activation require a pertussis toxin-sensitive mechanism involving GRK2 and beta-arrestin-1. *J Neurosci* 29:4228-4238.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 30:379-387.

- Fitzgerald LW, Ortiz J, Hamedani AG, Nestler EJ (1996) Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci* 16:274-282.
- Fleming AS, Kraemer GW, Gonzalez A, Lovic V, Rees S, Melo A (2002) Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations. *Pharmacol Biochem Behav* 73:61-75.
- Frerking M, Nicoll RA (2000) Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 10:342-351.
- Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, Nishino H (1998) NMDA receptor-mediated differential laminar susceptibility to the intracellular Ca²⁺ accumulation induced by oxygen-glucose deprivation in rat neocortical slices. *J Neurophysiol* 79:430-438.
- Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63:29-60.
- Garcia-Segura LM, Sanz A, Mendez P (2006) Cross-talk between IGF-I and estradiol in the brain: focus on neuroprotection. *Neuroendocrinology* 84:275-279.
- Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y, Perez-Martin M, Darnaudey M (2007) Estradiol, insulin-like growth factor-I and brain aging. *Psychoneuroendocrinology* 32 Suppl 1:S57-61.
- Gass P, Muelhardt C, Sommer C, Becker CM, Kiessling M (1993) NMDA and glycine receptor mRNA expression following transient global ischemia in the gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:337-341.
- Gatewood JD, Morgan MD, Eaton M, McNamara IM, Stevens LF, Macbeth AH, Meyer EA, Lomas LM, Kozub FJ, Lambert KG, Kinsley CH (2005) Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. *Brain Res Bull* 66:91-98.
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193-204.
- Gil JM, Rego AC (2008) Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 27:2803-2820.
- Gimpl G, Fahrenholz F (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81:629-683.
- Goldin M, Epsztein J, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Crepel V, Cossart R (2007) Synaptic kainate receptors tune oriens-lacunosum moleculare interneurons to operate at theta frequency. *J Neurosci* 27:9560-9572.
- Gonzalez C, Diaz F, Alonso A (2008) Neuroprotective effects of estrogens: cross-talk between estrogen and intracellular insulin signalling. *Infect Disord Drug Targets* 8:65-67.
- Gorter JA, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosenbaum DM, Opitz T, Bennett MV, Connor JA, Zukin RS (1997) Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci* 17:6179-6188.
- Gundlach C, Kohama SG, Mirkes SJ, Garyfallou VT, Urbanski HF, Bethea CL (2000) Distribution of estrogen receptor beta (ERbeta) mRNA in hypothalamus, midbrain and temporal lobe of spayed macaque: continued expression with hormone replacement. *Brain Res Mol Brain Res* 76:191-204.
- Hatton GI, Li Z (1998) Mechanisms of neuroendocrine cell excitability. *Adv Exp Med Biol* 449:79-95.
- Hazell GG, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AM, Lolait SJ (2009) Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol* 202:223-236.
- Hibert M, Hoflack J, Trumpp-Kallmeyer S, Mouillac B, Chini B, Mahe E, Cotte N, Jard S, Manning M, Barberis C (1999) Functional architecture of vasopressin/oxytocin receptors. *J Recept Signal Transduct Res* 19:589-596.
- Hojo Y, Murakami G, Mukai H, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M, Ishii H, Kimoto T, Kawato S (2008) Estrogen synthesis in the brain--role in synaptic plasticity and memory. *Mol Cell Endocrinol* 290:31-43.

- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45:583-595.
- Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J (2008) Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 149:3167-3175.
- Jaskolski F, Normand E, Mulle C, Coussen F (2005) Differential trafficking of GluR7 kainate receptor subunit splice variants. *J Biol Chem* 280:22968-22976.
- Jelks KB, Wylie R, Floyd CL, McAllister AK, Wise P (2007) Estradiol targets synaptic proteins to induce glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor- α . *J Neurosci* 27:6903-6913.
- Joels M, Krugers H, Karst H (2008) Stress-induced changes in hippocampal function. *Prog Brain Res* 167:3-15.
- Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D (2009) Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J Neurosci* 29:12795-12801.
- Kelly MJ, Ronnekleiv OK (2009) Control of CNS neuronal excitability by estrogens via membrane-initiated signaling. *Mol Cell Endocrinol* 308:17-25.
- Keverne EB (2001a) Genomic imprinting and the maternal brain. *Prog Brain Res* 133:279-285.
- Keverne EB (2001b) Genomic imprinting, maternal care, and brain evolution. *Horm Behav* 40:146-155.
- Kinsley CH, Bardi M, Karelina K, Rima B, Christon L, Friedenber J, Griffin G (2008) Motherhood induces and maintains behavioral and neural plasticity across the lifespan in the rat. *Arch Sex Behav* 37:43-56.
- Kinsley CH, Madonia L, Gifford GW, Tureski K, Griffin GR, Lowry C, Williams J, Collins J, McLearie H, Lambert KG (1999) Motherhood improves learning and memory. *Nature* 402:137-138.
- Kinsley CH, Trainer R, Stafisso-Sandoz G, Quadros P, Marcus LK, Hearon C, Meyer EA, Hester N, Morgan M, Kozub FJ, Lambert KG (2006) Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm Behav* 49:131-142.
- Kohr G (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* 326:439-446.
- Kombian SB, Mougnot D, Hirasawa M, Pittman QJ (2000) Vasopressin preferentially depresses excitatory over inhibitory synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus in vitro. *J Neuroendocrinol* 12:361-367.
- Kwak S, Weiss JH (2006) Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol* 16:281-287.
- Lebesgue D, Chevaleyre V, Zukin RS, Etgen AM (2009) Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids* 74:555-561.
- Leng G, Meddle SL, Douglas AJ (2008) Oxytocin and the maternal brain. *Curr Opin Pharmacol* 8:731-734.
- Lerma J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 4:481-495.
- Lerma J, Morales M, Vicente MA, Herreras O (1997) Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *Trends Neurosci* 20:9-12.
- Li B, Chen N, Luo T, Otsu Y, Murphy TH, Raymond LA (2002) Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci* 5:833-834.
- Liu B, Liao M, Mielke JG, Ning K, Chen Y, Li L, El-Hayek YH, Gomez E, Zukin RS, Fehlings MG, Wan Q (2006) Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J Neurosci* 26:5309-5319.
- Liu F, Day M, Muniz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ

- (2008) Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci* 11:334-343.
- Liu W, Liu R, Chun JT, Bi R, Hoe W, Schreiber SS, Baudry M (2001) Kainate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures: evidence for multiple apoptotic pathways. *Brain Res* 916:239-248.
- Lu YM, Yin HZ, Chiang J, Weiss JH (1996) Ca(2+)-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca²⁺ influx underlies potent induction of injury. *J Neurosci* 16:5457-5465.
- Lund TD, Rovis T, Chung WC, Handa RJ (2005) Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology* 146:797-807.
- Mahanty NK, Sah P (1998) Calcium-permeable AMPA receptors mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. *Nature* 394:683-687.
- Markou A, Duka T, Prelevic GM (2005) Estrogens and brain function. *Hormones (Athens)* 4:9-17.
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46:281-309.
- Matthews JC, Scallet AC (1991) Nutrition, neurotoxicants and age-related neurodegeneration. *Neurotoxicology* 12:547-557.
- Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV (2005) Glutamate-mediated glial injury: Mechanisms and clinical importance. *Glia*.
- Mayer M (2004) Structure and function of glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1038:125-130.
- Mehra RD, Sharma K, Nyakas C, Vij U (2005) Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study. *Brain Res* 1056:22-35.
- Merchenthaler I, Dellovade TL, Shughrue PJ (2003) Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1007:89-100.
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19:151-167.
- Misra C, Brickley SG, Farrant M, Cull-Candy SG (2000) Identification of subunits contributing to synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in Golgi cells of the rat cerebellum. *J Physiol* 524 Pt 1:147-162.
- Mize AL, Shapiro RA, Dorsa DM (2003) Estrogen receptor-mediated neuroprotection from oxidative stress requires activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 144:306-312.
- Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F, Malavolta M (2005) Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol* 75:367-390.
- Morissette M, Le Saux M, D'Astous M, Jourdain S, Al Sweidi S, Morin N, Estrada-Camarena E, Mendez P, Garcia-Segura LM, Di Paolo T (2008) Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:327-338.
- Muller W, Hallermann S, Swandulla D (1999) Opioidergic modulation of voltage-activated K⁺ currents in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus in rat. *J Neurophysiol* 81:1617-1625.
- Neumann ID (2008) Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol* 20:858-865.
- Neville MC, McFadden TB, Forsyth I (2002) Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:49-66.
- Noh KM, Yokota H, Mashiko T, Castillo PE, Zukin RS, Bennett MV (2005) Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12230-12235.

- Palmer MJ, Isaac JT, Collingridge GL (2004) Multiple, developmentally regulated expression mechanisms of long-term potentiation at CA1 synapses. *J Neurosci* 24:4903-4911.
- Paternain AV, Herrera MT, Nieto MA, Lerma J (2000) GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. *J Neurosci* 20:196-205.
- Pawluski JL, Galea LA (2006) Hippocampal morphology is differentially affected by reproductive experience in the mother. *J Neurobiol* 66:71-81.
- Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20:464-470.
- Pellegrini-Giampietro DE, Zukin RS, Bennett MV, Cho S, Pulsinelli WA (1992) Switch in glutamate receptor subunit gene expression in CA1 subfield of hippocampus following global ischemia in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10499-10503.
- Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D, Lau L, Liu S, Liu F, Lu Y (2006) ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* 49:719-733.
- Perez-Navarro E, Canals JM, Gines S, Alberch J (2006) Cellular and molecular mechanisms involved in the selective vulnerability of striatal projection neurons in Huntington's disease. *Histol Histopathol* 21:1217-1232.
- Petrovic M, Horak M, Sedlacek M, Vyklicky L, Jr. (2005) Physiology and pathology of NMDA receptors. *Prague Med Rep* 106:113-136.
- Qin CC, Hui RT, Liu ZH (2008) Aging-related cerebral microvascular degeneration is an important cause of essential hypertension. *Med Hypotheses* 70:643-645.
- Quesada A, Lee BY, Micevych PE (2008) PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol* 68:632-644.
- Raggenbass M (2001) Vasopressin- and oxytocin-induced activity in the central nervous system: electrophysiological studies using in-vitro systems. *Prog Neurobiol* 64:307-326.
- Raggenbass M (2008) Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur J Pharmacol* 583:243-254.
- Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW (2008) Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals* 16:140-153.
- Richard S, Zingg HH (1990) The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem* 265:6098-6103.
- Salinska E, Danysz W, Lazarewicz JW (2005) The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 43:322-339.
- Sawe N, Steinberg G, Zhao H (2008) Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res* 86:1659-1669.
- Scott DB, Blanpied TA, Swanson GT, Zhang C, Ehlers MD (2001) An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* 21:3063-3072.
- Singh M (2005) Mechanisms of progesterone-induced neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1052:145-151.
- Smith CC, Vedder LC, McMahon LL (2009) Estradiol and the relationship between dendritic spines, NR2B containing NMDA receptors, and the magnitude of long-term potentiation at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Psychoneuroendocrinology*.
- Sprengel R (2006) Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Tissue Res* 326:447-455.
- Sprengel R, Seeburg PH (1993) The unique properties of glutamate receptor channels. *FEBS Lett* 325:90-94.

- Stern JM, Lonstein JS (2001) Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. *Prog Brain Res* 133:263-278.
- Stoffel-Wagner B (2003) Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 1007:64-78.
- Suzuki S, Brown CM, Wise PM (2006) Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 29:209-215.
- Suzuki S, Brown CM, Wise PM (2009) Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front Neuroendocrinol* 30:201-211.
- Swanson L (2003) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*: Academic Press; 3 edition (Nov 10 2003).
- Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS (2000) The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain Res* 886:190-207.
- Terashima A, Cotton L, Dev KK, Meyer G, Zaman S, Duprat F, Henley JM, Collingridge GL, Isaac JT (2004) Regulation of synaptic strength and AMPA receptor subunit composition by PICK1. *J Neurosci* 24:5381-5390.
- Thakur MK, Sharma PK (2006) Aging of brain: role of estrogen. *Neurochem Res* 31:1389-1398.
- Thibonnier M (1990) Vasopressin agonists and antagonists. *Horm Res* 34:124-128.
- Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M (2002) Molecular pharmacology and modeling of vasopressin receptors. *Prog Brain Res* 139:179-196.
- Thibonnier M, Berti-Mattera LN, Dulin N, Conarty DM, Mattera R (1998a) Signal transduction pathways of the human V1-vascular, V2-renal, V3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. *Prog Brain Res* 119:147-161.
- Thibonnier M, Auzan C, Madhun Z, Wilkins P, Berti-Mattera L, Clauser E (1994) Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptor. *J Biol Chem* 269:3304-3310.
- Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Wilkins PL, Berti-Mattera LN, Mattera R (1998b) Molecular pharmacology of human vasopressin receptors. *Adv Exp Med Biol* 449:251-276.
- Tomizawa K, Iga N, Lu YF, Moriwaki A, Matsushita M, Li ST, Miyamoto O, Itano T, Matsui H (2003) Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. *Nat Neurosci* 6:384-390.
- Tribollet E, Barberis C, Arsenijevic Y (1997) Distribution of vasopressin and oxytocin receptors in the rat spinal cord: sex-related differences and effect of castration in pudendal motor nuclei. *Neuroscience* 78:499-509.
- Vanoye-Carlo A, Morales T, Ramos E, Mendoza-Rodriguez A, Cerbon M (2008) Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Horm Behav* 53:112-123.
- Veiga S, Melcangi RC, Doncarlos LL, Garcia-Segura LM, Azcoitia I (2004) Sex hormones and brain aging. *Exp Gerontol* 39:1623-1631.
- Villmann C, Becker CM (2007) On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist* 13:594-615.
- Voogt JL, Lee Y, Yang S, Arbogast L (2001) Regulation of prolactin secretion during pregnancy and lactation. *Prog Brain Res* 133:173-185.
- Wallis RA, Panizzon KL, Nolan JP (1994) Glycine-induced CA1 excitotoxicity in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 664:115-125.
- Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY (2005) Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31:3-16.
- Wang YF, Hatton GI (2005) Burst firing of oxytocin neurons in male rat hypothalamic slices. *Brain Res* 1032:36-43.

- Waters EM, Mitterling K, Spencer JL, Mazid S, McEwen BS, Milner TA (2009) Estrogen receptor alpha and beta specific agonists regulate expression of synaptic proteins in rat hippocampus. *Brain Res* 1290:1-11.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7:847-854.
- Weigl M, Tenze G, Steinlechner B, Skhirtladze K, Reining G, Bernardo M, Pedicelli E, Dworschak M (2005) A systematic review of currently available pharmacological neuroprotective agents as a sole intervention before anticipated or induced cardiac arrest. *Resuscitation* 65:21-39.
- Weiland NG, Orikasa C, Hayashi S, McEwen BS (1997) Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J Comp Neurol* 388:603-612.
- Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5138-5143.
- Weiss JH, Sensi SL (2000) Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci* 23:365-371.
- Wise PM, Dubal DB, Rau SW, Brown CM, Suzuki S (2005) Are estrogens protective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? Reevaluation after the Women's health initiative. *Endocr Rev* 26:308-312.
- Wojda U, Salinska E, Kuznicki J (2008) Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* 60:575-590.
- Woolley CS, McEwen BS (1994) Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *J Neurosci* 14:7680-7687.
- Xerri C, Stern JM, Merzenich MM (1994) Alterations of the cortical representation of the rat ventrum induced by nursing behavior. *J Neurosci* 14:1710-1721.
- Yacoubian TA, Standaert DG (2009) Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792:676-687.
- Yang SH, Liu R, Wu SS, Simpkins JW (2003) The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1007:101-107.
- Yao M, Nguyen TV, Pike CJ (2007) Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death. *J Neurosci* 27:1422-1433.
- Zagulska-Szymczak S, Filipkowski RK, Kaczmarek L (2001) Kainate-induced genes in the hippocampus: lessons from expression patterns. *Neurochem Int* 38:485-501.
- Zaninetti M, Raggenbass M (2000) Oxytocin receptor agonists enhance inhibitory synaptic transmission in the rat hippocampus by activating interneurons in stratum pyramidale. *Eur J Neurosci* 12:3975-3984.
- Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, Steiger HJ, Schmid-Elsaesser R (2003) Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen. *Stroke* 34:1526-1532.
- Zhang QG, Han D, Hu SQ, Li C, Yu CZ, Wang R, Zhang GY (2009) Positive modulation of AMPA receptors prevents downregulation of GluR2 expression and activates the Lyn-ERK1/2-CREB signaling in rat brain ischemia. *Hippocampus*.
- Zhang Y, Milatovic D, Aschner M, Feustel PJ, Kimelberg HK (2007) Neuroprotection by tamoxifen in focal cerebral ischemia is not mediated by an agonist action at estrogen receptors but is associated with antioxidant activity. *Exp Neurol* 204:819-827.
- Zhang Y, Champagne N, Beitel LK, Goodyer CG, Trifiro M, LeBlanc A (2004) Estrogen and androgen protection of human neurons against intracellular amyloid beta₁₋₄₂ toxicity through heat shock protein 70. *J Neurosci* 24:5315-5321.

Zhao L, Brinton RD (2007) Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res* 1172:48-59.

Zhao L, Wu TW, Brinton RD (2004) Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res* 1010:22-34.

Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat

América Vanoye-Carlo^a, Teresa Morales^{b,*}, Eugenia Ramos^b,
Adriana Mendoza-Rodríguez^a, Marco Cerbón^a

^a *Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510, Mexico*

^b *Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro., 76230, Mexico*

Received 1 February 2007; revised 31 August 2007; accepted 4 September 2007

Available online 18 September 2007

Abstract

Marked hippocampal changes in response to excitatory amino acid agonists occur during pregnancy (e.g. decreased frequency in spontaneous recurrent seizures in rats with KA lesions of the hippocampus) and lactation (e.g. reduced c-Fos expression in response to *N*-methyl-D,L-aspartic acid but not to kainic acid). In this study, the possibility that lactation protects against the excitotoxic damage induced by KA in hippocampal areas was explored. We compared cell damage induced 24 h after a single systemic administration of KA (5 or 7.5 mg/kg bw) in regions CA1, CA3, and CA4 of the dorsal hippocampus of rats in the final week of lactation to that in diestrus phase. To determine cellular damage in a rostro-caudal segment of the dorsal hippocampus, we used NISSL and Fluorojade staining, immunohistochemistry for active caspase-3 and TUNEL, and we observed that the KA treatment provoked a significant loss of neurons in diestrus rats, principally in the pyramidal cells of CA1 region. In contrast, in lactating rats, pyramidal neurons from CA1, CA3, and CA4 in the dorsal hippocampus were significantly protected against KA-induced neuronal damage, indicating that lactation may be a natural model of neuroprotection.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Neuronal death; Excitotoxicity; Lactation; Kainic acid; Necrosis; Apoptosis; Caspase-3; Hippocampus

Introduction

A variety of adaptive changes in maternal physiology are required to maintain the offspring, including behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses that promote maternal behavior and milk production (see Russell et al., 2001, for review). During pregnancy and lactation, there are remarkable physiological changes in the levels of steroid hormones (estradiol, progesterone and corticosterone) and peptide hormones (oxytocin and prolactin) (Neville et al., 2002). Additionally, the mother is subjected to a sensory load provided by suckling and exteroceptive stimulation from the litter. Despite this complexity, the maternal brain has long served as an

experimental model of morphological, neurochemical and functional plasticity in the central nervous system (CNS) (Woodside, 2006). Studies in late-pregnant and lactating rats have reported strong alterations in astrocyte morphology and neural connectivity in the magnocellular subdivision of the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus (Hatton and Zhao Yang, 2002; Modney and Hatton, 1994; Theodosis and Poulain, 2001), those alterations facilitates the synchronous firing of oxytocinergic neurons necessary for parturition and the milk ejection reflex.

Morphological changes in the maternal brain are not restricted to areas related to the physiology of lactation, as shown by various studies of cell-volume changes in the medial preoptic area (Keyser-Marcus et al., 2001), neurogenesis (Furuta and Bridges, 2005; Leuner et al., 2007), and increased spine density in the CA1 area of the hippocampus (Kinsley et al., 2006; Pawluski and Galea, 2006) that occur in late pregnancy or lactation. In parallel with the morphological reorganization in hippocampal areas, enhanced spatial learning and memory

* Corresponding author. Institute for Neurobiology, National Autonomous University of Mexico, Boulevard Juriquilla 3001, 76230, Queretaro, Qro., Mexico. Fax: +52 55 5623 4005.

E-mail address: marter@servidor.unam.mx (T. Morales).

URL: www.inb.unam.mx (T. Morales).

performance have been observed during pregnancy and after parturition (Kinsley et al., 1999; Lambert et al., 2005; Pawluski and Galea, 2006; Tomizawa et al., 2003). Reproductive experience facilitates lifelong learning and memory and also decreases markers of neuronal aging (Gatewood et al., 2005).

It is widely recognized that glutamate, the major excitatory neurotransmitter in the mammalian CNS, participates in the phenomenon of neuronal plasticity, and it may also have a role in learning and memory processes (Arundine and Tymianski, 2003; Lerma et al., 1997). Moreover, glutamate is involved in the development of neurological disorders such as Alzheimer's and Huntington's diseases, epilepsy, amyotrophic lateral sclerosis, and in the cell death observed after hypoxia and ischemia (Anborgh et al., 2005; Hynd et al., 2004).

Kainic acid (KA) is a cyclic agonist of glutamate that can depolarize both pre- and postsynaptic neurons through its interaction with the kainate and AMPA ionotropic receptors. Systemic administration of KA in rodents increases the production of reactive oxygen species, disrupts mitochondrial function, and induces cell death by both necrotic and apoptotic pathways. The effect of KA administration on the CNS has been widely studied, especially in the hippocampal region, using both *in vivo* and *in vitro* models, and it has been reported that the CA1 and CA3 regions and the hilus of the dentate gyrus are particularly sensitive to the excitotoxicity of KA (Ben-Ari and Cossart, 2000; Choi, 1992; Frerking and Nicoll, 2000; Palomero-Gallagher et al., 2003).

Steroid hormones are known to generate a wide spectrum of cellular responses in the CNS; these hormones act by a genomic mechanism via their interaction with nuclear receptors and by a non-genomic mechanism through their direct action on membrane transduction systems (Hoffman et al., 2006; Mellon and Griffin, 2002; Stoffel-Wagner, 2003). On the other hand, glucocorticoids like corticosterone can exacerbate glutamate-induced cell death in hippocampal neurons (Goodman et al., 1996; Roy and Sapolsky, 2003), and chronically high levels of corticosterone accelerate and exacerbate KA-induced neurotoxicity in the CA3 hippocampal area (Dinkel et al., 2003).

Excitatory amino acids have been used as tools to study the effects of lactation on the activity of the CNS and to detect hippocampal and cortical deficits of c-Fos expression that occur in response to *N*-methyl-D,L-aspartic acid (NMA) but not to KA (Abbud et al., 1994). It has been shown that pregnancy decreases the frequency of spontaneous recurrent seizures in rats with KA lesions of the hippocampus (Berzaghi Mda et al., 1987; Standley, 1999), and it reduces binding to glutamate and kainate receptor (Standley, 1999). Some hormonal responses to excitatory amino acids during lactation are also altered (Israel and Poulain, 2000; Pinilla et al., 1998; Zelena et al., 2003). Given these deficits in the functional response of glutamate receptors during pregnancy and lactation, they are interesting physiological conditions for the study of hormonal participation in preventing neurotoxicity in the brain.

Therefore, in this study we assessed cell damage in dorsal hippocampal regions CA1, CA3, and CA4 induced by systemic KA administration to rats under two different physiological conditions, the last week of lactation and the diestrus phase. Both

conditions exhibit similar levels of sexual steroid hormones (estradiol and progesterone), but the circulating levels of corticosterone are higher during lactation than in diestrus. In addition, the possibility that suckling might influence the hippocampal sensitivity to KA was explored.

Methods

Animals

Adult virgin or pregnant (16–18 days) female Wistar rats (250–300 g) were housed individually under controlled temperature and lighting conditions (12:12 h light:dark cycle, lights on at 06:00 h), with food and water available *ad libitum*. One day after parturition, litter sizes were culled to 8–10. Mothers were kept undisturbed with the litters, and they were used for experiments on day 18–19 postpartum (pp).

The Institutional Animal Care and Use Committees of the School of Chemistry and Institute for Neurobiology at the National Autonomous University of Mexico approved all experimental protocols. Animals were handled in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Official Mexican Guide of the Ministry of Agriculture (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) published in 2001. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Experimental groups and procedure

Lactating rats at the final phase of lactation were chosen for this study based on the expected steroid hormone levels in comparison to diestrus rats. Similar levels of sexual steroid hormones (estradiol and progesterone) are exhibited under both conditions, but circulating levels of corticosterone are chronically higher during lactation.

To investigate the influence of suckling on the prevention of KA-induced neurotoxicity, at day 18 pp, litters were separated from the mother; 24 h later the animals received a single intraperitoneal (ip) injection of KA (5 mg/kg) and were perfused 24 h after the injection, for a total of 48 h deprivation from suckling. Another group of mothers received the KA injection (5 or 7.5 mg/kg) on lactation day 19 and were sacrificed 24 h later with no prior separation from their litters. Controls for each group received an ip injection with the same volume of phosphate buffered saline (PBS) on day 18 pp 24 h before sacrifice. Each of the experimental or control groups contained 5 animals.

Cycling rats

Hippocampal structures were evaluated for excitotoxic neurodegeneration patterns induced by KA administration in rats during the diestrus phase of the cycle as compared to lactating rats. Vaginal smears of virgin female rats (200–250 g) were followed for at least four cycles. On diestrus day 1, animals received the same treatment with KA (5 or 7.5 mg/kg) as above. Controls received a similar volume of PBS and were perfused 24 h later.

Behavioral seizure stage observation

Rats from the two groups (diestrus and lactating) that received a low (5 mg/kg; $n=8$) or high (7.5 mg/kg; $n=10$) dose of KA were observed over a 4-h period for signs of the characteristic progression through the behavioral seizure stages of immobility and staring, "wet dog shakes", facial clonus, unilateral and bilateral forelimb clonus, and these behavioral manifestations of motor seizures were scored according to the Zhang scale (Zhang et al., 1997).

Tissue preparation

Rats were deeply anesthetized with pentobarbital (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and perfused transcardially with 250 ml of 0.1 M PBS (pH 7.4) followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in PBS (pH 9.5, 10 °C). Brains were removed, postfixed in the same fixative overnight, and cryoprotected by 20% sucrose for 2–3 days at 4 °C. Coronal sections (30 μ m) were cut through the

dorsal hippocampus on a freezing microtome, and six series were collected and stored in cryoprotectant solution (30% ethylene glycol and 20% glycerol in PBS) at -20°C . One of the six series was employed for each staining, such that consecutive slices of tissue were analyzed by the different methods. Before any procedure, free-floating sections were rinsed 3 times over a period of 10 min in PBS buffer. The sections were mounted on poly-lysine slides, dried, and kept in PBS overnight to eliminate residual cryoprotectant.

NISSL

Morphology of the different hippocampal areas after all treatments was monitored using NISSL staining. The slide-mounted brain sections were soaked in cresyl violet solution for 10 min, dehydrated through a graded series of ethanol–water solutions, coverslipped, and analyzed under a bright field microscope.

Immunohistochemistry

Immunoreactivity for estrogen receptor- α (ER- α) and Bcl-2 was detected using a conventional avidin–biotin–immunoperoxidase technique (Sawchenko et al., 1990). Tissue was labeled with cell-type-specific polyclonal rabbit antibody against ER- α (1:50; Santa Cruz Biotechnology, CA), or goat antibody against Bcl-2 (1:50; Santa Cruz Biotechnology). Floating sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 10 min to quench endogenous peroxidase activity, followed by three rinses in PBS, and they were incubated in 1.0% sodium borohydride for 6 to 8 min in order to reduce free aldehydes. The tissue was then incubated with blocking solution (5% BSA/2% goat or rabbit serum/1% Triton X-100 in PBS) for 1 h to decrease non-specific labeling. Sections were incubated with primary antibody at 4°C for 48 h. After washing, primary antibody was detected with the biotinylated secondary antibody and the

avidin/biotin system (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sections without primary antibodies or with primary antibodies pre-absorbed with the corresponding peptide were processed in parallel as negative controls.

Fluorescence immunohistochemistry

Double labeling for caspase-3 and neuronal nuclear-specific protein (Neu-N) was performed on slide-mounted brain sections. The tissue samples were treated with 0.1% sodium citrate for 1 h at 4°C , 3% Triton X-100 in PBS for 1 h, and blocked with 5% BSA in PBS for 1 h before incubation with the primary antibody. The sections were incubated at 4°C for 24 h with monoclonal mouse anti-neuronal nuclei (Neu-N) antibody (1:100; Chemicon International Inc., Temecula, CA) in PBS. The sections were rinsed three times in PBS for 10 min each and incubated in the dark with FITC-labeled secondary antibody (antimouse IgG; 1:100, Zymed-Invitrogen, Carlsbad, CA) for 2 h. After washing, the sections were incubated with rabbit anticaspase-3 antibody (1:50, Zymed-Invitrogen) for 72 h in darkness, then rinsed and incubated for 2 h with rhodamine-conjugated secondary antibody (anti-rabbit IgG; 1:100, Chemicon International Inc.). Nuclei were stained in a $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258 solution (Molecular Probes), and the sections were coverslipped with fluorescence mounting medium (DAKO). Control sections were treated in the same way but without primary antibody. Images were collected with a Zeiss fluorescence microscope.

Detection of DNA cleavage

TUNEL was performed using an in situ cell death detection kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Mounted and desiccated sections were treated with absolute methanol for 30 min at -20°C , washed

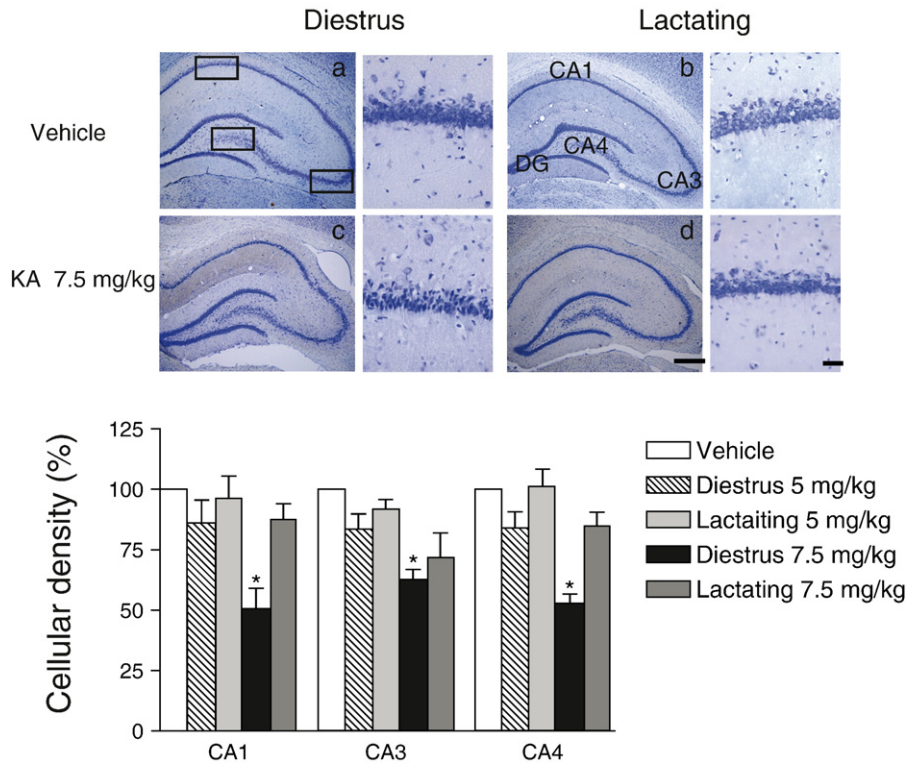


Fig. 1. Representative photomicrographs of hippocampal structures stained with NISSL. Hippocampal regions of diestrus (a, c), and lactating rats (b, d) treated with vehicle (a, b), or 7.5 mg/kg KA (c, d) are shown. KA ip administration in diestrus rats generates significant cell loss in pyramidal strata of the hippocampus mainly in the CA1 region, and in triangular-shaped cell nuclei, characteristics that worsened with the higher dose (c). Apparently, hippocampal structures of the lactating rats were affected only by the higher KA dose. Photomicrographs on the right side of each panoramic picture show an amplification of CA1. Scale bars represent 400 and 50 μm . Cellular density is represented on the graph as percent of control tissue, and clear decreases induced by KA are shown. Quantifications were performed in the areas enclosed by a line as indicated in the Methods section. Bars represent means \pm S.D., $n=5$; * $p<0.05$.

Table 1

Experimental groups	Treatment	CA1	CA3	CA4
Diestrus 1	Vehicle	437.5 (±30.68)	294.87 (±45.75)	339 (±16.77)
	KA 5 mg/kg	375.833 (±42.94)	246.75 (±18.61)	285.33 (±22.43)
	KA 7.5 mg/kg	221.25 (±37.27)	184.625 (±12.57)	179 (±13.61)
Lactation	Vehicle	435 (±25)	361.66 (±37.42)	364 (±20)
	KA 5 mg/kg	420 (±39.15)	332.5 (±14.28)	369 (±25.79)
	KA 7.5 mg/kg	380.41 (±29.5)	260.16 (±36.65)	308.66 (±21.56)

Cell counts in CA1, CA3, and CA4 regions of dorsal hippocampus: values represent averaged Number of Neurons/mm (Mean±S.D.).

with PBS three times, permeabilized with proteinase K (50 µg/ml in PBS) at 37 °C for 10 min, and incubated in a cold solution of 3% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate for 2 min. Rhodamine-labeled UTP was added, and the sections were incubated for 2 h at 37 °C, washed, and counterstained with Hoechst 33258. For the positive control, the sections were incubated in a 100 µg/ml DNase solution at 37 °C for 10 min; for the negative control, enzyme was omitted from the TUNEL solution. After mounting in fluorescence medium, sections were analyzed under a Zeiss fluorescence microscope.

Fluoro-jade staining

Tissue sections were mounted and dried on poly-L-lys-treated slides. Tissue was rehydrated in the following solutions: 1% NaOH/80% EtOH for 5 min, 70% EtOH for 2 min, and ddH₂O for 2 min. Sections were fixed in a 0.06% KMnO₄ solution for 10 min on a shaker followed by rinsing with ddH₂O for 2 min. Sections were then incubated in 0.0004% Fluoro-jade/0.1% acetic acid solution for 20 min and washed in ddH₂O three times for 5 min each. Tissue sections were dried at 50 °C for 5 to 10 min and mounted with Clarion.

Assessment of hormonal levels

Peripheral levels of estradiol, progesterone, and corticosterone were analyzed by radioimmunoassay (RIA). Blood samples were obtained by intraocular bleeding of lactating rats on days 12, 14, 16, 18, and 20 of lactation at around 12:00 h ($n=5$ per group). No animal was bled more than twice on consecutive days. Diestrus rats were bled on diestrus day 1 at 10:00 h before the administration of treatment ($n=5$).

Radioimmunoassay

A specific double-antibody radioimmunoassay was performed on independent serum samples from groups of 4 animals for each experimental condition. All samples were stored at -70 °C. E2 and P4 assessment was carried out as previously described (Abraham, 1975). The sensitivity threshold of the assays was 5.4 pg/ml for E2, 8.3 ng/ml for P4, and 26.9 pg/ml for corticosterone. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 5.3% and 8%, respectively, for E2; 6.5% and 10%, respectively, for P4; and 7.95% and 7.63%, respectively for corticosterone.

Cell counting and densitometry

Morphometric analysis was performed by cell quantification in the CA1, CA3, and CA4 subfields of the dorsal hippocampus. Hippocampal areas were delimited according to the atlas of Swanson (1998) -2.2 to -2.8 mm from bregma. Only tissue sections corresponding to these coordinates were included in the quantification, ensuring that the regions of interest were equivalent among animals and experiments. For NISSL staining, three histological sections corresponding to this rostro-caudal level were processed for each animal. Cell density was determined by counting pyramidal cells in the enclosed areas shown in Fig. 1 and is expressed as the percentage of the number of pyramidal cells in the corresponding area of tissues from control rats (graph in Fig. 1).

TUNEL-positive, caspase-positive, or fluoro-jade-positive pyramidal cells were counted in a 1-mm length of the middle portion of the hippocampal CA1, CA3, and CA4 subfields in photomicrographs taken at 20X magnification, in five brain slices (~2.2 to 2.8 posterior to bregma) in each animal, as described previously (Hayashi et al., 2003; Sugawara et al., 2002).

Label for ER- α and Bcl-2 was quantified by densitometric analysis and the Zeiss 300 software in separate photomicrographs of four histological sections per rat of the corresponding region of the dorsal hippocampus (~2.2 to 2.8 posterior to bregma). In all the densitometry determinations, the background, taken from an area with no specific signal for either the antigen or the fluorescence staining, was subtracted.

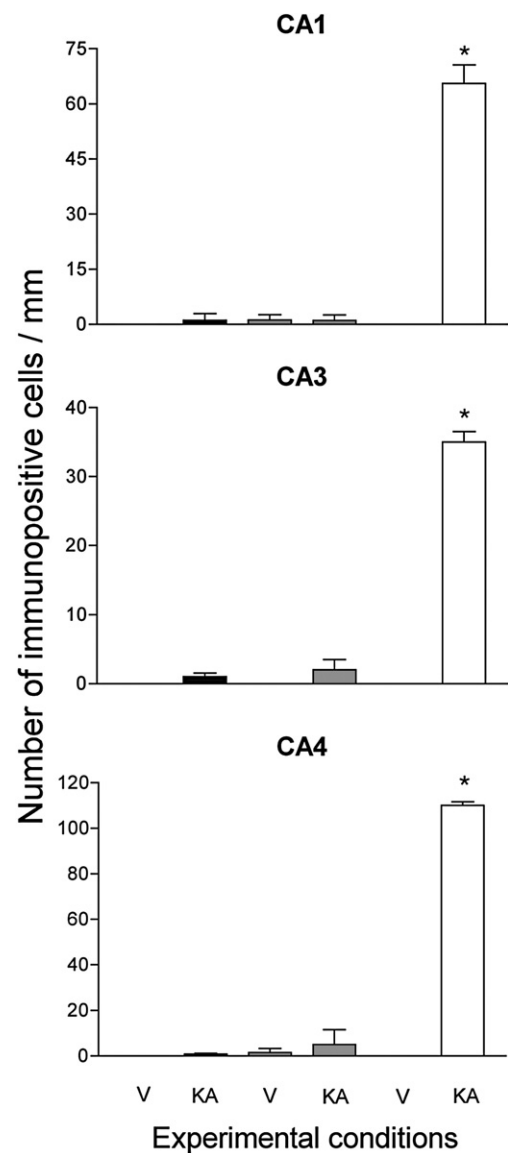


Fig. 2. Quantification of cells positive for caspase-3 immunolabel. Lactating rats, either nursing normally (black bars) or deprived of suckling for 48 h (grey bars), were compared to diestrus animals (clear bars). All were treated with 5 mg/kg KA (KA) or vehicle (V), and only diestrus rats showed increased expression of caspase-3. Bars represent means±S.D., $n=5$; * $p<0.05$.

Statistical analysis

Cell counts or arbitrary densitometric units as a function of treatment status were averaged over four or five sections per rat. The average result for each group is presented as mean±S.D. Statistical significance between groups was established with a one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparisons test. A Student's *t* test was employed for comparisons between pairs of groups. A level of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

NISSL

Morphological changes induced by KA injection were assessed by NISSL staining in one of the tissue series of diestrus rats treated with an ip dose of 5 mg/kg of KA. The pyramidal cell layer in CA1 was markedly thinner than in the control. In the CA3 and CA4 regions, the structural organization of the neurons was disrupted by the KA treatment. In contrast, KA treatment induced no clear changes independent of the suckling stimulation in the histomorphology of hippocampal regions of lactating mothers.

Treatment of diestrus rats with a high dose of KA (7.5 mg/kg) induced more pronounced damage; it was characterized by a severe loss of cell density in the pyramidal layer of CA1, and there was also a significant loss of cells in the CA3 and CA4 region (Fig. 1c). The hippocampus of lactating rats treated with the same dose of kainate showed morphological changes in the same areas: the pyramidal layer was thinned out, and the cellular layer showed a marked shrinkage (Fig. 1d). The cell density in CA1, CA3, and CA4 diminished notably (Table 1). However, the damage induced by KA treatment in hippocampal structures was significantly less in the lactating rats than in diestrus animals, as shown by the cellular density quantification of comparable areas in CA1, CA3, and CA4 (graph in Fig. 1; Table 1).

Behavioral seizure stage observation

Observational evaluation (Zhang et al., 1997) through behavioral seizure stages after KA injection showed that the lower dose of KA (5 mg/kg) induced stage 4-mild in 3 of the 8 diestrus rats (3/8), and stage 2 in the other 5 diestrus rats (5/8). In contrast, none of the lactating rats treated with the same dose

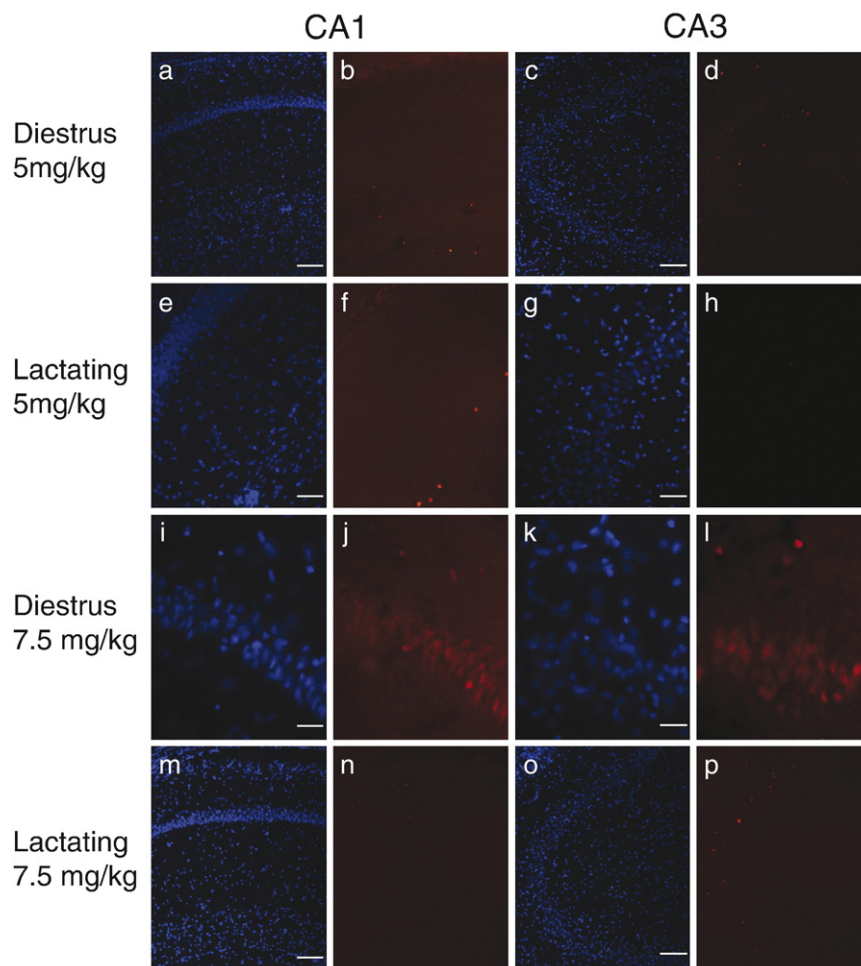


Fig. 3. TUNEL staining. Representative photomicrographs of hippocampal sections of diestrus (panels a–d and i–l) and lactating (panels e–h and m–p) rats treated with a 5 mg/kg (a–h) or 7.5 mg/kg (i–p) ip dose of kainate. Hoeschst staining of the cell nucleus is shown in blue, and positive TUNEL nuclei are shown in red for the different regions: CA1 (panels a, b, e, f, i, j, m, n), and CA3 (panels c, d, g, h, k, l, o, p). Scale bar is 200 μ m (a–d and m–p), 100 μ m (e–h), or 50 μ m (i–l).

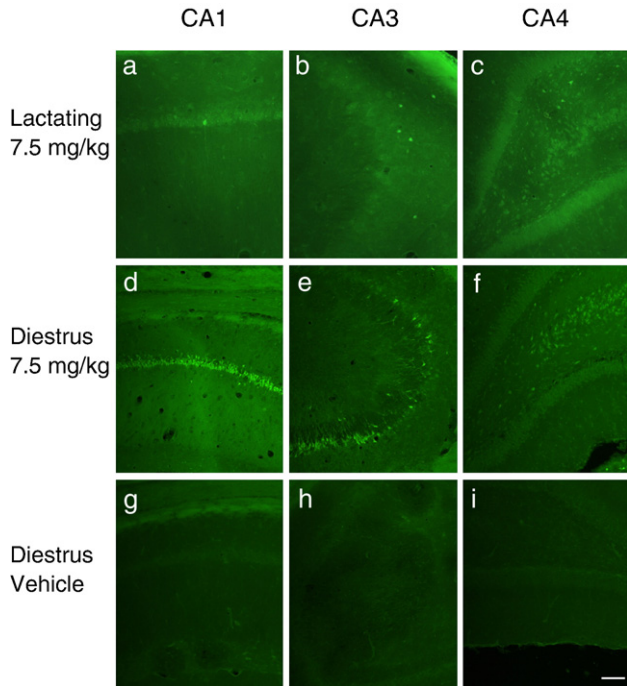


Fig. 4. Fluoro-jade staining. Representative photomicrographs of hippocampus fluoro-jade staining of diestrus and lactating rats treated with 7.5 mg/kg KA. Few neurons in the pyramidal stratus of hippocampal regions CA1 (a), CA3 (b), and CA4 (c) of lactating rats were labeled by fluoro-jade, in contrast to the numerous neurons marked by fluoro-jade in the pyramidal strata of CA1 (d) CA3 (e) and CA4 (f) regions in diestrus rats. No label was found in the hippocampal regions of diestrus animals that received an ip injection of saline (g–i). Scale bar=100 μ m.

showed any symptoms. Diestrus rats treated with 7.5 mg/kg of KA reached the severity of stage 5-mild (7/10), and the other 3 were classified as stage 4-severe (3/10), whereas only 4 lactating rats reached stage 2 (4/10), and the rest displayed signs of stage 1 (6/10).

Active caspase-3

In order to investigate the mechanisms through which KA might be acting in hippocampal regions of the diestrus or lactating rats, the immunodetection of caspase-3 was performed in one of the brain series of diestrus and lactating rats in parallel with Hoeschst staining of pycnotic nuclei and Neu-N immunostaining to identify the cell type.

Neurons with positive label for both caspase-3 and a pycnotic nucleus in hippocampal regions were counted (Methods section) in lactating rats that were either nursing, or separated from their pups for 48 h, and in diestrus rats. The results showed that only diestrus rats contained active caspase-3 positive cells, which were principally in the CA4 region (Fig. 2). Double immunostaining for active caspase-3 and Neu-N indicated that in the diestrus rat, caspase was present in neurons. In contrast, the few caspase-positive cells in lactating rat did show Neu-N label. The tissue from lactating rats who received the higher dose of 7.5 mg/kg was processed for caspase, Neu-N, and Hoeschst staining, and confirmed that no major damage was induced in the hippocampus of the lactating mothers, both normal nursing mothers and in those deprived of their pups (Fig. 2).

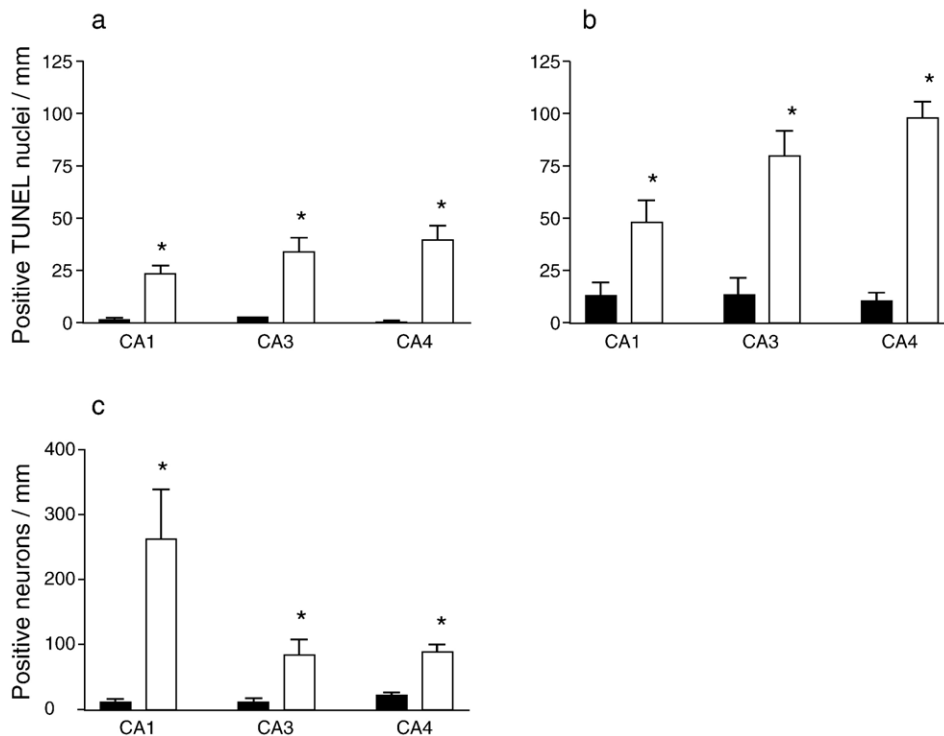


Fig. 5. Cell-counting analysis. Nuclei that stained positive in the TUNEL assay were counted and reported as positive nuclei per millimeter for the hippocampal regions studied in diestrus (clear bars) and lactating (black bars) rats treated with 5 (a) or 7.5 (b) mg/kg KA. The numbers of labeled neurons stained by fluoro-jade (c) per millimeter are shown for diestrus and lactating rats treated with 7.5 mg/kg KA. Bars represent means \pm S.D., $n=5$; * $p<0.05$.

Cell death detection by TUNEL

Since the use of caspase-3 as an indicator of apoptosis revealed some differences in the amount of damage in comparison to NISSL staining, we further investigated apoptotic damage by using TUNEL to assess fragmented DNA in one of the tissue series. A pattern of mild cell damage similar to that obtained with the immunodetection of caspase-3 was observed in diestrus animals that received the lower dose of KA (Figs. 3a–d).

Diestrus animals treated with the higher dose of KA (7.5 mg/kg) showed more TUNEL positive cell nuclei in the analyzed hippocampal regions, CA1, CA3 and CA4 (Figs. 3i–l), than the rats that received the lower dose. The CA3 region of diestrus rats exhibited fewer caspase-3-positive than TUNEL-positive cells. Diestrus rats were more susceptible than lactating mothers to the excitotoxic damage induced by KA treatment (Figs. 3e–h; m–p), as determined by TUNEL (Figs. 5a, b).

Cell damage detection by fluoro-jade

Derived from fluorescein, fluoro-jade is also employed as a marker of cell damage that is independent of the cellular death pathway. Fluoro-jade was employed to give a better sense of the total amount of cell damage, either apoptotic or necrotic, induced by the KA treatments in each of the physiological conditions.

The anatomical distribution of neuronal damage detected by fluoro-jade in hippocampal regions was similar to that observed by the methods described above (immunodetection of caspase-3 and TUNEL). Hippocampal regions (CA1, CA3, and CA4) of diestrus animals (Figs. 4d–f) were more susceptible to the KA treatment than lactating mothers (Figs. 4a–c). For some areas, the number of neurons labeled by fluoro-jade was higher than the number detected by the other methods (Fig. 5). In the CA1 region of diestrus rats receiving the higher dose of KA, the number of neurons labeled with fluoro-jade (Fig. 5c) was more than 2-fold the number detected by TUNEL (Fig. 5b). A similar result was obtained in the lactating rats, and again, the cell damage was less in lactating than in diestrus rats. Such differences in the number of neurons detected by fluoro-jade vs TUNEL suggest that damage induced by KA takes place by either an apoptotic or a necrotic pathway, or both.

Estrogen receptor α

Several recent studies have documented neuroprotective effects of steroid hormones (Ciriza et al., 2004; Goodman et al., 1996; Jover et al., 2002; Zhao et al., 2004) and the participation of steroid hormone receptors in the structural and functional integrity and survival of neurons (Manthey and Behl, 2006; Mellon et al., 2001; Numan et al., 1999). The neuroprotective

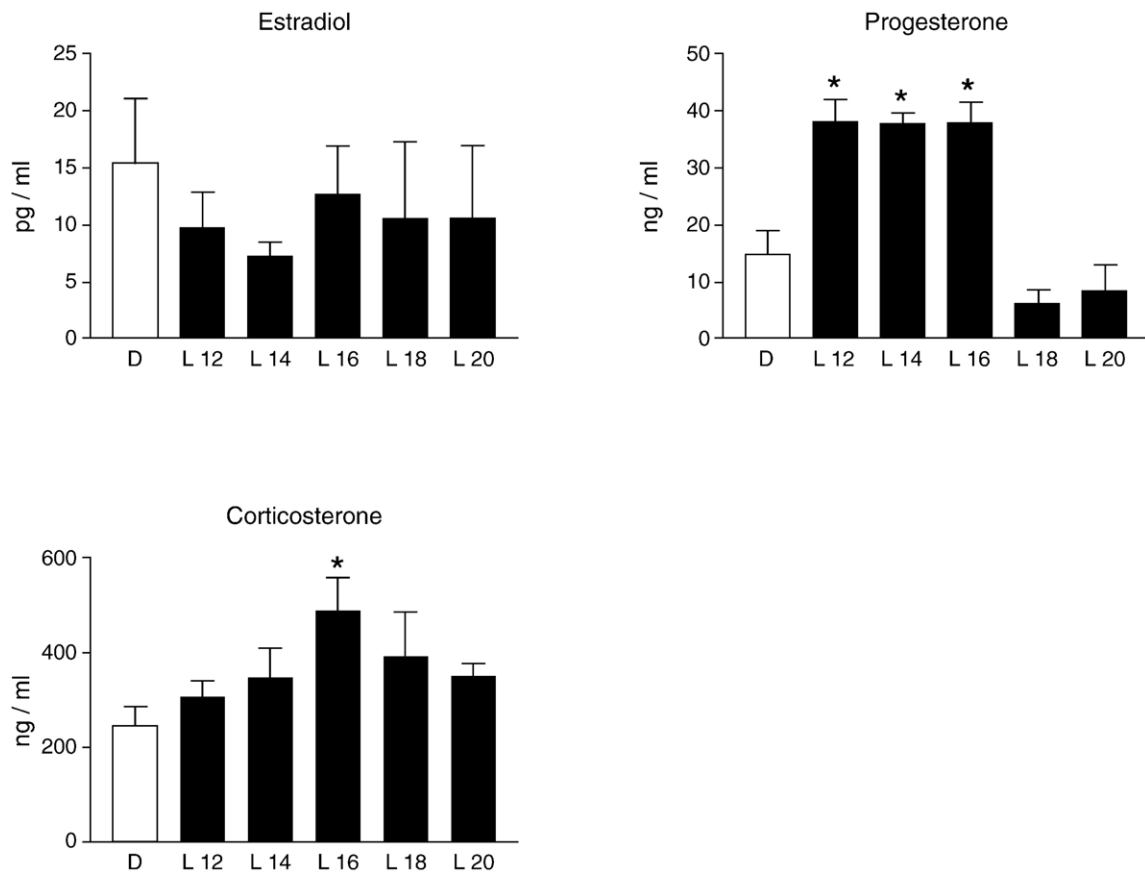


Fig. 6. Serum levels of steroid hormones in lactating and diestrus rats measured by RIA. Estradiol levels in serum were similar in diestrus (clear bars) and lactating (black bars; L12–L20) conditions, while circulating levels of progesterone in lactating rats were higher in diestrus rats until day 16 (L12–L16). Corticosterone levels in lactating rats reached a maximum on day 16 of lactation. Bars represent means \pm S.D., $n=5$; * $p < 0.05$.

effects of estrogen have been associated with the presence of the alpha-type estrogen receptor.

In order to correlate possible changes in the ER in hippocampal regions with the protective effects of lactation, immunohistochemical localization of ER α was performed in one of the brain series. Positive immunolabeling for ER α was distributed in a uniform manner in the hippocampal regions of interest (CA1, CA3, and CA4). No significant differences in the immunostaining for the ER α induced by the KA treatment were observed between groups (data not shown). Whether the functionality or cellular phenotype distribution of these receptors might be modified, deserves to be evaluated.

Steroid hormone levels

The gonadal steroid hormones are involved in many of the adaptive changes occurring during the two physiological conditions compared in the present study, the estrous cycle and lactation. Steroid hormone levels were measured in diestrus and lactating rats. Plasma levels of estradiol, progesterone, and corticosterone were determined during diestrus, and from days 12 to 20 of lactation (Fig. 6). Plasma levels of estradiol were similar in diestrus or lactating mothers during the final part of lactation (means \pm S.D. values: 15 \pm 5.7 vs 10.5 \pm 6.3 pg/ml, respectively), whereas progesterone was increased until day 16 of lactation when declines to a level similar to diestrus, and corticosterone reached the highest level on day 16 of lactation (Fig. 6).

Bcl-2 expression

Studies on pro- and anti-apoptotic factors of the Bcl-2 family in different tissues demonstrate that Bcl-2 is the main antiapoptotic protein involved in cell survival in neuronal tissue (Shacka and Roth, 2005). Thus, Bcl-2 is a candidate for the agent that blocks the ability of KA to induce cell damage in the hippocampal regions of the lactating mother. Immunohistochemical detection of Bcl-2 protein and densitometric analysis of the tissue showed increased expression of this protein in particular regions, such as brain cortex, piriform cortex, and

CA1, in the brain of the lactating mother (Fig. 7). No differences were observed in CA3 and CA4. These results suggest that Bcl-2 protein participates in the protection against damage induced by KA. However, more studies are necessary to confirm this.

Discussion

The data presented here show that during lactation, the dorsal hippocampus of the mother is protected against cellular damage caused by systemic administration of KA, as compared to virgin rats during diestrus. Cellular damage in dorsal hippocampal regions after KA administration was initially evaluated by NISSL staining. Although this stain detects only coarse changes, the morphological alterations observed after KA treatment were markedly different between diestrus and lactating rats. This difference was confirmed by two other methods of cell damage detection, TUNEL and fluoro-jade.

One challenge for studies about the lactating condition is to choose an appropriate control for comparison. In the present study, we used diestrus rats as a control to evaluate the impact of systemic KA administration on the hippocampal region during the final phase of lactation, because they present a similar steroid hormone profile (Bryant et al., 2005; Neville et al., 2002), even though only the lactating rats are chronically exposed to hormones. Also, the same rostro-caudal level of hippocampal structures was analyzed to avoid differences due to differential sensitivity to KA across the hippocampus (Palomero-Gallagher et al., 2003; Wisden and Seeburg, 1993). Using three different methods to assess cell damage, we established that KA induces less damage in the brain of the lactating rat than in the brain of the diestrus rat. The main structures of the dorsal hippocampus affected by kainate administration in the animals treated during diestrus were CA1 and CA4, and to a lesser degree CA3, whereas lactating rats only showed minor alterations in the CA3 region and only with the higher dose. These results clearly show that the susceptibility to cellular degeneration by kainate excitotoxicity was higher in animals in the diestrus phase in comparison to lactating.

It has been documented that KA can induce cell death by both apoptosis and necrosis. It has been proposed that apoptosis by kainate excitotoxicity could be mediated by changes in Bcl-2 family gene expression, release of cytochrome *C* from the mitochondria, or activation of several types of caspase, such as caspase-2, -3, -6, and -12 (Djebaili et al., 2001). However, most reports conclude that caspase-3 activation is one of the most common events after kainate administration and is concomitant with the appearance of morphological changes characteristic of apoptosis, such as DNA fragmentation and degradation of cytoplasmic material (Djebaili et al., 2001; Ferrer, 2002).

Our immunohistochemical localization of active caspase-3 and TUNEL results are consistent with the observation that KA treatment causes greater cellular damage of hippocampal regions in diestrus rats than in lactating mothers. The hippocampal areas with the highest amount of positive label for apoptosis markers in the diestrus rats were CA1 (pyramidal layer) and CA4.

In the present study, activation of caspase-3, which is characteristic of apoptosis, was less extensive than the damage

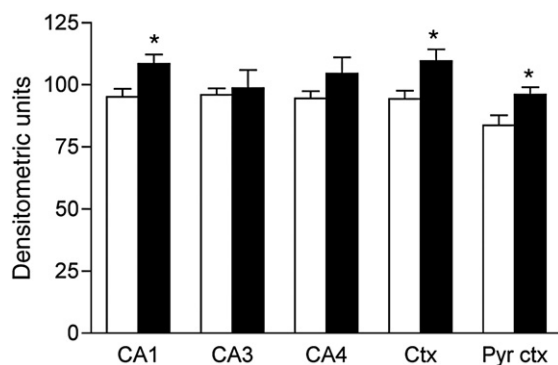


Fig. 7. Bcl-2 expression in different brain areas quantified by densitometric analysis. Lactating animals (black bars) exhibited significantly higher Bcl-2 immunostaining in CA1 in the hippocampus, cerebral cortex (Ctx), and piriform cortex (Pyr ctx) than diestrus animals (clear bars). Bars represent means \pm S.D., $n=5$; * $p<0.05$.

detected by NISSL or TUNEL, methods that detect changes in nuclear morphology caused by both necrosis and apoptosis. This discrepancy could suggest that KA induces both apoptosis and necrosis.

The differences in cell death detected by caspase-3 activation and TUNEL staining between diestrus and lactating rats may be explained in part by glucocorticoid levels during lactation. Roy and Sapolsky (2003) showed that, while the magnitude of hippocampal neuron death caused by the excitotoxicity of KA is indeed worsened in the presence of glucocorticoids, there is no evidence of increased apoptosis; they also showed that neither KA nor glucocorticoids, either alone or in combination, causes activation of caspase-3, a critical executor of insult-induced apoptosis. Furthermore, while KA causes significant apoptotic nuclear condensation, the incidence of this morphological indicator of apoptosis is not worsened by glucocorticoids. However, glucocorticoids can affect the action of KA since the level of corticosterone influences the expression of mRNAs for kainate receptor subunits in the rat hippocampus (Joels et al., 1996).

To assess necrotic damage, we employed fluoro-jade staining, which revealed more cell death in the hippocampal regions of diestrus rats. In lactating animals the number of damaged cells was similar to that detected by TUNEL, supporting the notion that lactation has neuroprotective effects against KA treatment.

The influence of suckling on the sensitivity of the brain cortex and hippocampus to *N*-methyl-D,L-aspartate was investigated by Abbud et al. (1993) who found that the decreased Fos expression pattern observed during lactation can be partially reversed by either blockage of the effects of progesterone or removal of pups for 24 h. In the present study, the effect of suckling on the damage caused by excitotoxicity was investigated by isolating the mothers from their pups for 24 h before kainate administration. Since the dams were tested during the final phase of lactation, we expected a reversion of the protective effect provided by this condition. However, the results showed that the suckling stimulation was not a major factor in the response to kainate excitotoxicity during late lactation, at least in the 24-h period examined. Nevertheless, an influence of suckling and exteroceptive stimuli on these protective effects of lactation cannot be excluded since exposure to an enriched environment, as implied in maternity experience, can have protective effects against KA-induced seizures (Young et al., 1999).

Evidence for neuroprotective effects of pregnancy against KA was reported previously, including the decreased frequency of spontaneous recurrent seizures induced by KA injected into the dorsal hippocampus (Berzaghi Mda et al., 1987) and the reduction of kainate binding sites (Standley, 1999). Neuroprotective effects might be explained by such decreased number or affinity of the glutamate AMPA/kainate receptors. A reduction in kainate receptors may lead to a decrease in transmitter release (i.e. glutamate) and reduced excitability in the hippocampus (Standley, 1999). In the present study, the score of the behavioral manifestation of motor seizures showed that diestrus rats treated with KA reached the severity stage of 2 to 4-mild, or 4-severe to 5-mild according to the Zhang scale (1997), depending on the dose, while lactating rats showed no sign of behavioral manifestation with the lower dose and early signs of

behavioral seizure after the high dose. This differential behavioral response suggests that changes in neuronal plasticity in the maternal brain could be involved. One of the most studied aspects of neuroplasticity during pregnancy and lactation is the reversible morphological remodeling in areas of the hypothalamus, including a reduction (Hatton, 2002; Olié, 2002; Theodosis et al., 2006) or increase (Featherstone et al., 2000) in astrocytic coverage which can modulate neuronal activity in neighboring neurons. It is well known that excitotoxic KA-damage induces a gliogenic response in the hippocampus; however, glial remodeling of this area during reproduction remains to be determined.

Numerous studies establish that estrogen and progesterone influence aspects of neuronal plasticity such as memory, cognition, and mood and that they have neurotrophic and neuroprotective actions. The latter can be exerted via several different mechanisms reviewed recently (Hoffman et al., 2006; Singh, 2005). Progesterone treatment reduces limbic seizures in a variety of experimental models (cited in Hoffman et al., 2006), and its ability to suppress seizures appears to be dose-dependent, since low but not high physiological levels of progesterone suppress seizures and reduce hippocampal damage (Hoffman et al., 2003). Estrogen may reduce neuronal death from KA-induced seizures (Veliskova et al., 2000), and against low doses of KA, estrogen reduces mortality from seizures and can protect the hippocampus from cell damage (Hoffman et al., 2003).

Furthermore, estradiol and progesterone were reported to reduce the neurotoxic effects of glutamate on the hippocampal region of the brain (Azcoitia et al., 1999; Cabrera et al., 2002; Cyr et al., 2001; Day and Good, 2005; Dubrovsky, 2005; Goodman et al., 1996; Shiroma et al., 2005). Several studies have shown that 17- β estradiol can downregulate caspase-3 expression and upregulate the expression of antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family. Besides circulating estradiol, the hippocampus is able to synthesize estradiol after KA administration (Azcoitia et al., 2001; Stoffel-Wagner, 2003). In addition, the reduced metabolites of progesterone, dihydroprogesterone and allopregnanolone, significantly diminish cell loss in the hippocampus after KA treatment (Ciriza et al., 2004; Dubrovsky, 2005; Guerra et al., 2004; Jover et al., 2002; Mellon et al., 2001; Zhao et al., 2004). Since progesterone is elevated for a significant period during lactation, and has been defined as a neuroactive steroid (Rupprecht and Holsboer, 1999), this hormone and/or its metabolites might play an important role in the neuroprotective effects of lactation reported here.

Due to the complexity of reproductive conditions such as pregnancy and lactation, we have not attempted to define the exact mechanism(s) for the hormonal protection against neurotoxicity. During pregnancy and lactation, the fluctuation of the ovarian hormonal levels is modified, and the circadian secretion of corticoids is lost. Levels of hormones such as estrogen, progesterone, corticosterone, prolactin, and oxytocin oscillate during pregnancy and lactation (Neville et al., 2002). The effects reported here might involve actions of any or a combination of these hormones on the maternal hippocampus.

The well-studied neuroprotective actions of ER- α in neuroprotective models include regulation of Bcl-2 protein

expression. However, we found no apparent changes in ER- α expression 24 h after the KA treatment. Longer intervals have probed to decrease ER- α expression 7 days post KA injection (Tokuhara et al., 2005). The neuroprotective effects provided by lactation could be conveyed by changes in Bcl-2 protein expression. The Bcl-2 protein family has been implicated in the regulation of apoptosis (Shacka and Roth, 2005), and it is the main antiapoptotic protein since it has been shown to be involved in maintaining cellular viability in the CNS (Strauss et al., 2004). Our results of immunostaining for Bcl-2 in the hippocampal regions showed increased label in CA1 of lactating animals, i.e. an area with less damage (Nakamura et al., 1999).

Studies in rats have consistently shown that lactation is associated with a chronic hypercorticalism (Lightman et al., 2001), which involves a flattening of the diurnal rhythm of secretion. Corticoids can exacerbate the KA-induced damage (Goodman et al., 1996) through enhancing pro-inflammatory responses (Dinkel et al., 2003), but effects reported here appear to be in opposition to this. Among many other functions, corticosterone has a role in the modulation and enhancement of maternal behavior (Graham et al., 2006). The protective effects of lactation against KA-induced excitotoxicity or damage by other agents seem to be a significant adaptation to preserve maternal behavior and other processes necessary for successful breeding.

The two main hormones involved in lactation are prolactin and oxytocin. Release of both hormones is affected by KA administration (Pinilla et al., 1998; Zelena et al., 2003), and the sensitivity of oxytocin magnocellular neurons to KA is altered during lactation (Israel and Poulain, 2000). Oxytocin triggers uterine contraction and milk ejection. Apart from the neuroendocrine projection, oxytocinergic neurons project centrally and fibers reach the hippocampus (Buijs, 1978). Oxytocin has effects on the hippocampus that improve memory and learning by promoting the establishment of long-lasting connections between neurons in the hippocampus (Furuta and Bridges, 2005) and it reduces the restraint stress-induced *c-fos* expression within the dorsal hippocampus (CA1–CA4, and dentate gyrus) (Windle et al., 2004). Evidence exists that, oxytocin inhibits glutamate activation (Condes-Lara et al., 2003); nevertheless oxytocin can show both inhibitory and excitatory actions, depending on the state of the animal and the dose employed (reviewed by Armstrong and Hatton, 2006).

Prolactin promotes milk secretion, and central actions of this hormone related to maternity include maternal behavior and grooming (Bridges and Ronsheim, 1990). Prolactin is centrally released in response to suckling and psychological stress, and its hypothalamic expression is enhanced in pregnant and lactating animals (Torner and Neumann, 2002). As is the case for oxytocin, chronic intra-cerebral administration of prolactin blocks restraint stress-induced neuronal activation within CA3 and the dentate gyrus of the dorsal hippocampus. Furthermore, reduced *c-fos* expression in the ventral hippocampus under basal conditions suggests that prolactin modulates inputs to the hippocampus (Donner et al., 2007). Hypoxia/ischemia induces a robust activation of prolactin in regions of the cerebral cortex, and unlike growth hormone, prolactin is not involved in

neuronal rescue but in the gliogenic response during recovery from cerebral injury (Modersheim et al., 2007).

In conclusion, the data presented here document the neuroprotective effects of lactation against KA excitotoxic damage in the dorsal hippocampus of the rat. Lactation is associated with increased levels of oxytocin, prolactin, progesterone, and glucocorticoids that are maintained by suckling stimulation and reinforced by external signals from the litter. As demonstrated for other hormonal-induced alterations of structure and function of hippocampal neurons (Berzaghi Mda et al., 1987; Furuta and Bridges, 2005; Graham et al., 2006; Kinsley et al., 2006; Pawluski and Galea, 2006; Standley, 1999), the phenomenon studied here could begin during pregnancy. After parturition, suckling and external stimulation provided by the pups during lactation, together with the hormonal actions, would sustain such modifications and preserve the protection against the KA-induced excitotoxic damage. The present results also indicate that this protection lasts through to the end of this period, since lactating rats were close to the weaning phase.

Lactation is the feature by which the mammals are distinguished and represent a natural model for plasticity because of the new requirements for maternal behavior and nursing. Changes in the hippocampus as a result of motherhood include dendritic architecture (Kinsley et al., 2006; Pawluski and Galea, 2006), synaptic plasticity (Tomizawa et al., 2003), and a decrease on cell proliferation in the hippocampus during the lactation period (Leuner et al., 2007). We can speculate that the protective effect of lactation on the neurons of the hippocampus described here, together with the diminished cell proliferation (Leuner et al., 2007) and attenuation of stress response (Torner and Neumann, 2002) could serve the purpose of maintaining neurons that have undergone pregnancy-induced changes necessary for the expression of behavioral and endocrine changes that occur during this time.

Further studies are needed to determine whether the damage induced by KA is decreased during lactation or only delayed, and the possible role of each of the hormones involved in the initiation and maintenance of lactation in the neuroprotective effects described here is currently under investigation in our laboratories.

Acknowledgments

This work was supported by grants from PAPIIT-UNAM and CONACYT, México. The authors thank Dr. Dorothy Pless for revision of the manuscript.

References

- Abbud, R., Hoffman, G.E., Smith, M.S., 1993. Cortical refractoriness to *N*-methyl-D,L-aspartic acid (NMA) stimulation in the lactating rat: recovery after pup removal and blockade of progesterone receptors. *Brain Res.* 604, 16–23.
- Abbud, R., Hoffman, G.E., Smith, M.S., 1994. Lactation-induced deficits in NMDA receptor-mediated cortical and hippocampal activation: changes in NMDA receptor gene expression and brainstem activation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 25, 323–332.
- Abraham, G.E., 1975. Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *J. Steroid Biochem.* 6, 261–270.

- Anborgh, P.H., Godin, C., Pampillo, M., Dhami, G.K., Dale, L.B., Cregan, S.P., Truant, R., Ferguson, S.S., 2005. Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. *J. Biol. Chem.* 280, 34840–34848.
- Armstrong, W.E., Hatton, G.I., 2006. The puzzle of pulsatile oxytocin secretion during lactation: some new pieces. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R26–R28.
- Arundine, M., Tymianski, M., 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34, 325–337.
- Azcoitia, I., Fernandez-Galaz, C., Sierra, A., Garcia-Segura, L.M., 1999. Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *J. Neurocytol.* 28, 699–710.
- Azcoitia, I., Garcia-Ovejero, D., Chowen, J.A., Garcia-Segura, L.M., 2001. Astroglia play a key role in the neuroprotective actions of estrogen. *Prog. Brain Res.* 132, 469–478.
- Ben-Ari, Y., Cossart, R., 2000. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci.* 23, 580–587.
- Bridges, R.S., Ronsheim, P.M., 1990. Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. *Endocrinology* 126, 837–848.
- Bryant, D.N., Bosch, M.A., Ronnekleiv, O.K., Dorsa, D.M., 2005. 17-Beta estradiol rapidly enhances extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylation in the rat brain. *Neuroscience* 133, 343–352.
- Berzaghi Mda, P., Amado, D., Cavalheiro, E.A., 1987. Pregnancy decreases the frequency of spontaneous recurrent seizures in rats with kainic acid lesions of the hippocampus. *Epilepsy Res.* 1, 142–144.
- Buijs, R.M., 1978. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 192, 423–435.
- Cabrera, R.J., Bregonzio, C., Laconi, M., Mampel, A., 2002. Allopregnanolone increase in striatal *N*-methyl-D-aspartic acid evoked [3H]dopamine release is estrogen and progesterone dependent. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 445–454.
- Choi, D.W., 1992. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261–1276.
- Ciriza, I., Azcoitia, I., Garcia-Segura, L.M., 2004. Reduced progesterone metabolites protect rat hippocampal neurones from kainic acid excitotoxicity in vivo. *J. Neuroendocrinol.* 16, 58–63.
- Condes-Lara, M., Gonzalez, N.M., Martinez-Lorenzana, G., Delgado, O.L., Freund-Mercier, M.J., 2003. Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Res.* 976, 75–81.
- Cyr, M., Ghribi, O., Thibault, C., Morissette, M., Landry, M., Di Paolo, T., 2001. Ovarian steroids and selective estrogen receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37, 153–161.
- Day, M., Good, M., 2005. 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, 13–21.
- Dinkel, K., MacPherson, A., Sapolsky, R.M., 2003. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J. Neurochem.* 84, 705–716.
- Djebaili, M., Lerner-Natoli, M., Montpied, P., Baillie, V., Bockaert, J., Rondouin, G., 2001. Molecular events involved in neuronal death induced in the mouse hippocampus by in-vivo injection of kainic acid. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 93, 190–198.
- Donner, N., Bredewold, R., Maloumy, R., Neumann, I.D., 2007. Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1804–1814.
- Dubrovsky, B.O., 2005. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 169–192.
- Ferrer, I., 2002. Cell signaling in the epileptic hippocampus. *Rev. Neurol.* 34, 544–550.
- Featherstone, R.E., Fleming, A.S., Ivy, G.O., 2000. Plasticity in the maternal circuit: effects of experience and partum condition on brain astrocyte number in female rats. *Behav. Neurosci.* 114, 158–172.
- Frerking, M., Nicoll, R.A., 2000. Synaptic kainate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 342–351.
- Furuta, M., Bridges, R.S., 2005. Gestation-induced cell proliferation in the rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 156, 61–66.
- Gatewood, J.D., Morgan, M.D., Eaton, M., McNamara, I.M., Stevens, L.F., Macbeth, A.H., Meyer, E.A., Lomas, L.M., Kozub, F.J., Lambert, K.G., Kinsley, C.H., 2005. Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. *Brain Res. Bull.* 66, 91–98.
- Goodman, Y., Bruce, A.J., Cheng, B., Mattson, M.P., 1996. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 66, 1836–1844.
- Graham, M.D., Rees, S.L., Steiner, M., Fleming, A.S., 2006. The effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on maternal memory in postpartum rats. *Horm. Behav.* 49, 353–361.
- Guerra, B., Diaz, M., Alonso, R., Marin, R., 2004. 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, 99–109.
- Hatton, G.I., 2002. Glial–neuronal interactions in the mammalian brain. *Adv. Physiol. Educ.* 26, 225–237.
- Hatton, G.I., Zhao Yang, Q., 2002. Peripartum interneuronal coupling in the supraoptic nucleus. *Brain Res.* 932, 120–123.
- Hayashi, T., Saito, A., Okuno, S., Ferrand-Drake, M., Chan, P.H., 2003. Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and prevents delayed neuronal cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 949–961.
- Hoffman, G.E., Moore, N., Fiskum, G., Murphy, A.Z., 2003. Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment. *Exp. Neurol.* 182, 124–134.
- Hoffman, G.E., Merchenhaller, I., Zup, S.L., 2006. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine* 29, 217–231.
- Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R., 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 45, 583–595.
- Israel, J.M., Poulain, D.A., 2000. 17-Oestradiol modulates in vitro electrical properties and responses to kainate of oxytocin neurones in lactating rats. *J. Physiol.* 524 (Pt 2), 457–470.
- Joels, M., Bosma, A., Hendriksen, H., Diegenbach, P., Kamphuis, W., 1996. Corticosteroid actions on the expression of kainate receptor subunit mRNAs in rat hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 37, 15–20.
- Jover, T., Tanaka, H., Calderone, A., Oguro, K., Bennett, M.V., Etgen, A.M., Zukin, R.S., 2002. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J. Neurosci.* 22, 2115–2124.
- Keyser-Marcus, L., Stafisso-Sandoz, G., Gerecke, K., Jasnow, A., Nightingale, L., Lambert, K.G., Gatewood, J., Kinsley, C.H., 2001. Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. *Brain Res. Bull.* 55, 737–745.
- Kinsley, C.H., Madonia, L., Gifford, G.W., Tureski, K., Griffin, G.R., Lowry, C., Williams, J., Collins, J., McLearn, H., Lambert, K.G., 1999. Motherhood improves learning and memory. *Nature* 402, 137–138.
- Kinsley, C.H., Trainer, R., Stafisso-Sandoz, G., Quadros, P., Marcus, L.K., Hearon, C., Meyer, E.A., Hester, N., Morgan, M., Kozub, F.J., Lambert, K.G., 2006. Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm. Behav.* 49, 131–142.
- Lambert, K.G., Berry, A.E., Griffins, G., Amory-Meyers, E., Madonia-Lomas, L., Love, G., Kinsley, C.H., 2005. Pup exposure differentially enhances foraging ability in primiparous and nulliparous rats. *Physiol. Behav.* 84, 799–806.
- Lerma, J., Morales, M., Vicente, M.A., Herreras, O., 1997. Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 20, 9–12.
- Leuner, B., Mirescu, C., Noiman, L., Gould, E., 2007. Maternal experience inhibits the production of immature neurons in the hippocampus during the postpartum period through elevations in adrenal steroids. *Hippocampus* 17, 434–442.
- Lightman, S.L., Windle, R.J., Wood, S.A., Kershaw, Y.M., Shanks, N., Ingram, C.D., 2001. Peripartum plasticity within the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Prog. Brain Res.* 133, 111–129.
- Manthey, D., Behl, C., 2006. From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience* 138, 845–850.

- Mellon, S.H., Griffin, L.D., 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 35–43.
- Mellon, S.H., Griffin, L.D., Compagnone, N.A., 2001. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37, 3–12.
- Modersheim, T.A., Gorba, T., Pathipati, P., Kokay, I.C., Grattan, D.R., Williams, C.E., Scheepens, A., 2007. Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. *Neuroscience* 145, 963–973.
- Modney, B.K., Hatton, G.I., 1994. Maternal behaviors: evidence that they feed back to alter brain morphology and function. *Acta Paediatr., Suppl.* Jun, 397, 29–32.
- Nakamura, M., Raghupathi, R., Merry, D.E., Scherbel, U., Saatman, K.E., McIntosh, T.K., 1999. Overexpression of Bcl-2 is neuroprotective after experimental brain injury in transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 412, 681–692.
- Neville, M.C., McFadden, T.B., Forsyth, I., 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 49–66.
- Numan, M., Roach, J.K., del Cerro, M.C., Guillaumon, A., Segovia, S., Sheehan, T.P., Numan, M.J., 1999. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Res.* 830, 358–371.
- Oliet, S.H., 2002. Functional consequences of morphological neuroglial changes in the magnocellular nuclei of the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 14, 241–246.
- Palomero-Gallagher, N., Bidmon, H.J., Zilles, K., 2003. AMPA, kainate, and NMDA receptor densities in the hippocampus of untreated male rats and females in estrus and diestrus. *J. Comp. Neurol.* 459, 468–474.
- Pawluski, J.L., Galea, L.A., 2006. Hippocampal morphology is differentially affected by reproductive experience in the mother. *J. Neurobiol.* 66, 71–81.
- Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Aguilar, R., Aguilar, E., 1998. Effects of *N*-methyl-D-aspartic acid and kainic acid on prolactin secretion in hyper- and hypoprolactinaemic conditions. *Eur. J. Endocrinol.* 138, 460–466.
- Roy, M., Sapolsky, R.M., 2003. The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. *Neuroendocrinology* 77, 24–31.
- Rupprecht, R., Holsboer, F., 1999. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 22, 410–416.
- Russell, J.A., Douglas, A.J., Ingram, C.D., 2001. Brain preparations for maternity-adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. *Prog. Brain Res.* 133, 1–38.
- Sawchenko, P.E., Cunningsham Jr., E.T., Mortrud, M.T., Pfeiffer, S.W., Gerfen, C.R., 1990. *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin anterograde axonal transport technique. In: Conn, P.M. (Ed.), *Methods in Neurosciences*, vol. 3. Academic Press, New York.
- Shacka, J.J., Roth, K.A., 2005. Regulation of neuronal cell death and neurodegeneration by members of the Bcl-2 family: therapeutic implications. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 25–39.
- Shiroma, S., Yamaguchi, T., Kometani, K., 2005. Effects of 17beta-estradiol on chemically induced long-term depression. *Neuropharmacology* 49, 97–102.
- Singh, M., 2005. Mechanisms of progesterone-induced neuroprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1052, 145–151.
- Standley, C.A., 1999. *N*-methyl-D-aspartate receptor binding is altered and seizure potential reduced in pregnant rats. *Brain Res.* 844, 10–19.
- Stoffel-Wagner, B., 2003. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 64–78.
- Strauss, K.I., Narayan, R.K., Raghupathi, R., 2004. Common patterns of bcl-2 family gene expression in two traumatic brain injury models. *Neurotox. Res.* 6, 333–342.
- Sugawara, T., Noshita, N., Lewen, A., Gasche, Y., Ferrand-Drake, M., Fujimura, Morita-Fujimura, Yuiko, Chan, Pak H., 2002. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J. Neurosci.* 22, 209–217.
- Swanson, L.W., 1998. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Elsevier, New York.
- Theodosis, D.T., Poulain, D.A., 2001. Maternity leads to morphological synaptic plasticity in the oxytocin system. *Prog. Brain Res.* 133, 49–58.
- Theodosis, D.T., Trailin, A., Poulain, D.A., 2006. Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R1175–R1182.
- Tokuhara, D., Yokoi, T., Nakajima, R., Hattori, H., Matsuoka, O., Yamano, T., 2005. Time course changes of estrogen receptor alpha expression in the adult rat hippocampus after kainic acid-induced status epilepticus. *Acta Neuro-pathol.* 110, 411–416.
- Tomizawa, K., Iga, N., Lu, Y.F., Moriwaki, A., Matsushita, M., Li, S.T., Miyamoto, O., Itano, T., Matsui, H., 2003. Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. *Nat. Neurosci.* 6, 384–390.
- Torner, L., Neumann, I.D., 2002. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* 5, 249–257.
- Veliskova, J., Velisek, L., Galanopoulou, A.S., Sperber, E.F., 2000. Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus. *Epilepsia* 41 (Suppl. 6), S30–S35.
- Windle, R.J., Kershaw, Y.M., Shanks, N., Wood, S.A., Lightman, S.L., Ingram, C.D., 2004. Oxytocin attenuates stress-induced *c-fos* mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity. *J. Neurosci.* 24, 2974–2982.
- Wisden, W., Seeburg, P.H., 1993. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.* 13, 3582–3598.
- Woodside, B., 2006. Morphological plasticity in the maternal brain: comment on Kinsley et al.; motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm. Behav.* 49, 129–130.
- Young, D., Lawlor, P.A., Leone, P., Dragunow, M., During, M.J., 1999. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat. Med.* 5, 448–4453.
- Zelena, D., Makara, G.B., Nagy, G.M., 2003. Effect of glutamate receptor antagonists on suckling-induced prolactin release in rats. *Endocrine* 21, 147–152.
- Zhang, X., Gelowitz, D., Lai, C., Boulton, A., Yu, P., 1997. Gradation of kainic acid-induced rat limbic seizures and expression of hippocampal heat shock protein-70. *Eur. J. Neurosci* 9, 760–769.
- Zhao, L., Wu, T.W., Brinton, R.D., 2004. Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res.* 1010, 22–34.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb1 Estrogen receptors increased expression during hippocampal neuroprotection in
2 lactating rats3 América Vanoye-Carlo^a, C. Adriana Mendoza-Rodríguez^a, Teresa Morales^b,
4 Elizabeth Langley^c, Marco Cerbón^{a,*}5 ^a Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico6 ^b Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro. 76230, Mexico7 ^c Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología e Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
8 04510, Mexico

10 A R T I C L E I N F O

11 Article history:

12 Received 3 October 2008

13 Received in revised form 10 February 2009

14 Accepted 12 February 2009

15 Keywords:

16 Estrogen receptor

17 Neuroprotection

18 Hippocampus

19 Lactation

A B S T R A C T

Estrogen receptor (ER)-mediated neuroprotection has been demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* model systems. Two types of estrogen receptors, ER α and ER β , are the major mediators of the biological functions of estrogens. In the hippocampus, ER β is prevalent over ER α . Recently, we reported that during the final phase of lactation there is a neuroprotective mechanism in the hippocampus of the adult female rat against neuronal damage induced by systemic kainic acid administration vs. virgin (metestrus) rats. In this study, we assessed differential ER expression and localization in CA1, CA3 and dentate gyrus regions of dorsal hippocampus of metestrus and lactating adult rats at day 19 of lactation, during basal conditions (metestrus and L19, respectively) and 24 h after systemic kainate administration. ERs were assessed by western blot and immunohistochemistry. We found a significant increase in the expression of ERs in the hippocampus during lactation as compared with metestrus. ER β was significantly increased in the CA1 and CA3 of lactating rats after the kainic acid insult. In addition, we observed a relocalization of ER β from the cytoplasm to the nucleus of neuronal cells. Our results suggest that there is a strong correlation between expression of ERs, especially ER β , in lactating CA1 and CA3 hippocampus regions in response to kainate administration, and neuroprotection observed during this reproductive period. This may be one of the mechanisms involved in the protection of the maternal brain to ensure offspring survival.

© 2009 Published by Elsevier Ltd.

22 1. Introduction

23 Estrogens modulate gene expression in different tissues, the
24 more studied effects are found in the reproductive tract and in
25 the central nervous system (CNS) [1,2]. Estrogens exert their effects
26 through two subtypes of estrogen receptors (ERs), ER α and ER β .
27 ERs belong to the nuclear receptor superfamily and are widely dis-
28 tributed in the brain and spinal cord [2].

29 Estrogens and their receptors can activate cell functions via
30 genomic and non-genomic mechanisms. The genomic mechanism
31 requires a series of steps such as binding of estrogens to the
32 receptor, translocation of ERs into the nucleus, dimerization, and
33 interaction with specific estrogen receptor binding sites (ERE)
34 on promoters of estrogen regulated genes. The indirect or non-

35 genomic mechanisms consist of the activation of different signaling
36 pathways including mitogen activated protein kinases (MAPK), Akt,
37 cAMP-responsive element binding protein (CREB) and regulation
38 of intracellular ion concentration through ion channel modulation,
39 and Ca²⁺ homeostasis. In addition, they can also modulate anti-
40 apoptotic genes, such as members of the Bcl-2 family of proteins
41 and caspases [3–6].

42 Estrogen receptors mediate different effects on the structure
43 and function of the central nervous system, including excitability,
44 neurotransmitter release, memory processes, spine density, synap-
45 sis, neurogenesis and neuroprotection [7–14]. In the rodent brain,
46 estrogen receptors have been identified by autoradiography assay
47 using [³H]estradiol [15]. High expression of ERs was found in differ-
48 ent limbic system regions such as the hippocampus, amygdala and
49 lateral septum. These findings were later confirmed using immuno-
50 histochemical and *in situ* hybridization techniques [16,17].

51 It has been accepted that estrogens, through ERs, participate
52 in neuroprotection in different neurodegeneration models and
53 ischemia [18,19]. The contribution of ERs to neuroprotection has
54 been related to transcriptional regulation of proapoptotic and anti-
55 apoptotic molecules [20].

* Corresponding author at: Facultad de Química, Edif. F, Ciudad Universitaria,
UNAM, Coyoacán, 04510 México, D.F., Mexico.

Tel.: +52 55 56223820; fax: +52 55 56223820.

E-mail addresses: mcerbon85@yahoo.com.mx, mcerbon85@hotmail.com
(M. Cerbón).

Recently, we reported that during lactation there is a neuroprotective effect against cell damage induced by kainate in dorsal hippocampus. Using different methods to assess cell damage, we established that the brain of the lactating rat was significantly less sensitive to excitotoxic damage induced by kainate than the metestrus rat [21]. The aim of the present study was to determine changes in the expression of ERs and their distribution in the hippocampus of normal and kainic acid treated lactating rats, to elucidate the possible contribution of ERs in neuroprotection against kainic acid cell damage observed in lactating rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult virgin or pregnant (18–20 days) female Wistar rats (250–300 g) were housed individually under controlled temperature and lighting conditions (12:12 h light:dark cycle, lights on at 06:00 h), with food and water available *ad libitum*.

Lactating rats at the final phase of lactation were chosen for this study based on the expected steroid hormone levels in comparison to metestrus rats. Similar levels of sexual steroid hormones, estradiol (10.5 ± 6.3 pg/ml vs. 15.0 ± 5.7 pg/ml) and progesterone (<10.0 ng/ml) are exhibited under both conditions, but circulating levels of corticosterone (>300 ng/ml in lactating vs. <300 ng/ml in metestrus rats) are chronically higher during lactation [21,22]. Each experimental or control group contained five animals.

For lactating rats, 1 day after parturition, litter sizes were culled to 8–10. Mothers were kept undisturbed with the litters, and they were used for experiments on lactating day 19, considered as the basal condition. Treated animals received an intraperitoneal (i.p.) injection of vehicle (PBS) or kainate (7.5 mg/kg) and were sacrificed 24 h later.

Vaginal smears of virgin female rats (200–250 g) were followed for at least four cycles. Metestrus was considered to be the basal condition. Animals on this day of the oestrous cycle received the same treatment with vehicle (PBS) or KA (7.5 mg/kg) as above, and were perfused 24 h later.

The Institutional Animal Care and Use Committees of the School of Chemistry and Institute for Neurobiology at the National Autonomous University of Mexico approved all experimental protocols. Animals were handled in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Official Mexican Guide of the Ministry of Agriculture (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) published in 2001 [<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/NOM/029zoo.pdf>]. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2. Western blot

Dorsal hippocampal regions, CA1, CA3 and dentate gyrus (DG), from lactating and virgin animals were dissected according to the Lein [23] procedure. Tissue was homogenized by sonication (four cycles at 100% of amplitude during 20 s) in 200 μ l of lysis buffer. Homogenates were centrifuged at 12,500 rpm during 15 min at 4°C and supernatants recovered. Thirty μ g of total protein was separated by 8% SDS-PAGE for ER α and ER β detection. Following transfer onto PVDF membranes, blots were blocked with 10% dry milk in TBS-0.1% Tween and incubated overnight at 4°C in primary antibodies against ER α (1:400, Santa Cruz Biotechnology), ER β (1:500, Santa Cruz Biotechnology) and β -actin (1:500, Santa Cruz Biotechnology) followed by horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:10,000, Santa Cruz Biotechnology). Immunoreactivity was visu-

alized using enhanced chemiluminescence. Data were expressed as ratios of β -actin.

2.3. Tissue preparation

Rats were deeply anesthetized with pentobarbital (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to carry out transcatheter perfusion with 250 ml of 0.1 M PBS (pH 7.4) followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde in PBS (pH 9.5, 10°C). Brains were removed, postfixed in the same fixative overnight and cryoprotected using 20% sucrose for 2–3 days at 4°C. Coronal sections (30 μ m) were cut through the dorsal hippocampus on a freezing microtome, and six series were collected and stored in cryoprotectant solution (30% ethylene glycol and 20% glycerol in PBS) at -20°C . One of the six series was employed for each staining, such that consecutive slices of tissue were analyzed by the different methods. Before any procedure, free-floating sections were rinsed 3 times for 10 min in PBS buffer. The sections were mounted on poly-lysine slides, dried, and kept in PBS overnight to eliminate residual cryoprotectant.

2.4. Immunohistochemistry

Immunoreactivity for estrogen receptor-alpha (ER α) and estrogen receptor-beta (ER β) was detected using a conventional avidin-biotin-immunoperoxidase technique [24]. Tissue was labeled with cell-type-specific polyclonal rabbit antibody against ER α (1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA), or mouse monoclonal antibody against ER β (1:100, Santa Cruz Biotechnology,

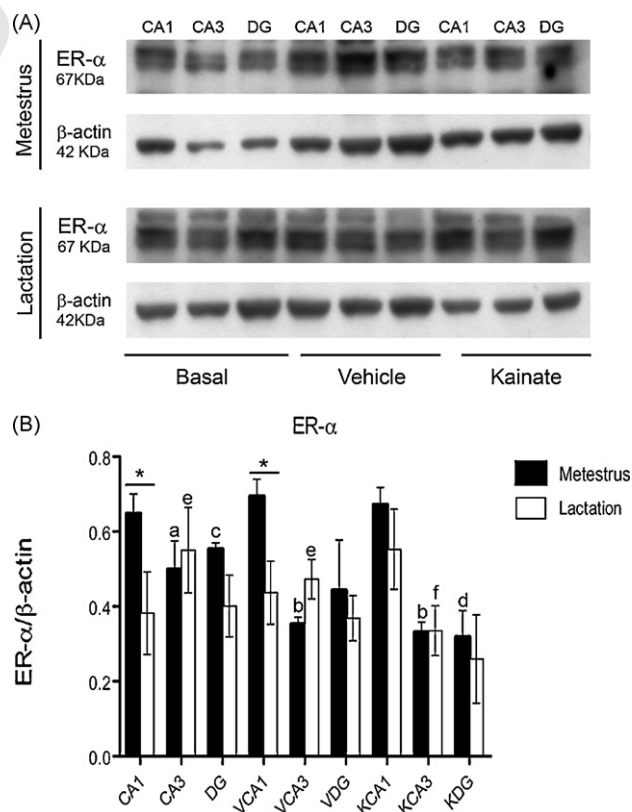


Fig. 1. ER α expression in the hippocampus. (A) ER α expression was measured by western blot in CA1, CA3 and DG hippocampal regions of virgin and lactating rats during basal conditions (metestrus and lactation day 19, respectively) and 24 h after vehicle (V) or kainate (K) administration. A representative western blot of five independent experiments is shown. (B) Western blot densitometric analysis. Data represent the mean \pm S.D. of five animals/treatment. Metestrus vs. lactation: * $p < 0.001$; a vs. b: $p < 0.01$; c vs. d: $p < 0.05$.

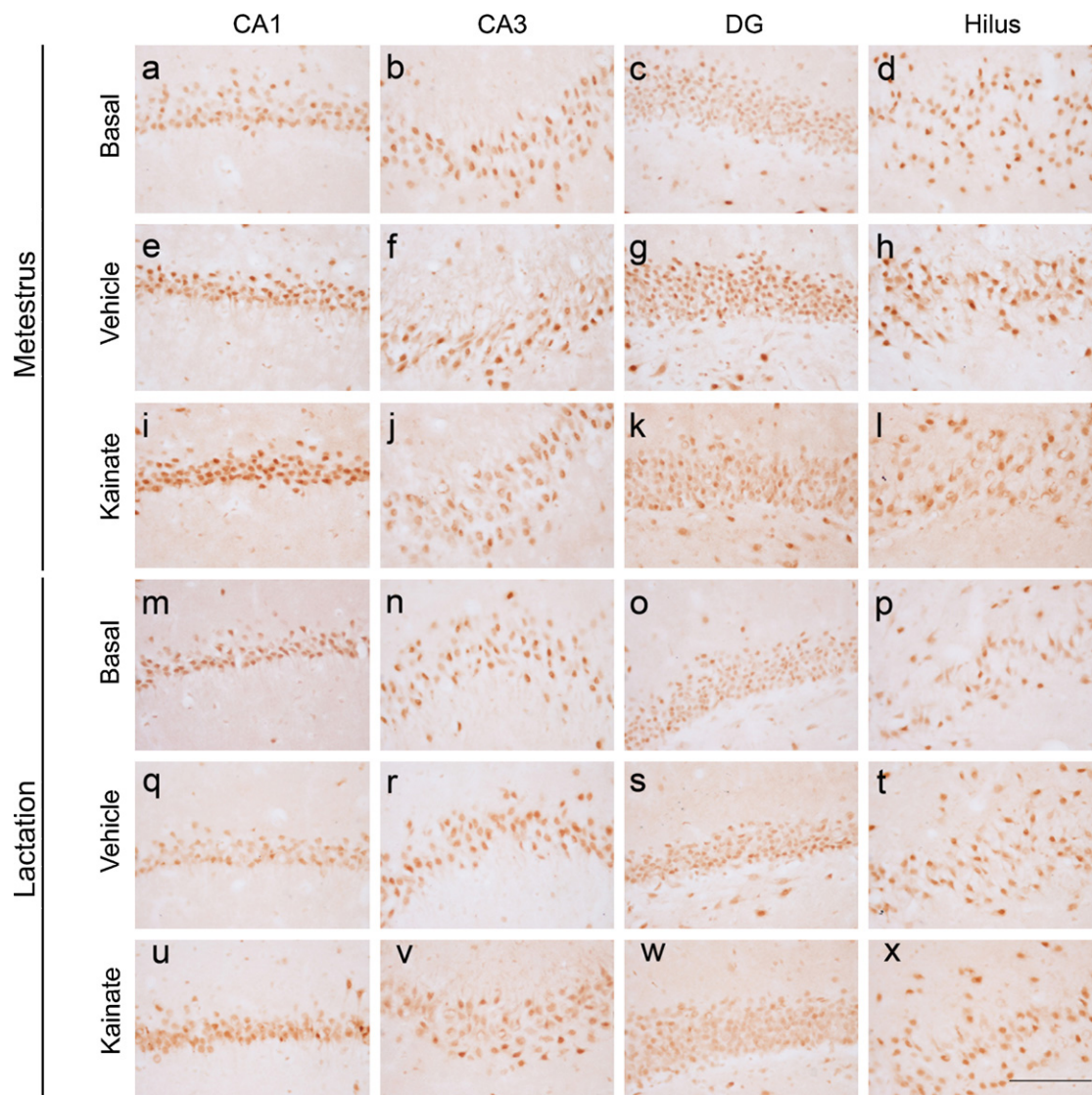


Fig. 2. ER α cellular localization in the hippocampus. ER α protein was detected *in situ* by immunohistochemistry in dorsal hippocampus of virgin metestrus (a–l) and lactating (m–x) rats, in basal conditions (a–d; m–p), and after vehicle (e–h; q–t) or kainate (i–l; u–x) administration, in pyramidal cells of CA1 region (a, e, i, m, q and u) and CA3 stratum (b, f, j, n, r and v) and granular cells of DG (c, g, k, o, s and w) and hilus region (d, h, l, p, t and x). ER α is preferentially located in the nuclei of neurons. Bar = 100 μ m.

CA). Sections were mounted and dried on poly-L-lys-treated slides and treated with boiling sodium citrate 10 mM pH 6.0 during 20 min, 3% hydrogen peroxide for 30 min to quench endogenous peroxidase activity, 1% sodium borohydride in PBS at 4°C for 30 min, Triton X-100 0.3% in PBS for 30 min with several washes in PBS. The tissue was then incubated with blocking solution (5% BSA/2% goat or rabbit serum/1% Triton X-100 in PBS) for 1 h to decrease non-specific labeling.

Sections were incubated with primary antibody in blocking solution at 4°C overnight. After washing, primary antibody was detected with the biotinylated secondary antibody and the avidin/biotin system (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sections without primary antibodies or with primary antibodies preadsorbed with the corresponding peptide were processed in parallel as negative controls.

2.5. Statistical analysis

Western blot densitometric results for each group are presented as mean \pm S.D. Statistical significance between groups was estab-

lished with a one-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparisons test. $p < 0.05$ was considered significant.

Positive cell nuclei for ER β immunolabeling count were performed with microscopic images obtained from pyramidal cell layers in CA1 and CA3 and hilus and granular cell layers in DG subdivisions of the hippocampus using 40 \times magnification. Statistical significance between groups was established with a one-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparisons test. $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Cellular localization and expression assessment of ER α in hippocampal areas

The level of ER α in total protein extracts from dorsal hippocampal regions was analyzed by western blot (Fig. 1A). The results showed that during metestrus, there was an increased expression of ER α in the CA1 region as compared with the CA3 region. Decreased expression of ER α was observed in CA3 and DG hip-

pocampal regions 24 h after systemic kainic acid administration (Fig. 1B).

Lactating rats on day 19 showed a similar expression of ER α to the metestrus rats in CA3 and DG hippocampal regions, while the CA1 region showed a lower expression of the receptor (Fig. 1A and B). Vehicle treatment did not affect ER α expression. After kainate treatment, we observed a significant decrease in ER α expression on the CA3 region as compared with basal conditions and vehicle treatment (Fig. 1B).

To assess ER α distribution in the hippocampus, we employed an immunohistochemical approach. ER α was detected at high levels in the nuclei of pyramidal neurons of the CA1 and CA3 regions and the DG granular and hilar neurons in virgin animals during basal conditions (Fig. 2a-d). After 24 h of vehicle administration, an increase in cytoplasmic ER α in the CA1 and CA3 pyramidal neurons and hilar neurons was observed in the hippocampus of diestrus rats, where immunoreactivity extends into axonal projections of the neurons (Fig. 2e-h). This change, from preferentially nuclear to nuclear-cytoplasmic distribution of ER α , was prevented by kainate treatment. The hippocampus of metestrus animals, 24 h after systemic administration of kainic acid, showed a preferential nuclear pattern of ER α distribution, similar to basal conditions (Fig. 2j-l).

Hippocampal regions of lactating animals, in basal conditions (lactating day 19), showed ER α immunoreactivity in pyramidal neuron nuclei of the CA1 and CA3 regions and in the nuclei of granular and hilar neurons of the dentate gyrus, with slight reactivity in the cytoplasm (Fig. 2m-p). The nuclear-cytoplasmic distribution pattern of ER α in lactating rats shows no change after vehicle (Fig. 2q-t) or kainate administration (Fig. 2s-x).

3.2. Cellular relocation and expression changes of ER β in hippocampal areas after kainic acid administration to lactating rats

Expression of ER β was measured in total protein extracts from dorsal hippocampal regions by western blot (Fig. 3A). Metestrus rats showed low expression levels in the CA1 hippocampal region as compared with the CA3 and DG regions under basal conditions. After 24 h of vehicle administration, on diestrus day of the oestrous cycle, we observed an increase in ER β expression in the CA1 region and a decrease in the DG region, whereas ER β expression in the CA3 region was not modified. The systemic administration of kainic acid induced a decrease in ER β concentration in the CA1 region while an increase in ER β expression was observed in the DG region (Fig. 3A and B).

During lactation, ER β protein in the hippocampus showed similar levels to those during metestrus, as detected by western blot, in all the studied areas. Vehicle administration did not affect ER β expression in the CA1, CA3 and DG regions of lactating rats. After 24 h of kainic acid administration, a significant increase in ER β protein levels was detected in the CA1 and CA3 dorsal hippocampal regions (Fig. 3A and B).

Localization of ER β in dorsal hippocampus in virgin and lactating rats was visualized by immunohistochemistry. Virgin rats on metestrus day showed a marked perinuclear localization of ER β protein in CA1 and CA3 pyramidal neurons. Additionally, immunoreactivity was positive in interneuron strata (data not shown). In the dentate gyrus, ER β expression showed perinuclear immunoreactivity both in granular and hilar neurons (Fig. 4a-d). Treatment with vehicle or kainate did not affect perinuclear distribution of ER β protein (Fig. 4e-j).

The hippocampus of lactating rats under basal and vehicle conditions showed perinuclear distribution in the soma of pyramidal, granular and hilar neurons of the CA1, CA3 and DG regions (Figs. 4m-t and 5A). Immunoreactivity was positive for axonal projections in the principal strata of the hippocampus. In addition, we

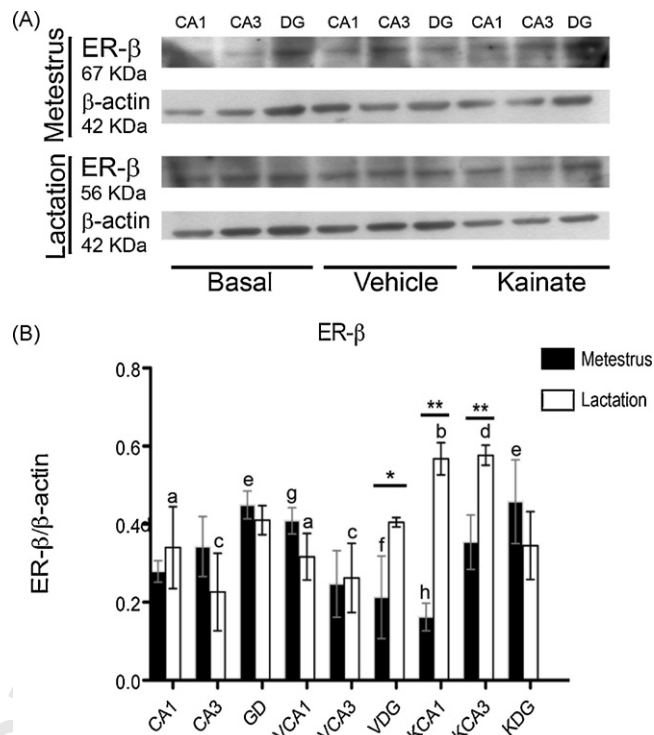


Fig. 3. ER β expression in the hippocampus. (A) ER β expression was measured by western blot in CA1, CA3 and DG hippocampal regions of virgin and lactating rats during basal conditions (metestrus and lactation day 19, respectively) and 24 h after vehicle (V) or kainate (K) administration. A representative western blot of five independent experiments is shown. (B) Western blot densitometric analysis. Data represent the mean \pm S.D. of five animals/treatment. Metestrus vs. lactation: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; a vs. b: $p < 0.05$; c vs. d: $p < 0.01$; e vs. f: $p < 0.05$; g vs. h: $p < 0.01$.

observed ER β in interneuronal strata (data not shown). Kainic acid systemic administration dramatically changed the distribution of ER β in CA1, CA3 and DG regions (Fig. 5A). About 30% of the cells in the principal strata of hippocampal regions showed cytoplasmic localization of ER β before kainate treatment (Fig. 5B). After 24 h of kainate administration, the principal strata of the hippocampus showed a redistribution of ER β protein from cytoplasmic localization to a nuclear-cytoplasmic distribution in about 75% of pyramidal granular and hilar neurons (Figs. 4u-x and 5).

4. Discussion

In the present study we demonstrate that estrogen receptor beta expression is significantly increased in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus in lactating rats after treatment with kainic acid, but not in the DG. In contrast, the expression of estrogen receptor alpha decreased significantly after kainic treatment in CA3, in both metestrus and lactating rats, and in the DG of the metestrus rats. In addition, a significant relocation of ER β from the cytoplasm to the nucleus was observed in hippocampal neurons, suggesting the participation of ER β in neuroprotection against kainic acid cell death induction in this brain area.

Recently, we reported that the dorsal hippocampus of the mother is protected against cellular damage caused by systemic administration of KA, as compared to virgin rats during metestrus phase of the oestrous cycle, and the mechanisms that participate in this process are not fully understood [21]. However, the hormones involved in lactation, such as steroid hormones, are thought to participate in this phenomenon.

Given that contribution of both estrogen receptor subtypes to neuroprotection in the hippocampus has been demonstrated

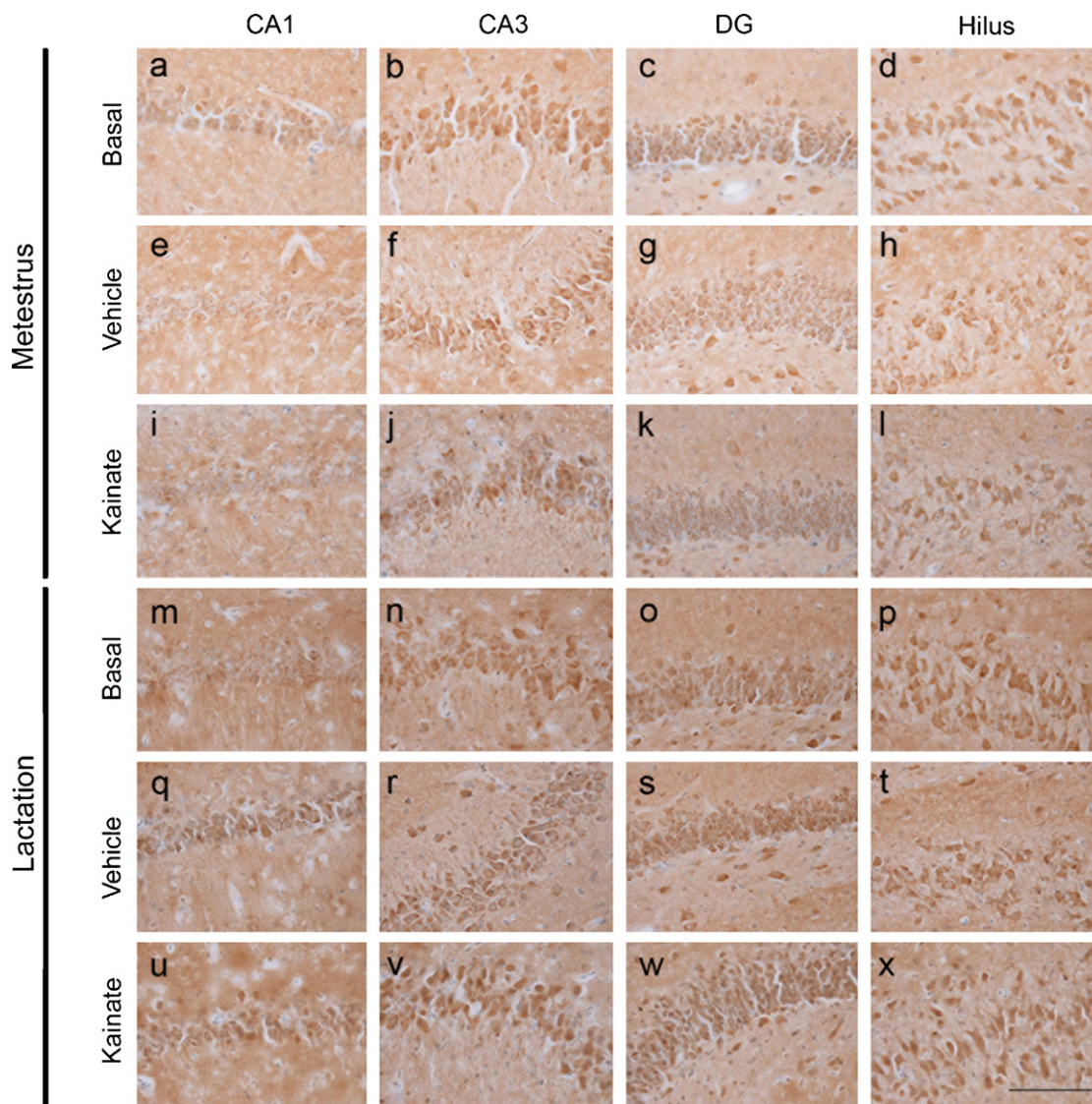


Fig. 4. ER β cellular localization in the hippocampus. ER β protein was detected *in situ* by immunohistochemistry in dorsal hippocampus of virgin (a–l) and lactating (m–x) rats, under basal conditions (a–d; m–p), and after vehicle (e–h; q–t) or kainate (i–l; u–x) administration, in pyramidal cells of CA1 (a, e, i, m, q and u) and CA3 strata (b, f, j, n, r and v) and granular cells of DG (c, g, k, o, s and w) and the hilus region (d, h, l, p, t and x). ER β was found in a perinuclear pattern in virgin rats while in lactating hippocampus, ER β immunoreactivity was detected in the perinuclear region and in axonal projections of pyramidal and granular neurons. ER β was detected in interneuron strata. The localization pattern of ER β in virgin rats was not affected by treatments. In contrast, in the hippocampus of the lactating rats, a relocalization of ER β was observed from a perinuclear pattern to a nuclear and cytoplasmic distribution after kainate treatment. Bar = 100 μ m.

[20], in the present study we sought to evaluate the changes in the expression of estrogen receptors alpha and beta in order to determine their contribution to the neuroprotection observed in lactating animals against kainic acid cell death induction.

Our finding that ER β was significantly increased in hippocampal areas after kainate administration is on-line with previous observations about the important role of this receptor in this brain region. Although both ER α and ER β are involved in mechanisms leading to estrogen-inducible neuronal responses, it has been demonstrated that they exhibit different signaling responses. The recent and important work of Zhao and Brinton, demonstrated that there is a greater potentiation of physiological glutamate-induced increase in intracellular Ca²⁺ exerted by an ER β -selective agonist, suggesting that ER β may be more involved than ER α in promoting mechanisms that modulate estrogen-inducible neuronal morphological plasticity and memory function [25]. This finding is also consistent with a number of *in vivo* animal observations, which demonstrate the important role of ER β in regulating neurogenesis and brain development [26–28].

In other brain injury models, such as ischemia, it has been demonstrated that estrogen receptors mediate neuroprotection. Interestingly, Cimaresti et al. [29] reported changes in the expression of ER α and ER β in rat organotypic hippocampal slice cultures treated with estradiol and subsequently exposed to oxygen–glucose deprivation (OGD). The levels of ER α protein were significantly reduced after OGD in both vehicle- and estradiol-treated cultures, whereas ER β was significantly up-regulated in the estradiol-treated cultures. These findings suggest that estrogen-induced neuroprotection against ischemia might involve regulation of ER β , and consequently, of the genes influenced by this receptor. In a very similar way, in the present study we found that while ER α presented only small changes in expression after treatment with kainic acid in the hippocampus of normal and lactating rats, ER β was significantly up-regulated in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus of lactating rats after kainic acid exposure, highlighting the importance of this protein in neuroprotection processes. Furthermore, the major finding of the present work was the fact that ER β presented a relocation from cytoplasm to the nucleus in different areas of the

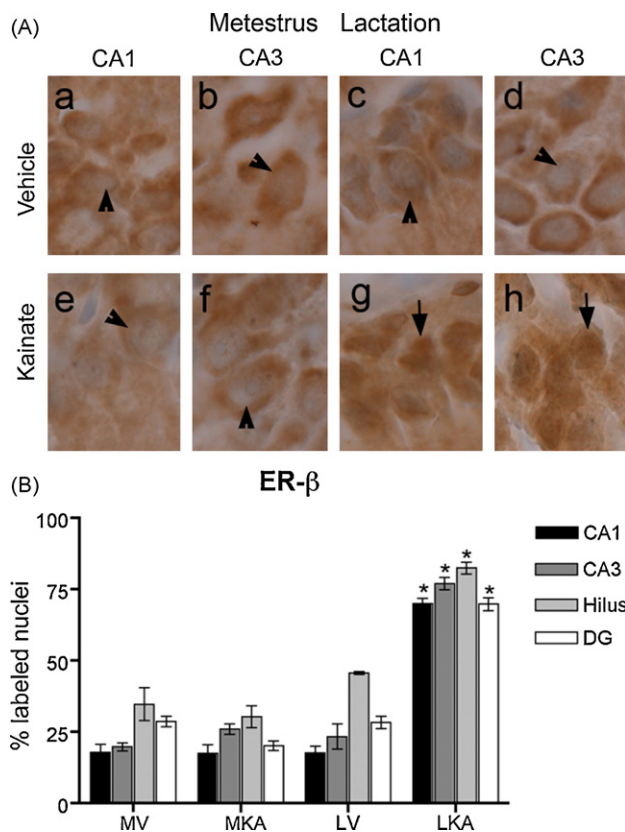


Fig. 5. Relocation of ER β in hippocampal neurons. (A) Hippocampus of metestrus rats showed preferential cytoplasmic localization of ER β protein in the principal strata of hippocampal regions (a and b), and the treatment with kainate did not affect distribution of the ER β protein (e and f). The hippocampus of lactating rats showed cytoplasmic distribution in the soma of pyramidal, granular and hilar neurons of the CA1, CA3 and DG regions (e and f). Interestingly, positive neurons for nuclear ER β immunoreactivity increased significantly after 24 h of kainic acid administration (g and h). (B) Percentage of positive neurons for nuclear ER β immunoreactivity in CA1, CA3, hilus and DG regions of metestrus (M) and lactating (L) rats. Vehicle (V) vs. kainate (KA) treatment: * $p < 0.001$. Arrowheads indicate cells with cytoplasmic staining; arrows indicate cells with nuclear staining.

hippocampus in the lactating rats after kainic acid administration, indicating the possibility that ER β may acquire some new functions during excitotoxicity (Fig. 5).

Furthermore, other studies on estrogen-mediated neuroprotection in the hippocampus of post-ischemic adult macaque monkeys showed that ER α was present in control CA1 pyramidal neurons, decreasing after ischemia. In contrast, ER β immunoreactivity increased remarkably in the radiate and molecular layers of the CA1, where it was present in astrocytes and microglia. ER α was negligible in both control and post-ischemic monkeys. These results suggest that ER β is the major receptor responsible for the direct estrogen actions on the monkey hippocampus [30].

The Bcl-2 protein family has been implicated in the regulation of apoptosis [31]. Bcl-2 is the main antiapoptotic protein, and it has been shown to be involved in maintaining cellular viability in the brain [32]. Early observations about the role of Bcl-2 expression in experimental brain injury models were described by Nakamura [33]. The neuroprotective actions of ER α and more recently of ER β in neuroprotective models include regulation of Bcl-2 protein expression [34,35]. Recent results from our group showed increased Bcl-2 immunolabeling in CA1 in the hippocampus, cerebral cortex (Ctx), and piriform cortex (Pyr ctx) in lactating rats suggesting that Bcl-2 protein participates in the protection against damage induced by KA [21]. However, more studies are necessary to confirm this observation and to determine the role of estrogens in this pathway.

The overall results of our study indicate that changes in the expression and relocalization of ER β from the cytoplasm to the neuronal nucleus, occurring during excitotoxicity by kainic acid treatment in lactating rats, may be involved in neuroprotection observed in the hippocampus, and further support the idea that this receptor plays a major role in neuroprotection in this brain region.

Acknowledgements

This work was performed with partial financial support from, The National Council of Science and Technology (CONACYT), and PAPIIT, PAIP programs from the National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico.

References

- [1] N. Heldring, A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Ström, E. Treuter, M. Warner, J.A. Gustafsson, Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets, *Physiol. Rev.* 87 (3) (2007) 905–931.
- [2] B.S. McEwen, Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms, *J. Appl. Physiol.* 91 (6) (2001) 2785–2801.
- [3] L. Björnström, M. Sjöberg, Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes, *Mol. Endocrinol.* 19 (4) (2005) 833–842.
- [4] C. Behl, Oestrogen as a neuroprotective hormone, *Nat. Rev. Neurosci.* 3 (2002) 433–442.
- [5] L. Zhao, S. Chen, J. Ming Wang, R.D. Brinton, 17 β -estradiol induces Ca²⁺ influx, dendritic and nuclear Ca²⁺ rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neuroprotection, *Neuroscience* 132 (2005) 299–311.
- [6] M.J. Kelly, J. Qiu, O.K. Rønnekleiv, Estrogen modulation of G-protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1007 (2003) 6–16.
- [7] C.S. Woolley, Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus, *Horm. Behav.* 34 (2) (1998) 140–148.
- [8] P. Tanapat, N.B. Hastings, A.J. Reeves, E. Gould, Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat, *J. Neurosci.* 19 (14) (1999) 5792–5801.
- [9] S.J. Lee, B.S. McEwen, Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41 (2001) 569–591.
- [10] M. Segal, D. Murphy, Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates, *Horm. Behav.* 40 (2) (2001) 156–159.
- [11] H.E. Scharfman, N.J. MacLusky, Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue? *Trends Neurosci.* 28 (2) (2005) 79–85.
- [12] A. Verrotti, G. Latini, R. Manco, M. De Simone, F. Chiarelli, Influence of sex hormones on brain excitability and epilepsy, *J. Endocrinol. Invest.* 30 (9) (2007) 797–803.
- [13] S.M. Fernandez, M.C. Lewis, A.S. Pechenino, L.L. Harburger, P.T. Orr, J.E. Gressack, G.E. Schafe, K.M. Frick, Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors, *J. Neurosci.* 28 (35) (2008) 8660–8667.
- [14] D.A. Keefer, W.E. Stumpf, M. Sar, Estrogen-topographical localization of estrogen-concentrating cells in the rat spinal cord following 3H-estradiol administration, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143 (2) (1973) 414–417.
- [15] P.J. Shughrue, M.V. Lane, P.J. Scrimo, I. Merchenthaler, Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract, *Steroids* 63 (10) (1998) 498–504.
- [16] R.E. Papka, M. Storey-Workley, P.J. Shughrue, I. Merchenthaler, J.J. Collins, S. Usip, P.T. Saunders, M. Shupnik, Estrogen receptor-alpha and beta-immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord, *Cell Tissue Res.* 304 (2) (2001) 193–214.
- [17] I. Merchenthaler, T.L. Dellovade, P.J. Shughrue, Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1007 (2003) 89–100.
- [18] G.E. Hoffman, I. Merchenthaler, S.L. Zup, Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease, *Endocrine* 29 (2) (2006) 217–231.
- [19] M.C. Morale, P.A. Serra, F. L'episopo, C. Tirollo, S. Caniglia, N. Testa, F. Genunso, G. Giaquinta, G. Rocchitta, M.S. Desole, E. Miele, B. Marchetti, Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration, *Neuroscience* 138 (3) (2006) 869–878.
- [20] D. Amantea, R. Russo, G. Bagetta, M.T. Corasaniti, From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens, *Pharmacol. Res.* 52 (2) (2005) 119–132.
- [21] A. Vanoye-Carlo, T. Morales, E. Ramos, A. Mendoza-Rodríguez, M. Cerbón, Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat, *Horm. Behav.* 53 (1) (2008) 112–123.

- 409 [22] J. Brusco, R. Wittman, M.S. de Azevedo, A.B. Lucion, C.R. Franci, M. Giove-
410 nardi, A.A. Rasia-Filho, Plasma hormonal profiles and dendritic spine density
411 and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidence by light
412 microscopy, of virgin and postpartum female rats, *Neurosci. Lett.* 438 (3 (June))
413 (2008) 346–350.
- 414 [23] C.L. Thompson, S.D. Pathak, A. Jeromin, L.L. Ng, C.R. MacPherson, M.T. Mortrud,
415 A. Cusick, Z.L. Riley, S.M. Sunkin, A. Bernard, R.B. Puchalski, F.H. Gage, A.R. Jones,
416 V.B. Bajic, M.J. Hawrylycz, E.S. Lein, Genomic anatomy of the hippocampus,
417 *Neuron* 60 (6) (2008) 1010–1021.
- 418 **Q2** [24] C.A. Peto, C. Arias, W.W. Vale, P.E. Sawchenko, Ultrastructural localization of
419 the corticotropin-releasing factor-binding protein in rat brain and pituitary, *J.*
420 *Comp. Neurol.* 413 (2) (1999) 241–254.
- 421 [25] L. Zhao, R.D. Brinton, Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate
422 intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen
423 neuroprotection in hippocampal neurons, *Brain Res.* 1172 (2007) 48–59.
- 424 [26] E.F. Rissman, A.L. Heck, J.E. Leonard, M.A. Shupnik, J.A. Gustafsson, Disruption
425 of estrogen receptor beta gene impairs spatial learning in female mice, *Proc.*
426 *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (6) (2002) 3996–4001.
- 427 [27] L. Wang, S. Andersson, M. Warner, J.A. Gustafsson, Estrogen receptor (ER)beta
428 knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the
429 developing brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2) (2003) 703–708.
- 430 [28] K. Pettersson, J.A. Gustafsson, Role of estrogen receptor beta in estrogen action,
431 *Annu. Rev. Physiol.* 63 (2001) 165–192.
- 432 [29] H. Cimarosti, I.R. Siqueira, L.L. Zamin, M. Nassif, R. Balk, R. Frozza, C. Dalmaz, C.A.
433 Netto, C. Salbego, Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol
434 replacement in rat hippocampal slices exposed to oxygen–glucose deprivation,
435 *Neurochem. Res.* 30 (4) (2005) 583–589.
- 436 [30] N. Takahashi, A.B. Tonchev, K. Koike, K. Murakami, K. Yamada, T. Yamashima,
437 M. Inoue, Expression of estrogen receptor-beta in the postischemic monkey
438 hippocampus, *Neurosci. Lett.* 369 (1) (2004) 9–13.
- 439 [31] J.J. Shacka, K.A. Roth, Regulation of neuronal cell death and neurodegeneration
440 by members of the Bcl-2 family: therapeutic implications, *Curr. Drug Targets*
441 *CNS Neurol. Disord.* 4 (2005) 25–39.
- 442 [32] K.I. Strauss, R.K. Narayan, R. Raghupathi, Common patterns of bcl-2 family
443 gene expression in two traumatic brain injury models, *Neurotox. Res.* 6 (2004)
444 333–342.
- 445 [33] M. Nakamura, R. Raghupathi, D.E. Merry, U. Scherbel, K.E. Saatman, T.K. Mcin-
446 tosh, Overexpression of Bcl-2 is neuroprotective after experimental brain injury
447 in transgenic mice, *J. Comp. Neurol.* 412 (1999) 681–692.
- 448 [34] L. Zhao, T.W. Wu, R.D. Brinton, Estrogen receptor subtypes alpha and beta
449 contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hip-
450 pocampal neurons, *Brain Res.* 1010 (2004) 22–34.
- 451 [35] T.W. Wu, J.M. Wang, S. Chen, R.D. Brinton, 17Beta-estradiol induced Ca²⁺ influx
452 via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element
453 binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neu-
454 rons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection,
455 *Neuroscience* 135 (2005) 59–72.

UNCORRECTED PROOF