

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**“RESPUESTA GLIAL INDUCIDA POR DAÑO EXCITOTÓXICO EN
EL HIPOCAMPO DE LA RATA LACTANTE”**

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta:

Biól. Verónica Rosario Cabrera Pedraza

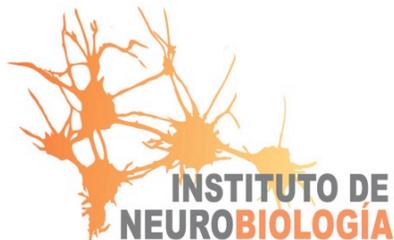
DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María Teresa Morales Guzmán

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Dra. Brenda Anguiano Serrano



Campus Juriquilla, Querétaro 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por: Verónica Rosario Cabrera Pedraza cuyo título es: “Respuesta glial inducida por daño excitotóxico en el hipocampo de la rata lactante” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Secretario (Tutor):

Dra. Ma. Teresa Morales Guzmán.

Vocal:

Dra. Luz Torner Aguilar.

Suplente:

Brenda Anguiano Serrano.

Suplente:

Verónica Rodríguez Córdova.

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Teresa Morales Guzmán

Coordinador del Programa

RESUMEN

El cerebro de la rata hembra ha sido objeto de estudio de diferentes procesos de neuroplasticidad que ocurren en las distintas etapas reproductivas. La lactancia es la última fase del ciclo reproductivo de los mamíferos y durante esta etapa se presentan una serie de adaptaciones en el cerebro de la madre que le permiten contender con las necesidades propias y de sus crías.

El objetivo de este trabajo fue investigar las respuestas glial y microglial causadas por la aplicación intracerebral de ácido kaínico (KA) (100 ng/1µl de KA) ó de solución salina fisiológica (1 µl de NaCl 0.9%), 24 ó 72 h en áreas del hipocampo (CA1, CA3, y giro dentado) de ratas lactantes y nulíparas, y determinar si existía una relación entre las respuestas glial y microglial determinando la magnitud de la inflamación en ambas condiciones reproductivas.

Mediante la detección por inmunohistoquímica de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP), un marcador de astrocitos, demostramos que ratas en período de lactancia y en condiciones basales se incrementa el número de astrocitos positivos a GFAP en el *hilus* del giro dentado y se presentan cambios morfológicos que incluyen un aumento en el número de los procesos astrocíticos y en el tamaño de su soma. Sin embargo, solo el tratamiento prolongado con KA (72h) induce respuesta astrocítica en el *hilus* del giro dentado, pero no en las demás áreas analizadas.

En las ratas nulíparas expuestas al KA 24 y 72 horas hubo inducción de gliosis en las áreas CA1, CA3 e *hilus* del giro dentado del hipocampo, pero no en condiciones basales.

La inmunodetección de la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1), expresada en la microglía activada durante la respuesta inflamatoria, nos permitió determinar la falta de respuesta microglial al KA en las áreas CA1, CA3, e *hilus* del giro dentado del hipocampo en ratas lactantes tanto en condiciones basales como en las que fueron tratadas con KA 24 y 72 horas. Mientras que en ratas nulíparas, tratdas con KA 24 ó 72 h se indujo un aumento significativo de microglía reactiva

con respecto a su control correspondiente en cada una de las áreas analizadas del hipocampo.

Estos datos indican que la lactancia modifica la magnitud de la lesión causada por KA en el hipocampo, y en consecuencia la respuesta astrocítica e inflamatoria microglial evitando así, la gliosis reactiva. El aumento de células GFAP-positivas en el giro dentado de ratas lactantes no se relaciona con la respuesta microglial y sugiere un posible fenómeno de plasticidad en esta área inducido por la maternidad.

SUMMARY

The brain of the female rat has been a model of brain neuroplasticity that occurs throughout the different reproductive stages. Lactation is the last phase of the reproductive cycle of mammals, in which occurs a series of adaptations in the brain of the mother to allow her to contend with her own needs and those of the offspring.

The aim of this study was investigate the glial and microglial responses caused by the intracerebral application of kainic acid (KA) (100 ng/1µl KA or 1 µl of vehicle, i.c.v., 24 or 72 h) in the hippocampus (CA1, CA3, and dentate gyrus areas) in lactating and nulliparous rats, and to determine whether a relationship exists between the two responses to find the extention of inflammation in both reproductive conditions.

By the immunohistochemical detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of astrocytes, we demonstrated that treatment with KA induced gliosis in CA1, CA3 and *hilus* of the dentate gyrus of the hippocampus of nulliparous rats after 24 or 72 hours. However, in lactating rats, only prolonged treatment with KA (72 h) induced astrocytic response in the *hilus* of the dentate gyrus, but not in the other analyzed areas. In addition, lactation increased the number of GFAP-positive astrocytes in the *hilus* of the dentate gyrus and induced morphological changes that include the increase in the number of astrocytic processes and in the size of their soma.

Immunodetection of ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), expressed in activated microglia during the inflammatory response, allowed us to determine the lack of microglial response to KA in the areas CA1, CA3, and *hilus* of the dentate gyrus of the hippocampus in lactating rats. While in each of the analyzed areas in the hippocampus of nulliparous rats, the KA induced a significant increase in the number of Iba1-positive cells with respect to the corresponding control, and after 24 or 72 h. These data indicate that lactation diminished the size of the lesion caused by KA in the hippocampus, and consequently the astrocytic and inflammatory microglial response. The increase in GFAP-positive cells in the

dentate gyrus of lactating rats is not associated with microglial response, suggesting a phenomenon of plasticity in this area induced by motherhood.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla-Querétaro bajo la supervisión de la Dra. María Teresa Morales Guzmán y el Comité Tutor integrado por la Dra. Brenda Anguiano Serrano y el Dr. Ataúlfo Martínez Torres quienes semestre a semestre aportaron ideas y me ayudaron a disipar dudas tanto académicas como técnicas. Además, agradezco infinitamente la calidad ética y humana que tuvieron siempre conmigo.

La ayuda técnica para la realización de esta tesis estuvo a cargo de la Lic. Ma. Eugenia Ramos quien con su gran dedicación y conocimiento, aportó ideas y consejos sobre las técnicas de inmunohistoquímica realizadas en este trabajo.

A la laboratorista Asucena Ortega, gracias por ayudar a mejorar nuestro espacio haciéndolo práctico para la realización de los experimentos tanto en el laboratorio como en el bioterio.

A la Ing. Nydia Hernández por su invaluable apoyo en la Unidad de Microscopía del INB, por su trato siempre amable, disposición y gran capacidad para resolver dudas.

Al MVZ Martín García Servín y al personal del Bioterio del INB.

Agradezco también a la M. en C. Leonor Casanova Rico por su apoyo administrativo y personal en el programa de Maestría en Ciencias Neurobiología del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Agradezco a los miembros del jurado de examen quienes ayudaron a mejorar las ideas escritas en este trabajo.

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dra. Verónica Rodríguez Córdova

Dra. Luz Torner Aguilar

Dra. Teresa Morales Guzmán

Dra. Brenda Anguiano Serrano

Este trabajo de tesis tuvo apoyo financiero de los donativos de DGAPA PAPIIT-UNAM IN-204709 y CONACYT 51044. La autora contó con beca de posgrado CONACYT 233854.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Ode to my family:

Gracias a mi familia: a mi padre, a mi madre quienes no solo me dieron la vida, me llenaron de vida, me educaron con la convicción de aportarle algo bueno a mi país y a mi sociedad. Gracias por enseñarme que cada acción impacta en mi entorno y que con estas lo puedo mejorar. Gracias por enseñarme el camino de la vida real, nunca el cuento de hadas. Gracias por ser mis mas grandes ejemplos de vida, porque gracias a ustedes soy lo que soy y no hubiera podido llegar hasta aquí sin sus consejos y aquellas llamadas de atención cuando flaqueaba. Gracias por su amor incondicional.

Gracias a mis hermanos Nacho y Paco, a quienes admiro tanto, pues ellos son mis consejeros y cómplices de todas mis locuras y travesuras, cómplices de risas, llantos y alegría desmedida, gracias por ser parte de mi vida, ustedes son los mejores, lo mejor que tengo en la vida, mi motor para seguir siempre adelante. Gracias, porque además, compartimos esta asombrosa carrera llena de maravillas y cosas por descubrir... y ya estamos en el camino mis queridos colegas.

Gracias a toda mi familia, sobre todo porque me aman incondicionalmente, sin importar qué haga o dónde vaya. Son el motor de mi vida, los amo. *'Cause we were raised to see life as fun and take it if we can'*.

With a Little help from my friends:

Gracias a mis amigos quienes a pesar de la distancia y el tiempo, nos seguimos frecuentando y aun nos emociona ver los logros de cada uno: Adrián, Suyin, Paco, David, Coco, Miguel, Mario, Pipis, Adri, Katy, Marisol, Alma, etc. Los llevo en mi corazón son parte de mi vida y con ustedes escribí una hermosa historia llena de emociones, con quienes aprendí y me formé en la escuela de la vida.

A mis nuevos (aunque no tan nuevos) amigos que conocí en esta etapa de posgrado, gracias por su amistad, apoyo académico, sus consejos, las fiestas, las risas, la confianza, los malos momentos y como después nos reímos de ellos. Sin ustedes la maestría no tendría el buen sabor que esta etapa me deja: M. en C. Daniel Morales y M. en C. Guillermo Coronas: *'Dooooon't let me down!'*. Así como al M. en C. Ernesto Flores y a la M. en C. Terencia Tirado gracias por su ayuda y por todos los buenos momentos.

A la estudiante de Medicina Montserrat Ruiz quien apoyó con gran dedicación el conteo de microglía, muchas gracias.

A Candy Ramirez gracias por todos los consejos que me diste para llevar mejor las materias de Neurobiología.

A mis compañeras del laboratorio, que es mi tercer hogar, gracias por compartir conmigo aquellas cosas que van más allá de lo académico, gracias por mostrarme que la vida puede llegar hasta donde nosotros la deseemos llevar: Asucena, Maru, Nela, Tere ustedes han sido mis verdaderas maestras, son para mí un ejemplo de vida, las admiro y creo que el mundo necesita más personas como ustedes.

Por supuesto agradezco a todos y cada uno de mis compañeros de grupo, por su apoyo y por la buena compañía en las clases, en las prácticas y fuera de estas.

A mis *roomies*, que son mi segunda familia, pues bajo el mismo techo tuvimos sueño, hambre, frío, calor, desvelo, pero también tuvimos sueños, una mesa compartida, un abrazo cálido y esa mano tendida para resolverlo y disfrutarlo todo como una verdadera familia: Carlos, Roco, Vale, Ada, Caro, Lulú, Omar, etc. los quiero mucho, gracias por ayudarme a hacer mi vida más llevadera y muy feliz durante este período.

Y a todos los que no mencioné en esta lista (por falta de espacio) sepan, de antemano, que los llevo en mi corazón.

*"La ciencia es el fundamento de todo progreso,
que mejora la vida humana y alivia el sufrimiento."*

*Irene Joliot-Curie.
Premio Nobel en Química, 1935.*

*"Siempre pensé que la mujer estaba destruida porque
el hombre imponía su poder por la fuerza física y no por la mental.
Y con la fuerza física puedes ser maletero, pero no un genio. Lo pienso todavía"*

*Rita Levi-Montalcini
Premio Nobel en Medicina, 1986.*

ÍNDICE

i. RESUMEN	iii
ii. SUMMARY	v
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 CÉLULAS ASTROGLIALES Y MICROGLIALES EN EL CEREBRO ..	2
I.1.1 RESPUESTA GLIAL	4
I.1.2 RESPUESTA MICROGLIAL	4
I.1.3 RESPUESTA ASTROCÍTICA	5
I.2 MODELO DE DAÑO EXCITOTÓXICO	5
I.3 DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES TIPO KAINATO (KARs) EN EL HIPOCAMPO	7
I.4 RECEPTORES A GLUTAMATO EN LAS CÉLULAS GLIALES DEL HIPOCAMPO	8
II. ANTECEDENTES	10
II.1 LA LACTANCIA EN LA RATA	10
II.2 CAMBIOS EN LA RESPUESTA A AMINOÁCIDOS EXCITADORES DURANTE LA LACTANCIA	11
II.3 NEUROPROTECCIÓN DURANTE LA LACTANCIA	11
II.4 REMODELACIÓN ANATÓMICA DURANTE LA LACTANCIA	13
II.5 FLUCTUACIÓN DE LA PROTEÍNA ACÍDICA FIBRILAR GLIAL (GFAP) EN EL HIPOCAMPO	15
II.6 ÁCIDO KAÍNICO Y RESPUESTA GLIAL	17
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	20
V.1 OBJETIVO GENERAL	20
V.2. OBJETIVOS PARTICULARES	20
VI. METODOLOGÍA	21
VI.1 ANIMALES	21
VI.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	21

VI.3 HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	23
VI.4 ANÁLISIS DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN.....	25
VI.4.1 CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS.....	25
VI.4.2 ANÁLISIS DE SHOLL.....	25
VI.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
VII. RESULTADOS.....	28
VII.1 ASTROCITOS.....	28
VII.1.2 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	34
VII.2 MICROGLIA.....	38
VIII. DISCUSIÓN.....	41
VIII.1 RESPUESTA ASTROCÍTICA.....	42
VIII.1.2 MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS.....	46
VIII.2 RESPUESTA MICROGLIAL.....	47
IX. CONCLUSIONES.....	50
X. REFERENCIAS.....	51

I. INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, el cerebro de las hembras experimenta una serie de adaptaciones asociadas con la reproducción que les permite satisfacer sus propias demandas y las de su cría. Entre tales adaptaciones, destaca la plasticidad en el hipotálamo (Wang y Hatton, 2009; Lightman, 2001). Sin embargo, además de las estructuras clásicas directamente involucradas en la regulación neuroendocrina y la conducta materna, en años recientes se le ha dado un gran interés a los cambios funcionales y morfológicos que ocurren durante el embarazo y la lactancia en áreas en las que se presentan fenómenos de plasticidad, como el hipocampo (Kinsley y Lambert, 2008).

El término 'plasticidad cerebral' se define como una propiedad intrínseca del SNC permanente que implica una serie de cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren en el cerebro en respuesta a modificaciones en la señal aferente o en la respuesta motora (eferente). Dicha plasticidad puede ser vista por cambios entre relaciones funcionales tanto en neuronas como en células gliales. El establecimiento de nuevas conexiones por crecimiento dendrítico y arborización puede seguir a cambios rápidos y dinámicos y constituye así un mecanismo de desarrollo, crecimiento y aprendizaje (Pascual-Leone, 2005). En este sentido, la lactancia representa una fase en la cual las señales internas generan una reorganización del sistema que es mantenido por la información aferente y resulta en respuestas adaptativas eferentes.

La neuroplasticidad en el hipocampo, como resultado de la maternidad, incluye un sin número de cambios morfológicos, fisiológicos y conductuales. Debido a que durante el embarazo existe una interacción significativa entre las hormonas del embarazo y el cerebro se sabe que dicha exposición natural a las hormonas durante esta etapa afecta la morfología neuronal del hipocampo en ratas gestantes y lactantes, estos cambios se han visto en el número, tamaño y tipo de las espinas dendríticas; aunque también se ha observado este fenómeno en animales durante el ciclo estral (Diamond et al., 1971). Además, estos cambios ocurridos durante la gestación y la lactancia parecen conferir protección y

adaptabilidad ante factores de daño tales como: excitotoxicidad, estrés o envejecimiento, lo cual sugiere un fenómeno de neuroprotección en el cerebro de la rata madre (Vanoye-Carlo et al., 2008; Cabrera et al., 2009).

Actualmente nuestro laboratorio está investigando los posibles mecanismos implicados en el fenómeno de neuroprotección contra daño excitotóxico en el hipocampo de la rata lactante, entre los cuales se le ha atribuido una gran importancia al cambio en el patrón hormonal que la hembra manifiesta durante la lactancia.

Aunque los estudios sobre los efectos de las hormonas sexuales en el cerebro se han centrado principalmente en las neuronas, las células gliales también son blanco de las hormonas sexuales y pueden mediar parte de los efectos de estas hormonas sobre el cerebro.

Las células de la glía son necesarias para la supervivencia y la función neuronal y su disfunción está implicada en numerosas patologías, mientras que la modulación de su actividad permite controlar la respuesta regenerativa del sistema nervioso cuando ha ocurrido daño o lesión. En este trabajo de tesis hemos profundizado en el análisis de dos de estos tipos celulares de la glía, los astrocitos y la microglía en el hipocampo de ratas en el período de lactancia (madres) usando el modelo de daño excitotóxico por ácido kaínico (KA).

I.1 CÉLULAS ASTROGLIALES Y MICROGLIALES EN EL CEREBRO

La proporción de neuronas y de células gliales en el cerebro varía entre las diferentes especies (aprox. 10:1 en la mosca doméstica, 1:1 en el cocodrilo y 1:10 en humanos). Estas células han seguido un desarrollo filogénico y ontogénico diferente al de las neuronas, además, tienen una atractiva característica que difiere de las neuronas: su capacidad mitótica aún en organismos adultos.

Durante mucho tiempo las células gliales fueron consideradas un simple soporte de la estructura del tejido nervioso; sin embargo, hoy en día, el concepto sobre sus funciones en el cerebro ha cambiado y se les atribuye una participación más activa en la modulación y transmisión de las señales nerviosas. Por su morfología, las

células gliales se distinguen como células macrogliales (astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias) y las células microgliales (entre el 10 y el 15% de la glía) (Fig. 1). A continuación se profundizará en la información sobre los astrocitos y la microglía.

Los astrocitos son las principales y más numerosas células gliales, sobre todo en los organismos vertebrados más recientes. Estas células tienen linaje neuroectodérmico y participan en un elevado número de funciones clave para la realización de la actividad nerviosa. Derivan de las células encargadas de dirigir la migración de precursores durante el desarrollo (glía radial) y se originan en las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso central. Además, durante el desarrollo embrionario, la glía radial es precursora de las neuronas y dirigen su migración (Wang y Bordey, 2008).

En el organismo adulto, los astrocitos proporcionan el soporte nutricional y trófico a las neuronas vecinas, modulando su actividad sináptica mediante la regulación de los niveles extracelulares de iones, neurotransmisores y la liberación de transmisores. Además, se ha visto que participan en la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal regulando el crecimiento de neuritas.

Las células microgliales se encargan de controlar la homeostasis del tejido normal, para lo cual reciben señales de las neuronas que las mantienen en estado de reposo. La microglía constituye el sistema inmune del cerebro por su capacidad de respuesta ante daño, lesión, invasión de microorganismos y eliminación de restos celulares reparando y limitando el daño tisular (Perea y Araque 2006, 2007; Theodosis et al., 2008; Nave y Trapp, 2008; Noctor et al., 2007; Kielian, 2008).

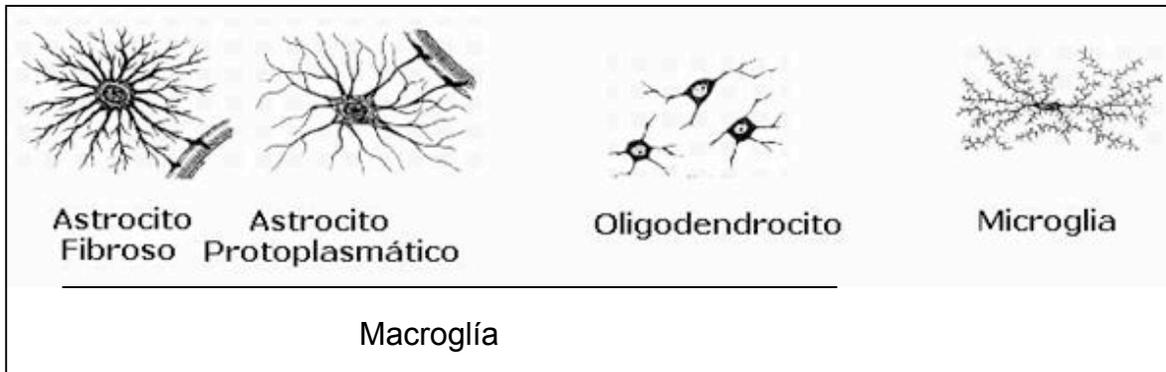


Figura 1. Principales tipos gliales del SNC. (Imagen adaptada del Texto y Atlas de Anatomía Prometheus, volumen 3).

I.1.1 RESPUESTA GLIAL

La respuesta glial implica una serie de eventos rápidos que ocurren después de que en el SNC ha ocurrido algún tipo de daño; dicha respuesta está caracterizada por el reclutamiento de astrocitos y microglía.

Ante cualquier deterioro del tejido nervioso, ya sea en situaciones de lesión traumática, neurodegeneración e incluso envejecimiento, la glía posee la capacidad de responder presentando cambios morfológicos y funcionales acompañados de la producción de citocinas pro-inflamatorias, lo que se denomina como “gliosis reactiva o glía activada” (Raivich et al., 1999). Además, esta respuesta implica el reclutamiento y coactivación de células inmunitarias procedentes de la sangre.

Por lo tanto, la astrogliosis y la microglía son las dos poblaciones principales de células gliales reactivas (Streit et al., 1999).

I.1.2 RESPUESTA MICROGLIAL

Cuando ocurre una lesión, la primera célula en activarse es la microglía, la cual secreta diversos factores responsables de la activación astrogliosis tales como las citocinas proinflamatorias e inflamatorias, además de eliminar restos celulares por fagocitosis. Estos procesos se asocian con una proliferación creciente de la microglía reactiva que deriva de los progenitores residentes presentes en la médula ósea, por lo que la microglía residente puede delimitar el daño, remover

los restos celulares y moléculas neurotóxicas y restaurar el entorno para la reparación celular. De esta forma, las consecuencias que conlleva la activación de la microglía supone un potente mecanismo neuroprotector en presencia de excitotoxinas (Simard y Rivest, 2007).

No obstante este carácter protector de la respuesta de activación aguda de la microglía, el efecto de estas células puede ser nocivo en los casos de activación crónica (Akiyama et al., 2000; McGeer y McGeer, 2001), y que puede resultar a largo plazo en daño neuronal.

I.1.3 RESPUESTA ASTROCÍTICA

La activación de la glia astrocítica o astrocitaria, también responde rápidamente a diversos traumas, ya que es posible detectar la respuesta de estas células a partir de la siguiente hora después del daño. Su activación se caracteriza por hipertrofia, proliferación de este tipo celular (cuyo aumento sugiere que las células progenitoras en el hipocampo pueden proliferar después de un daño o una crisis convulsiva), extensión de sus prolongaciones y sobre-expresión de filamentos intermedios como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que en ocasiones tienden a asumir una orientación irregular para rellenar las cavidades producidas por el trauma. Además, se presenta un aumento en la expresión de otras moléculas que incluyen factores de crecimiento y sus receptores, citocinas, eicosanoides, moléculas de adhesión y enzimas implicadas en diferentes funciones para mediar la reparación del tejido (Edleston y Mucke, 1993; Ridet et al., 1997).

I.2 MODELO DE DAÑO EXCITOTÓXICO

La administración sistémica (i.p.) ó intracerebroventricular (i.c.v.) de ácido kaínico (KA) en la rata es ampliamente usada como modelo para estudiar daño y lesión hipocampal, hiperexcitabilidad y epilepsia del lóbulo temporal (TLE), además, también se ha usado recientemente para evaluar la respuesta glial.

Este modelo se fundamenta en el uso de murinos a los cuales se les inyecta por diferentes vías (i.p, i.v, i.c.v) análogos del glutamato que son considerados

excitotoxinas y que al tener acción agonista glutamatérgica, excitan a las neuronas hasta causar daño (Fig. 2).

En efecto, la excitotoxicidad se refiere a la capacidad del glutamato y de compuestos análogos, como el KA, para destruir neuronas a través de la transmisión sináptica prolongada. El ingrediente activo del KA fue originalmente aislado a partir de un alga y era usado como tratamiento herbal contra la ascariasis (Millatovic et al., 2005). Normalmente, la concentración de estos compuestos liberados en la hendidura sináptica se eleva hasta niveles altos (aproximadamente 1 mM), pero se mantiene en esta concentración solo durante algunos milisegundos. Si se acumulan concentraciones anormalmente elevadas en la hendidura, la activación excesiva de los receptores de glutamato puede, literalmente, excitar a las neuronas hasta la muerte (Purves, 2007). Mediante el uso de este modelo, la excitotoxicidad puede ser estimulada mediante la inyección de KA, el cual puede despolarizar neuronas pre y postsinápticas a través de interacciones con receptores ionotrópicos para AMPA y kainato (KAR).

El hipocampo es un área cerebral muy sensible a esta excitotoxina debido a que posee una gran cantidad de receptores de glutamato (GLUR), específicamente de tipo kainato (KARs), los cuales se describen a continuación.

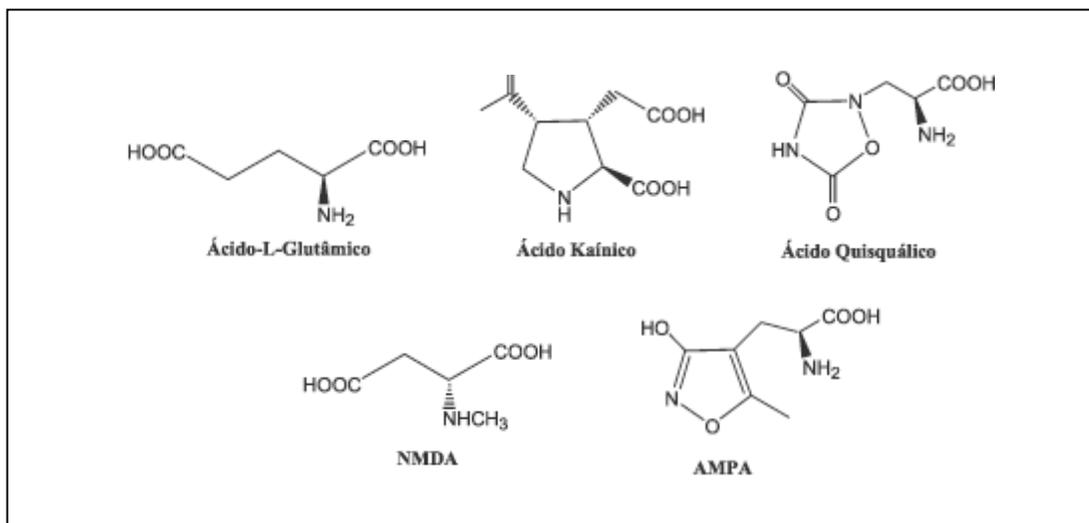


Figura 2. Análogos de Glutamato.

I.3 DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES DE TIPO KAINATO (KARs) EN EL HIPOCAMPO

En 1997, se describió por primera vez que la activación de los receptores de glutamato de tipo kainato (KARs), situados presinápticamente en las terminales de las fibras musgosas, produce una disminución de la liberación del neurotransmisor GABA por diferentes mecanismos de señalización: ionotrópicos (por canales) y metabotrópicos (mediante proteína G); así mismo, la activación de los KAR también participa en la modulación de la liberación de glutamato en diferentes regiones del hipocampo, con un modo de acción presináptico para dicha modulación. Desde entonces esta función ha recibido una enorme atención, pues se consideró que éste podría ser uno de los mecanismos moleculares responsables de desencadenar procesos de excitotoxicidad y alguna forma de epilepsia. Además, algunos estudios de hibridación *in situ* revelaron la distribución de las subunidades del receptor de kainato en el hipocampo, encontrando transcritos de la subunidad GluR6 en el giro dentado y en la región CA3, y de la subunidad KA1 restringida de forma casi exclusiva en la región CA3 y en muy pocas cantidades en el giro dentado (Rodríguez-Moreno, 2003) (Tabla 1).

Ionotrópicos				
non-NMDA		NMDA	Metabotrópicos	
AMPA	kainato			
GluR1	GluR5	NMDAR1	mGluR1	mGluR4
GluR2	GluR6	NMDAR2A	mGluR2	mGluR5
GluR3	GluR7	NMDAR2B	mGluR3	mGluR7
GluR4	KA1	NMDAR2C	mGluR6	mGluR8
	KA2	NMDAR2D		
		NMDAR3		

Tabla 1. Clasificación de las subunidades de los receptores glutamatérgicos.

1.4 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS EN LAS CÉLULAS GLIALES DEL HIPOCAMPO

No solo las neuronas poseen receptores glutamatérgicos. Las células de la glía y las neuronas comparten el mismo tipo de estos receptores, los cuales pueden ser de tipo ionotrópico (iGlu) o metabotrópico (mGlu). Éstos, son sensibles no solo a glutamato sino también a sus análogos, cuya activación regula la apertura de canales iónicos y segundos mensajeros causando la liberación de compuestos neuroactivos. El uso de sistemas *in vitro*, como el de la glía de Bergmann en pollos, aportan evidencias de que el glutamato, sus análogos y sus receptores le confieren a las células gliales la capacidad de recibir y emitir señales participando activamente en la regulación sináptica y plasticidad. Durante la actividad neuronal, la activación de estos receptores se incrementa de forma importante lo cual da la posibilidad de su participación en el procesamiento de la información, plasticidad y también se les ha visto asociados a estados patológicos (Steinhäuser y Gallo, 1996).

Los métodos inmunohistoquímicos, electrofisiológicos y de biología molecular han permitido detectar la expresión de varios tipos de receptores glutamatérgicos en astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Estos receptores se han definido y subdividido de acuerdo con sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas. Los receptores mGlu son proteínas de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G; y los receptores iGlu han sido subdivididos en tres tipos: AMPA, kainato y NMDA. Dado que en este trabajo usamos KA como agente neurotóxico, nos centraremos en los receptores iGlu de tipo kainato.

Las subunidades del iGlu de tipo kainato están codificadas por cinco genes: Glu₅-Glu₇, KA₁ y KA₂. Los receptores ubicados presinápticamente están implicados en la regulación de la liberación de glutamato y de la transmisión dependiente de glutamato en el hipocampo. Su activación causa elevación transitoria de Ca²⁺ intracelular debido al influjo transmembranal de cationes a través de los receptores iGlu permeables a Ca²⁺ y a los canales de Ca²⁺ activados por voltaje. Además se promueve la formación de Ins(1,4,5)P₃ y la liberación de Ca²⁺ de las cisternas

intracelulares que produce reorganización de filamentos de actina y la formación de filopodios (Steinhäuser y Gallo, 1996).

Interesantemente, a pesar de que neuronas y glía comparten estos receptores, en comparación con las neuronas que son extremadamente sensitivas a altas concentraciones de glutamato y otras excitotoxinas, las células de la glía son poco vulnerables al daño que éstas causan. Esta baja sensibilidad está relacionada con diferentes factores, incluyendo las vías de regulación de los niveles intracelulares de iones de calcio y la baja densidad o expresión transitoria de otro tipo de receptores como los NMDA (Teichberg, 1991).

La activación de los GluR en las células gliales también se ha visto asociada con eventos de proliferación y diferenciación celular. La actividad de los canales de K⁺ voltaje-dependientes ha sido asociada con eventos de proliferación celular. Las perturbaciones en el potencial de membrana pueden afectar el estado proliferativo de la glía actuando en concierto con diversos factores de crecimiento. Además permite la expresión de genes tempranos inmediatos como: *fos*, *jun*, *c-myc*, etc. y su expresión depende totalmente de los niveles de Ca²⁺ extracelular durante la estimulación (Steinhäuser y Gallo, 1996).

Debido a la sensibilidad de neuronas y células gliales del hipocampo al glutamato y sus análogos utilizamos este modelo para inducir daño excitotóxico por KA en esta estructura, y así evaluar la respuesta celular ocurrida en esta área durante la lactancia.

II. ANTECEDENTES

II.1 LA LACTANCIA EN LA RATA

Durante el embarazo y la lactancia surgen cambios fisiológicos importantes en los niveles circulantes de hormonas esteroides como el estradiol (E2), progesterona (P4) y corticosterona, así como de los péptidos como la oxitocina (OT), la prolactina (PRL) y la hormona del crecimiento (GH por sus siglas en inglés) (Neville et al., 2002). Además, la madre está sujeta a múltiples estímulos somatosensoriales que inducen cambios en su cerebro.

Los cambios observados en los niveles de estas hormonas durante la lactancia se caracterizan por altos niveles de hormonas tales como P4; OT y PRL mantenidas por el estímulo neurogénico de la succión; GH y corticosterona crónicamente elevada sin ritmo circádico, y bajos niveles de estrógenos.

Las funciones de estas hormonas permiten inducir cambios metabólicos y conductuales, como el incremento de la ingesta de agua y comida, supresión de la fertilidad mediante la baja hormonal de los estrógenos, la inducción de lactogénesis y galactopoiesis por la PRL, así como el reflejo de la evacuación láctea inducida por la OT; además hay un decremento en la respuesta neuroendócrina al estrés y disminución de la conducta tipo ansiedad relacionadas con los altos niveles crónicos de corticosterona.

Además de estas funciones metabólicas y conductuales durante esta etapa reproductiva que permiten el establecimiento de la conducta materna y cuyo tópico ha sido ampliamente estudiado, también se ha observado que estas hormonas juegan un papel muy importante en los fenómenos de plasticidad en el cerebro.

La importancia de estos cambios hormonales radica en el conocimiento de que las hormonas afectan marcadamente la estructura y la función celular en una gran variedad de formas durante la vida, produciendo diferencias cualitativas y cuantitativas en la estructura así como en la función de las células de un gran número de regiones cerebrales (Kinsley et al., 2006).

II.2 CAMBIOS EN LA RESPUESTA A AMINOÁCIDOS EXCITADORES DURANTE LA LACTANCIA

Durante el transcurso del embarazo y la lactancia se producen cambios marcados en la respuesta a los agonistas de los aminoácidos excitadores en el hipocampo materno, reduciendo su número o afinidad a los receptores de glutamato y AMPA/kainato (Abbud et al. 1992). Esta reducción puede llevar a una disminución de la liberación de neurotransmisor (p. ej. glutamato) y a una reducción de la excitabilidad en el hipocampo (Standley, 1999) incidiendo en cambios en la transmisión sináptica (Tomizawa et al., 2003). Estos eventos se han asociado con una disminución de la frecuencia de convulsiones recurrentes espontáneas inducidas por excitotoxinas como el KA (Berzaghi Mda et al., 1987; Standley, 1999). Este fenómeno de baja sensibilidad al glutamato y sus agonistas es dependiente del estímulo neurogénico de la succión (Abbud et al. 1993) y del ambiente hormonal de la lactancia caracterizado por altos niveles de P4 y bajos niveles de estrógenos.

II.3 NEUROPROTECCIÓN DURANTE LA LACTANCIA

Diversos estudios sobre neurodegeneración/neuroprotección realizados en modelos *in vivo* e *in vitro* principalmente en roedores, han documentado que las regiones CA1, CA3 y el *hilus* del giro dentado del hipocampo son particularmente sensibles a la excitotoxicidad inducida por KA (Ben-Ari y Cossart, 2000; Choi, 1992; Frerking y Nicoll, 2000; Palomero-Gallagher et al., 2003). La administración intracerebroventricular (i.c.v.) de dosis bajas crónicas o agudas de KA en el hipocampo resulta en la degeneración de las neuronas piramidales del área CA3 así como de las del giro dentado, lo cual conduce a la reorganización del circuito o circuitos, a la reducción en el número de interneuronas GABAérgicas, y a la pérdida funcional de la inhibición e hiperexcitabilidad en el hipocampo (Shetty y Hattiangady, 2007). Sin embargo, en ratas hembra este fenómeno se ve afectado por el estado reproductivo. Se han reportado variaciones en el grado de sensibilidad al daño que produce el KA, esto ocurre durante y a lo largo del ciclo estral, la gestación y la lactancia e incluso meses después de que esta última

etapa ha terminado, lo cual ha permitido evidenciar la acción hormonal en este fenómeno neuroprotector.

Debido a que la neuroprotección comprende un conjunto de mecanismos fisiológicos de las neuronas y que traen como consecuencia un aumento de su supervivencia, durante los últimos 20 años se han publicado una gran cantidad de trabajos científicos que exploran agentes neuroprotectores potenciales y sus posibles mecanismos de acción (Fiszman, 2003). Potentes agentes neuroprotectores naturales, ampliamente estudiadas son las hormonas (Azcoitia et al., 2001; Ciriza et al., 2004).

Estudios de nuestro grupo previos a este trabajo de tesis, mostraron que la lactancia protege contra los efectos del daño excitotóxico 24 y hasta 72 horas después de una única dosis de KA (100 ng/μl, i.c.v) en las zonas CA1, CA3 y el *hilus* del giro dentado del hipocampo dorsal, áreas bien conocidas por su sensibilidad al glutamato. El tratamiento con KA provoca una importante pérdida de neuronas en ratas vírgenes (~50%). Por el contrario, en ratas lactantes (madres), las regiones CA1, CA3 e *hilus* del giro dentado del hipocampo son significativamente protegidas del daño neuronal inducido por el KA aun después de 72 horas, lo que indica que la lactancia previene y no solo retrasa el daño celular inducido por el kainato (Vanoye-Carlo et al., 2008; Cabrera et al., 2009). Además, Vanoye-Carlo y colaboradores (2008) detectaron mediante la técnica de microarreglos algunos genes involucrados con el mecanismo de neuroprotección, los cuales se relacionan con vías de señalización implicadas en la homeostasis de calcio, como CamK2a, mdk, ywhag. Una observación interesante de este estudio es que aumentan GFAP junto con tiroliberina (TRH) y PRL. Por otro lado, se ha estudiado el efecto de la PRL (Tejadilla et al., 2010) y los cambios en la GH durante este fenómeno de neuroprotección durante la lactancia.

II.4 REMODELACIÓN ANATÓMICA DURANTE LA LACTANCIA

Algunos de los cambios neuronales que sufre el hipocampo en condiciones fisiológicas durante el embarazo tardío y la lactancia incluyen: incremento en el número de espinas dendríticas (Pawluski y Galea, 2006; Kinsley et al., 2006), reducción de la tasa de neurogénesis en el hipocampo, y cambios importantes en el aprendizaje y la memoria (Kinsley et al., 1999; Pawluski y Galea., 2006; Gatewood et al., 2005).

En condiciones donde hay una gran estimulación de neurohipofisaria, tales como la lactancia, el parto y la deshidratación crónica, el sistema hipotálamo-neurohipofisario también presenta una notable remodelación anatómica y funcional de las neuronas, sin embargo, esta remodelación anátomo-funcional no es exclusiva de neuronas, también ha sido observada en células gliales (Bonfardin et al., 2010).

La remodelación anatómica que sufre la glía durante estas condiciones reproductivas reportada en el hipotálamo en condiciones fisiológicas normales, se caracteriza por una reducción pronunciada de la extensión de los procesos astrocíticos que se encuentran rodeando a las neuronas oxitocinérgicas para permitir el disparo sincronizado de dichas neuronas durante la evacuación láctea (Theodosis, 2002). Otra de las consecuencias de esta retracción glial es una deficiencia en la depuración de glutamato en los sitios perisinápticos resultando en aumento de los niveles de glutamato extracelular (Oliet et al., 2001; Boudaba et al. 2003). Esto sugiere que la plasticidad fisiológica de los astrocitos modifica el modo de acción presináptica de los KARs invirtiendo su acoplamiento con la liberación de GABA (Bonfardin et al., 2010).

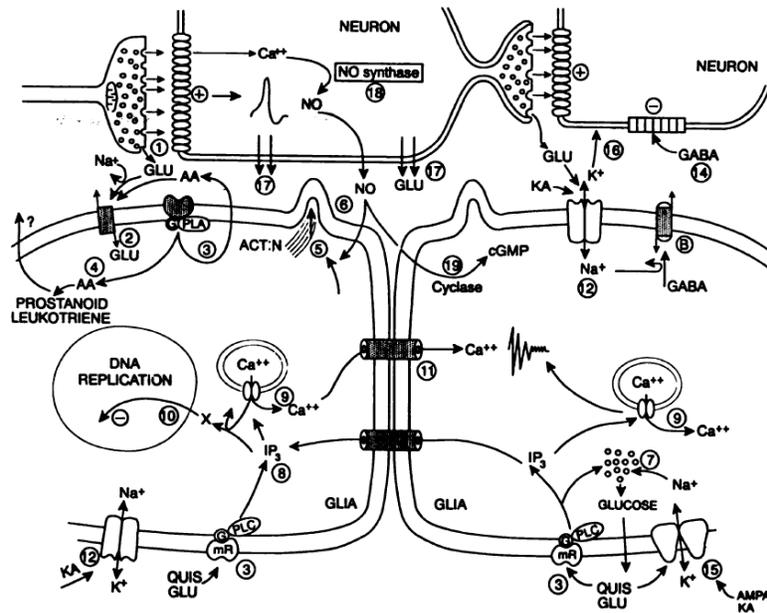


Fig. 2. Interacción y mecanismos de comunicación entre neurona-glia-neurona. En este esquema se muestran las vías de señalización glutamatergica. 1) Liberación de glutamato (Glu) y excitación postsináptica. 2) Captura de Glu dependiente de Na^+ y su inhibición por ácido araquidónico (AA). 3) Activación del receptor metabotrópico de Glu para producir: 4) AA, 5) reorganización de actina, 6) formación de la filopodia, 7) glicogénesis, 8) formación de IP_3 , 9) liberación de Ca^{2+} e 10) inhibición de la replicación. 11) Permeabilidad a través de uniones GAP y ondas de calcio. 12) Activación de los receptores a KA por Glu, entrada de Ca^{2+} y salida de K^+ . 13) Transporte reverso dependiente de Na^+ de compuestos neuroactivos (GABA, taurina y glicina). 14) Inhibición extrasináptica por GABA. 15) Activación de receptor AMPA por GLU. 16) Depolarización inducida por K^+ . 17) Liberación axonal de GLU. 18) Activación del receptor NMDA, entrada de calcio y estimulación de la NO sintasa. 19) Difusión de NO del compartimento neuronal al compartimento glial y estimulación de la guanilato ciclasa y formación de cGMP. (Tomado de Teichberg V., 1991).

Esta evidencia de plasticidad morfo-fisiológica que sufren las células gliales durante la lactancia *per se* en el hipotálamo, sugieren que podría extenderse a otras áreas del cerebro. Interesantemente, como bien se ha descrito a lo largo de

este trabajo, el hipocampo es una zona particularmente conocida por su plasticidad por lo que asumimos esta posibilidad en dicha área.

II.5 FLUCTUACIÓN DE LA PROTEÍNA ACÍDICA FIBRILAR GLIAL (GFAP) EN EL HIPOCAMPO

Entre las muchas áreas cerebrales sexualmente dimórficas en términos funcionales, el hipocampo es de particular interés debido a sus funciones en el aprendizaje, la memoria y la respuesta al estrés, además de que es blanco común de daño cerebral y enfermedades relacionadas con el envejecimiento tales como la enfermedad de Alzheimer (Wang et al., 2003).

Muchas funciones y expresión de genes han sido documentadas en el hipocampo sugiriendo que las hormonas ejercen efectos en la organización y actividad neuronal en esta región cerebral. Como ya se mencionó anteriormente, las células gliales, tanto microglía como astrogliá, también son blanco de las hormonas sexuales debido a que poseen receptores de andrógenos y estrógenos y otras hormonas que median su actividad ya sea reduciéndola o incrementándola (Milner et al., 2001, 2005; Waters et al., 2008).

En los estudios en los que se usa a la GFAP como indicador de astrocitos se ha visto que los niveles de esta proteína de filamentos intermedios varían entre regiones cerebrales, sexo y estado reproductivo en el caso de la hembra.

En hembras, se ha observado que las hormonas gonadales participan en la regulación de la morfología y la actividad de astrocitos en el hipocampo (Barreto et al., 2007). Por ejemplo, la progesterona induce la expresión de agrina, una proteína derivada de astrocitos implicada en la formación de sinápsis (Tournell et al., 2006), mientras que el estradiol (E2), media la magnitud de ramificación neuronal (“sprouting”) a través de sus efectos sobre los astrocitos (Rozovsky et al., 2002), además regula la expresión de la GFAP tanto en hipocampo como en hipotálamo (Day et al., 1993; Stone et al., 1998).

Durante el desarrollo del hipocampo en ratas, el E2 y la testosterona regulan el número de astrocitos (Conejo et al., 2005) y potencian la extensión de los

procesos inmunorreactivos a GFAP en estudios *in vitro* (Del Cerro et al., 1995); así mismo, modulan la reacción de los astrocitos después de una lesión o daño en el cerebro (Storer y Jones, 2003; Nilsson y Pekny, 2007).

En estudios en los que se ha evaluado el nivel basal de GFAP de acuerdo al sexo, edad y estado reproductivo, se ha encontrado más GFAP en el hipocampo de ratas macho jóvenes comparadas con ratas prepúberes hembras. Además, ratas que han sido ovariectomizadas tienen niveles más bajos de GFAP que una rata ciclante, cuya densidad fluctúa durante el ciclo estral, siendo más elevados los niveles de esta proteína durante el proestro cuando las hormonas gonadales están presentes en los niveles más altos del ciclo (Arias et al., 2009) y durante la lactancia estos niveles se incrementan hasta 10 veces más (Salmaso et al., 2005). Los cambios en la morfología de los astrocitos también están asociados con el perfil hormonal (Galea et al., 2006) y las conductas reproductivas (Theodosis y Poulain, 2001) pues la experiencia materna aunada con el perfil hormonal durante el período postparto son factores que incrementan el efecto de la exposición a las crías sobre la inducción de altos niveles de GFAP y cambios en la morfología de áreas del cerebro como el área preóptica medial de ratas (Feathersen et al., 2000).

Los estudios en los que se ha probado el efecto de diferentes hormonas sobre esta proteína, han encontrado que la P4, el E2, la corticosterona (Flores e al., 1999), así como la prolactina y la oxitocina aumentan los niveles de GFAP en otras áreas cerebrales tales como la corteza cingulada (CC), la corteza entorrinal (EC), el área tegmental ventral (VTA), el área preóptica medial (MPOA) y en el núcleo supraóptico (SON), sin embargo, hormonas como el E2 lo disminuyen.

En cuanto a la fluctuación diferencial de GFAP de acuerdo al área dentro del hipocampo, Arias et al. (2009), analizaron la inmunorreactividad de GFAP en CA1, CA3 y el giro dentado del hipocampo de ratas macho adultas intactas y de ratas hembra en estro y proestro. En este análisis encontraron los niveles más altos de GFAP en las 3 áreas del hipocampo en ratas hembra durante el proestro. En CA1 observaron inmunoreactividad a GFAP similar en ratas machos como en las ratas hembra en fase de diestro, sin embargo, en el giro dentado encontraron un

contenido muy bajo de GFAP en machos. Interesantemente, también analizaron si había diferencias morfológicas en estas mismas células, encontrando células redondas con cortos procesos gliales en las ratas hembra durante el proestro mientras que durante la fase de diestro y en machos observaron una forma estrellada con largos procesos astrocitarios. Estas diferencias dependientes del sexo y del ciclo estral, sugieren una participación activa de las hormonas en las funciones dimórficas sexuales en el hipocampo y evidencian la idea de que las células gliales son blancos claves para los efectos mediados por hormonas en el cerebro de los mamíferos (Tabla 2).

Fluctuación de la GFAP en la hembra			
FASE REPRODUCTIVA	CICLO ESTRAL	EMBARAZO	LACTANCIA
HORMONAS	E2,P4	P4, CORT	PRL, P4,CORT,OT
NIVELES GFAP	Bajo: Diestro / Alto: Proestro	Sin cambios hasta el embarazo tardío	10 veces>Ciclo estral
ÁREA	Hipocampo	PVN	Cg2/MPOA/VTA/EntCx/PVN/SON

Tabla 2. Fluctuación de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) durante el estado reproductivo en la rata hembra.

II.6 ÁCIDO KAÍNICO Y RESPUESTA GLIAL

Como se mencionó previamente, el hipocampo de murinos adultos ha sido ampliamente estudiado como modelo de daño neuronal inducido por kainato debido a que su anatomía y las respuestas de desaferentación y mecanismos de neuroprotección han sido extensamente investigadas y han sido bien documentadas. Además, sus células piramidales son particularmente sensibles al kainato de manera tal que es posible restringir el daño unilateralmente a la lesión usando bajas concentraciones de excitotoxina, permitiendo así un análisis más detallado de la respuesta glial.

Existen evidencias de que las excitotoxinas juegan un rol en el daño del hipocampo humano cuando se presenta un insulto o una patología, por ejemplo: anoxia, epilepsia (*status epilepticus*) y demencia. La aplicación directa de las excitotoxinas en el cerebro de roedores induce muerte neuronal y una vigorosa

respuesta inflamatoria involucrando microglía y astrocitos. La inyección i.c.v. de kainato o ibotenato incrementa el número de microglía en los sitios de inyección. Este conocimiento se extiende debido a varios estudios en los que la radiación total del cuerpo con una fuente de cobalto-60 durante el desarrollo, disminuye esta respuesta, demostrando que los monocitos derivados de la médula ósea son reclutados de la sangre como parte de esta respuesta. Además, se ha observado un incremento en la expresión de los antígenos MHC clase I y II en la microglía en el sitio de inyección, en las células neuronales dañadas por el kainato e incluso en sitios distales de la inyección (Simard y Rivest, 2007).

La inyección de kainato produce muerte neuronal selectiva de forma dosis dependiente. Las células degeneran rápidamente entre las 12 a 24 horas después de la inyección, sufriendo lisis nuclear y muerte neuronal. Durante las 48 horas después de la inyección no hay reclutamiento de neutrófilos y hay un retraso de la respuesta macrófago-microglial. La reacción microglial en el hipocampo inyectado consiste en alteraciones morfológicas y un incremento de 6 a 9 veces de macrófagos F4/80. También, la microglía puede responder en los sitios distales de la inyección, los cuales están relacionados con las rutas de proyección y las proyecciones de las células piramidales muertas por el KA. Sin embargo, el uso de dosis muy bajas de excitotoxinas (0.15 y 1.5 nmol.) no inducen daño ni respuesta inflamatoria en los sitios contralaterales a la inyección (Andersson et al., 1991).

La administración de KA en el hipocampo induce un incremento y la expresión de vimentina en la astrogliá reactiva del hipocampo (Ciriza et al., 2004) y este período de activación glial corresponde con una ocurrencia de fragmentación del DNA sugiriendo que la activación microglial y astrogliá está asociada con procesos de muerte neuronal apoptótica (Tooyama et al. 2002).

III. JUSTIFICACIÓN

Durante la lactancia, en el cerebro de la rata madre, especialmente en neuronas del hipocampo dorsal, se presenta una menor sensibilidad para sufrir daño inducido por el agonista glutamatérgico KA, en comparación con ratas hembras vírgenes. Existen pocos reportes que evalúan la importancia de la respuesta glial durante esta etapa reproductiva usando el modelo de daño excitotóxico.

Debido a la importante función que ejerce la microglía y la astrogliá en la reparación del tejido nervioso después de algún daño o lesión, consideramos importante evaluar la respuesta de estas células gliales en el cerebro de la madre cuando ha sufrido daño excitotóxico inducido por ácido kaínico. Se sabe que muchas de las respuestas celulares que ocurren después de alguna lesión excitotóxica en el hipocampo incluyen activación de estos dos tipos celulares. También, dado que el estado reproductivo induce fluctuaciones en el número y forma de células gliales en el cerebro de ratas hembras, es interesante determinar estos parámetros en el hipocampo de la rata madre para conocer si los cambios en las células gliales pueden relacionarse con la plasticidad del hipocampo que se presenta durante esta etapa.

IV. HIPÓTESIS

Dado que existe una menor sensibilidad al KA durante la lactancia, habrá una menor activación glial (gliosis y microgliosis) inducida por la administración i.c.v. de KA en las regiones CA1, CA3 e *hilus* del giro dentado del hipocampo de ratas lactantes.

V. OBJETIVOS

V.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe una respuesta glial diferencial en respuesta al KA en las áreas CA1, CA3 y el *hilus* del giro dentado del hipocampo durante la lactancia de la rata.

V.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si existen cambios en el número de células gliales (astrocitos) del hipocampo de la rata hembra (núlparas y lactantes) en condiciones basales y después de la administración i.c.v. de 100 ng/ μ l KA.
2. Determinar si existen cambios morfológicos en células gliales (astrocitos) del hipocampo dorsal de la rata hembra (núlparas y lactantes) en condiciones basales y después de la administración i.c.v. de 100 ng/ μ l KA.
3. Determinar la respuesta microglial que ocurre en hipocampo de ratas núlparas y lactantes en condiciones basales y después de la administración i.c.v. de 100 ng/ μ l KA.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 ANIMALES

Ratas Wistar lactantes de 300 g y ratas nulíparas de 200-250 g obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, fueron alojadas en cajas individuales bajo condiciones controladas a una temperatura de 22° C con ciclos de luz-obscuridad 12/12 con libre acceso a agua y comida. Todo el manejo de los animales y el trabajo experimental realizado durante este trabajo fue realizado bajo las estrictas normas aprobadas por el Comité de Bioética del INB, UNAM y regido por las normas internacionales para el manejo y uso de animales de laboratorio de la National Academy of Sciences, 2003.

VI.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ratas fueron separadas en 8 grupos experimentales, con una n=5 en cada uno de los grupos:

- 1) Lactante + Sol. salina al 0.9% i.c.v. 24 h, (Lac-Veh 24h),
- 2) Lactante + Sol. salina al 0.9% i.c.v. 72 h, (Lac-Veh 72h),
- 3) Lactante + kainato 100 ng i.c.v. 24 h, (Lac-KA 24h),
- 4) Lactante + kainato 100 ng i.c.v. 72 h, (Lac-KA 72h),
- 5) Nulípara + Sol. salina al 0.9% i.c.v. 24 h, (Nul-Veh 24h),
- 6) Nulípara + Sol. salina al 0.9% i.c.v. 72 h, (Nul-Veh 72h),
- 7) Nulípara + kainato 100 ng i.c.v. 24 h, (Nul-KA 24h),
- 8) Nulípara + kainato 100 ng i.c.v. 72 h (Nul-KA 72h).

Para la inyección i.c.v. de solución salina o KA en los diferentes grupos experimentales, se realizó cirugía estereotáxica bajo anestesia profunda con ketamina/xilacina. Las coordenadas usadas fueron las siguientes: antero-posterior= -1.2, altura= -4.4, lateral= -1, tomando como referencia la línea Bregma del cráneo. En estas coordenadas se aplicó solución salina ó KA (100 ng) en un volumen de 1 µL con una jeringa Hamilton, y se esperó un minuto después de la inyección para retirar la aguja (Fig. 4).

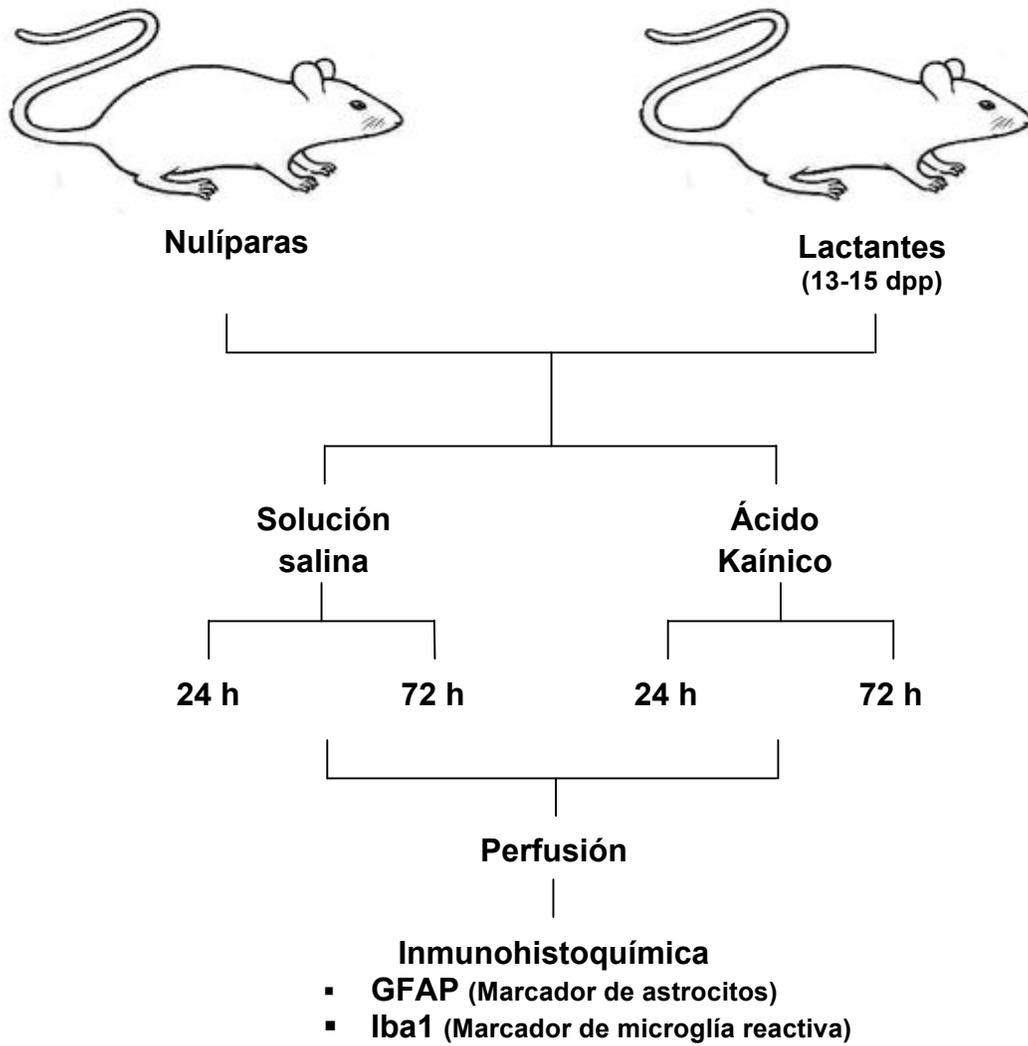


Figura 4. Grupos experimentales y procedimiento utilizados. n=5 en cada grupo experimental.

VI.3 HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Después de la cirugía y de acuerdo con el tiempo de exposición al ácido kaínico según el grupo experimental, las ratas fueron anestesiadas profundamente con una dosis letal de uretano y perfundidas con solución salina al 0.9% (100-200 ml) seguido de paraformaldehído al 4% (250-350 ml). Se extrajo el cerebro y se realizó una postfijación en paraformaldehído durante 24 horas después de su extracción, seguida de sacarosa al 20 y 30 % durante 48 horas cada una. Después, el cerebro fue congelado a 4°C y cortado en un microtomo de congelamiento Leyca, en secciones coronales de un espesor de 30 µm. Para el procesamiento histoquímico, se colectaron 5 series de tejido por cada cerebro en cajas Costar y se almacenaron en solución crioprotectora (30% etilenglicol y 20% de glicerol en PBS) a -20°C.

Para el procesamiento del tejido mediante el protocolo para inmunohistoquímica, se utilizó una de las series colectadas y se enjuagó 2 veces durante diez minutos cada una en buffer de fosfatos (KPBS 0.02 M) para eliminar cualquier residuo de solución crioprotectora. Una vez enjuagado, el tejido fue sometido a inmunohistoquímica para la detección de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP), un marcador de astrocitos y para la detección de la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1) expresada en microglía.

La detección de astrocitos se realizó de la siguiente manera: los cortes coronales de cerebro se lavaron 2 veces durante 10 minutos en KPBS y 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3%; posteriormente se incubaron en borohidrato de sodio al 1% durante 6 minutos para reducir el número de aldehídos libres. El tejido fue lavado en KPBS hasta eliminar las burbujas e incubado a 4°C durante 48 horas en una solución de suero natural de cabra (NGS por su siglas en inglés) al 2% y tritón al 0.3% en KPBS más el anticuerpo policlonal primario hecho en conejo para GFAP 1:1000 (DakoCytomation®), la cual se expresa en astrocitos y es una proteína de filamentos intermedios expresados selectivamente en dichas células en el SNC. Después de esta incubación, el tejido se lavó y se incubó en un anticuerpo secundario asociado a fluoresceína (FITC) (Code. Jackson.

ImmunoResearch Laboratories INC.) en 20 ml de KPBS y tritón al 0.3% más NGS durante 1 hora y se enjuagaron 2 veces por 10 minutos cada una en KPBS.

Para la detección de células microgliales se utilizó la técnica de la avidina-biotina-peroxidasa. Los cortes coronales de cerebro se lavaron 2 veces durante 10 minutos en KPBS y 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 30%; posteriormente se lavaron en KPBS y se incubaron en borohidrato de sodio al 1% durante 6 minutos y se enjuagaron hasta eliminar las burbujas que ocasiona el peróxido. Posteriormente se incubaron a 4°C durante 48 horas en una solución de suero de burro (NDS por su siglas en inglés) y tritón a 0.3% en KPBS más el anticuerpo policlonal primario hecho en cabra para Iba1 1:1000 (Abcam INC[®]), la cual se expresa selectivamente en microglía y es un péptido de unión a Ca²⁺ producido por la microglía activada y cuya expresión está asociada a procesos de inflamación crónica. Después de esta incubación, se lavó y se incubó en un segundo anticuerpo biotinilado por el sistema avidina/biotina del kit Vectastain (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories. Burlingame, CA) durante 1 hora. Por último se adicionaron 2 ml de una solución compuesta por DAB 15%, B-D glucosa 0.8%, cloruro de amonio 0.16%, sulfato de amonio y níquel (NAS) 45% y glucosa oxidasa 0.1% para revelar las células positivas al Iba1.

Después de la inmunohistoquímica, el tejido se montó en laminillas gelatinadas con polilisina cuidando el seguimiento y distribución de las estructuras anatómicas hipocampales del cerebro. El tejido se secó perfectamente en un medio libre de humedad durante una semana a 4°C, y después se cubrió con un cubreobjetos usando DPX como medio de montaje.

VI.4 ANÁLISIS DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN

VI.4.1 Cuantificación del número de células positivas.

De cada sujeto se escogieron de 5-6 cortes coronales y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia Nikon las áreas correspondientes a CA1, CA3 y el *hilus* del giro dentado del hipocampo con el objetivo 20X para cuantificar el número de células gliales inmunorreactivas a GFAP (GFAP-ir) y el número de células microgliales inmunorreactivas a Iba1 (Iba-ir). La cuantificación de las células se realizó con el programa IPLab (NIH, versión 3.5) en una superficie de 0.17 Mpx por cada región del hipocampo (Fig. 5).

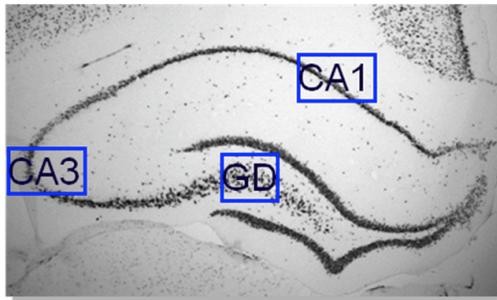


Figura 5. Zonas del hipocampo analizadas. Los recuadros señalan y equivalen al tamaño aproximado del área cuantificada en cada región del hipocampo.

VI.4.2 Análisis de Sholl

El método de Sholl consiste en el análisis cualitativo y cuantitativo de las características estructurales de las células nerviosas, tales como el tamaño del soma, número de procesos, espinas o dendritas, así como su longitud, entre otras características. Este análisis se realiza mediante círculos concéntricos cada 5, 10, 15 ó 20 μm a partir del cuerpo celular de acuerdo a la característica y célula que se desee analizar (Fig. 6).

Para la determinación del estatus morfológico de las células gliales por medio del análisis de Sholl, se analizaron las imágenes de microscopía confocal capturadas con el objetivo de 60X del microscopio confocal Nikon. Estas imágenes se capturaron tomando 4 diferentes planos de profundidad, uno cada 6 μm de la rebanada; el microscopio convierte estas imágenes en una sola. De esta manera,

se obtiene mayor información sobre los detalles estructurales de las células que no se tienen en un solo plano focal. Estas imágenes se imprimieron en papel y se cuantificaron manualmente, mediante plantillas con círculos concéntricos de 10 μm de distancia a partir del cuerpo celular, donde se contabilizó el número de cruces de los procesos astrocíticos en cada círculo para así determinar la extensión, el número de procesos astrocíticos y el tamaño del soma en astrocitos GFAP-ir de cada región (CA1, CA3 e *hilus* del giro dentado) del hipocampo de cada grupo experimental.

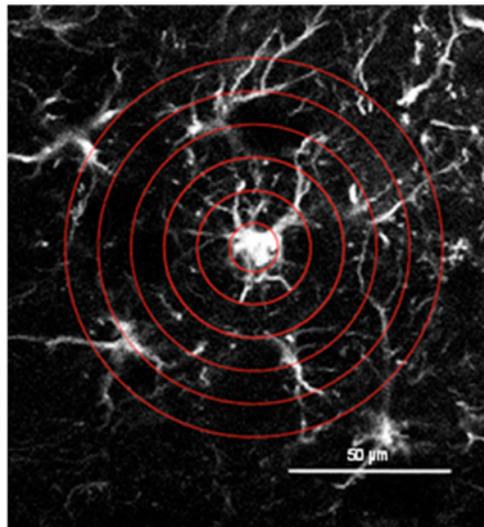


Figura 6. Método de Sholl. Se cuantificó el tamaño del soma y el número de procesos astrocíticos por célula que equivale al cruce de estos con cada círculo concéntrico, cuya distancia equivale a 10 μm .

VI.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico para el número de células gliales GFAP-ir y células microgliales Iba1-ir, consistió en un ANOVA de 2 vías tomando como parámetros 1: condición (lactante vs nulípara) y 2: tiempo post-inyección (24 vs 72 h), y una prueba *t* de Student no pareada para determinar las diferencias entre grupos.

Para el análisis morfológico a partir de los astrocitos, las diferencias en el número de procesos astrocíticos y en el tamaño del soma en cada grupo se obtuvieron mediante un ANOVA de 2 vías.

VII. RESULTADOS

VII.1 NÚMERO DE ASTROCITOS EN ÁREAS DEL HIPOCAMPO DORSAL

La inmunohistoquímica para la GFAP es comúnmente usada como un marcador de astrocitos, y su detección por inmunohistoquímica reveló diferencias en el número basal de células inmunorreactivas a GFAP (GFAP-ir) en las áreas del hipocampo de ratas nulíparas y lactantes, así como una respuesta celular diferencial inducida por KA en ratas nulíparas y lactantes a las 72 horas (Fig. 7).

El número de células GFAP-ir en CA1 y CA3 del hipocampo de ratas nulíparas y ratas lactantes tratadas con vehículo fue similar (Fig. 8 y 9), mientras que en el *hilus* del giro dentado fue mayor en las ratas lactantes (Fig. 10).

El tratamiento con KA indujo un aumento significativo en la respuesta de la glía astrocítica en las áreas hipocampales de ratas nulíparas expuestas 24 y 72 horas al KA. Sin embargo, no se observó incremento en las células GFAP-ir en respuesta al KA en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo (Fig. 8 y 9), pero sí en el giro dentado de ratas lactantes (Fig. 10).

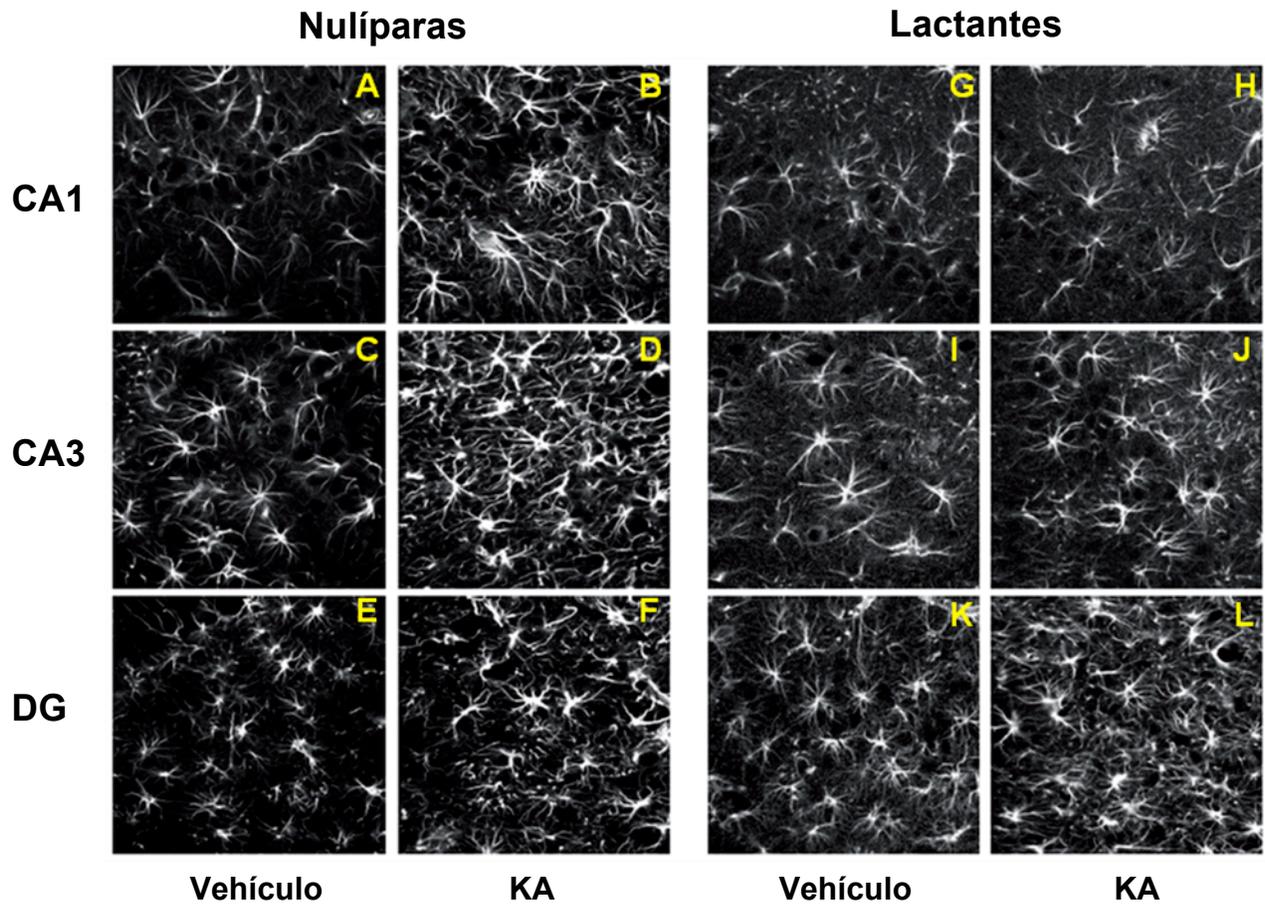


Fig. 7. Microfotografías que muestran astrocitos (GFAP-ir) en CA1, CA3 e *hilus* del giro dentado del hipocampo de ratas nulíparas (A-F) y lactantes (G-L) 72 horas después de la inyección i.c.v. con KA. Es muy importante resaltar que en las ratas lactantes (H, J, L) no se observó la clara respuesta observada en las ratas nulíparas (B, D, F), y que en el giro dentado de ratas lactantes del grupo control se observa mayor señal a GFAP (K).

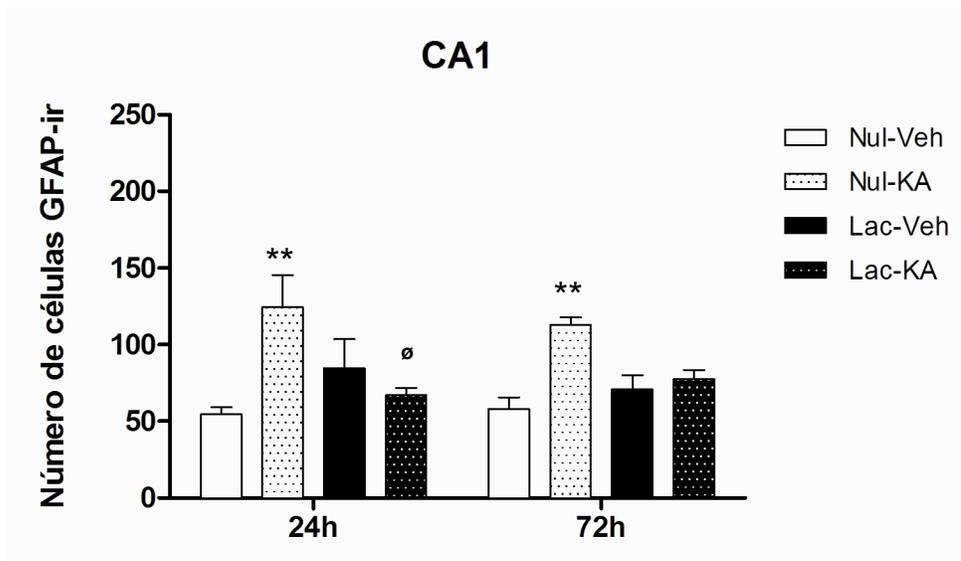


Figura 8.- Número de células inmunorreactivas a GFAP en el área CA1 del hipocampo de ratas nulíparas o lactantes. Se observa que la exposición al KA durante 24 y 72 horas, indujo un incremento significativo en el número de células gliales en ratas nulíparas (** $p < 0.01$ comparado con su control tratado con vehículo), mientras que en ratas lactantes no hubo incremento en la respuesta glial. En ratas lactantes y nulíparas tratadas con vehículo, el número de células positivas a GFAP se mantiene similar mientras que a las 24 horas, el número de células GFAP+ del grupo Lac-KA24h fue diferente del grupo Nul-KA 24h ($øp < 0.05$ comparado con ratas nulíparas que recibieron el mismo tratamiento). Las barras representan el promedio \pm EE, $n=5$.

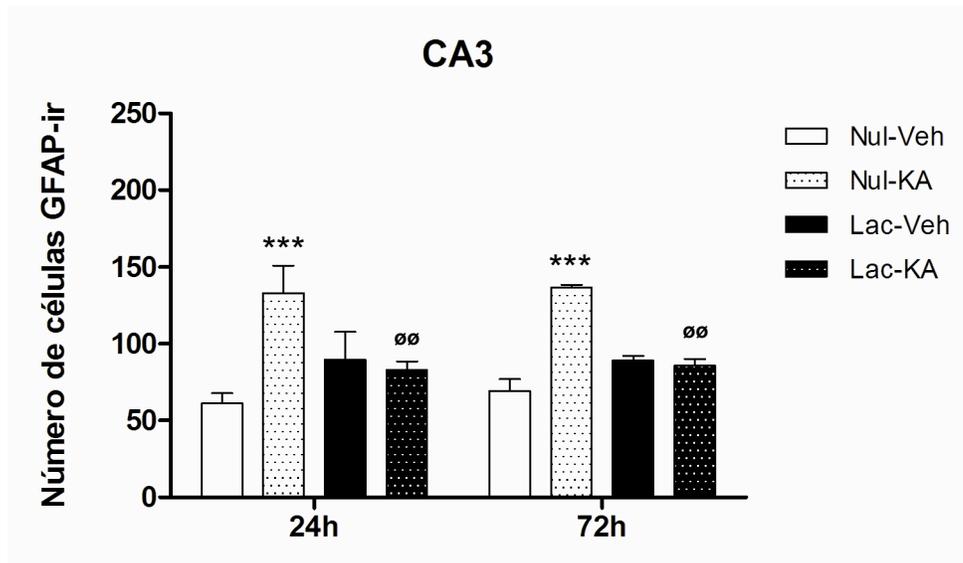


Figura 9.- Número de células inmunorreactivas a GFAP en el área CA3 del hipocampo de ratas nulíparas o lactantes. La exposición al KA, durante 24 y 72 horas, indujo un incremento significativo en el número de células gliales en ratas nulíparas (** $p < 0.001$ comparado con su control tratado con vehículo), mientras que en ratas lactantes no hay incremento en la respuesta glial. En ratas lactantes y nulíparas tratadas con vehículo, el número de células inmunorreactivas a GFAP se mantiene similar y hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Lac-KA 24 y 72h comparado vs los Nul-KA 24 y 72h ($\emptyset\emptyset p < 0.01$ comparado con ratas vírgenes que recibieron el mismo tratamiento). Las barras representan el promedio \pm EE, $n=5$.

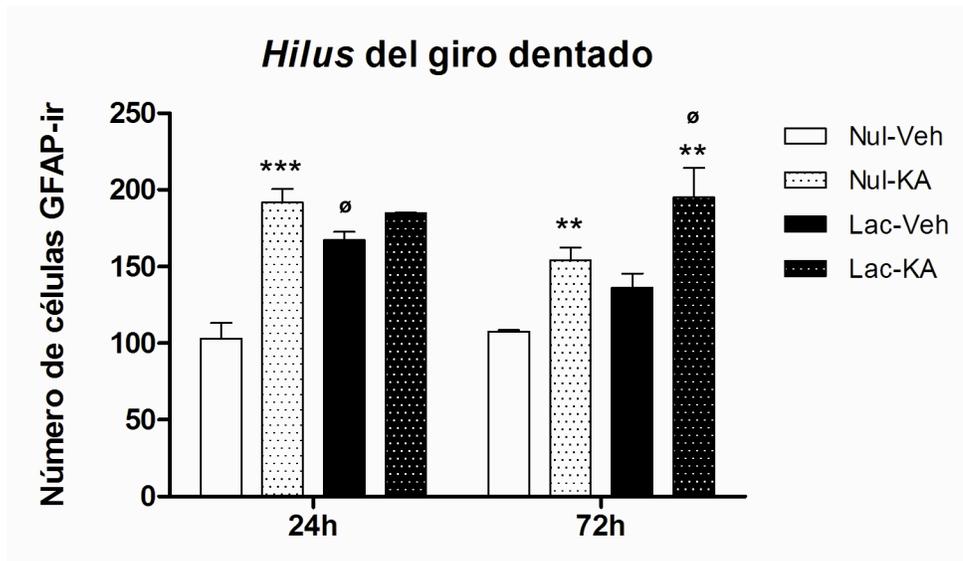


Figura 10.- Número de células inmunorreactivas a GFAP en el *hilus* del giro dentado del hipocampo de ratas nulíparas o lactantes. El tratamiento con KA indujo un aumento significativo en el número de células positivas a GFAP en ratas nulíparas expuestas durante 24 y 72 horas al KA (Nul-KA) y en ratas lactantes (Lac-KA) después de 72 horas (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparado con su control correspondiente tratado con vehículo). En condiciones basales, el giro dentado del hipocampo de las ratas lactantes presentó un incremento en el número de células gliales en comparación con el de las ratas nulíparas ($^{\emptyset}p < 0.01$ comparado con ratas nulíparas que recibieron el mismo tratamiento). Las barras representan el promedio \pm EE, $n=5$.

Una vez cuantificado el número de los astrocitos en cada área del hipocampo analizada por cada condición experimental, se calculó el porcentaje de cambio inducido por el tratamiento con KA con respecto a su control correspondiente que recibió tratamiento con solución salina. Encontramos que en ratas nulíparas el tratamiento con KA 24 ó 72 horas después de la inyección indujo un aumento de aproximadamente 100% en el número de astrocitos en el hipocampo con respecto al control respectivo. Mientras que en las ratas lactantes el tratamiento con KA no produjo cambio a las 24 horas pero sí a las 72 horas. Encontramos que el tratamiento con KA 72 horas después de su aplicación indujo un aumento de la glía astrocítica solo en el *hilus* del giro dentado (50%), de manera similar al efecto observado en esta misma área en las ratas nulíparas (Fig. 11).

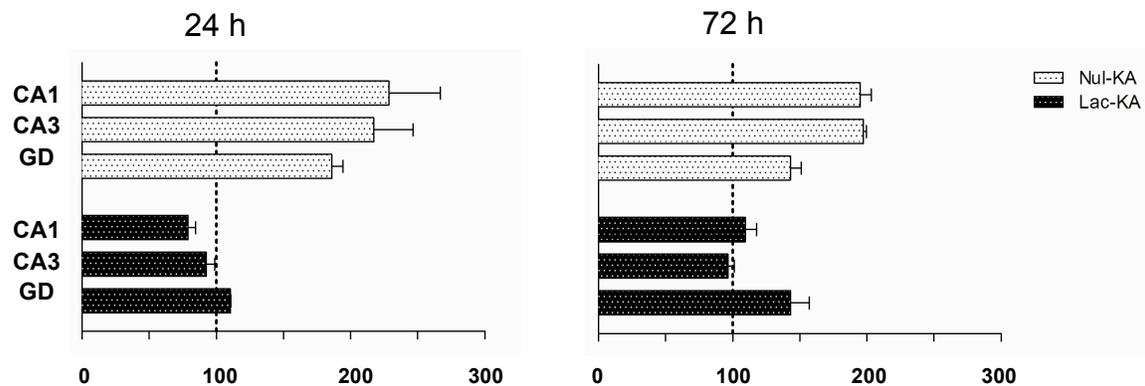


Fig. 11. Porcentaje relativo de las células GFAP inmunorreactivas en el área CA1, CA3 y en el *hilus* del giro dentado del hipocampo de ratas nulíparas y lactantes tratadas con KA con respecto a su control correspondiente (línea punteada). La inducción de la respuesta astrocítica fue observada en el hipocampo de ratas nulíparas pero no se observó en el grupo de las ratas lactantes, excepto en el *hilus* del giro dentado a las 72 horas *post* KA. Las barras representan el promedio \pm EE, n=5.

VII.1.2 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El análisis de Sholl reveló un aumento en el número de procesos astrocíticos en CA1, CA3 y en el *hilus* del giro dentado de las ratas nulíparas en respuesta al KA después de 24 ó 72 horas (Fig. 12 A-D). En contraste, las ratas lactantes no presentaron esta respuesta ni en CA1, ni en CA3. Sin embargo, en el *hilus* del giro dentado del hipocampo de lactantes se observó el efecto contrario, una disminución en el número de procesos (Fig. 12 E), mientras que en nulíparas aumentó (Fig. 12 E, F). Las características cualitativas se pueden observar en la figura 13.

El análisis del tamaño del soma, reveló que el tratamiento con KA induce un aumento en el tamaño del soma de ratas nulíparas solamente a las 72 horas de exposición a esta excitotoxina.

Durante la lactancia, el soma de los astrocitos del área CA3 del hipocampo presentan un mayor tamaño que los de las áreas CA1 y giro dentado. El tratamiento prolongado con KA (72 h) no ejerce ningún efecto en CA1, sin embargo en CA3 ejerce el efecto contrario, es decir disminuye el tamaño del soma (Fig. 14).

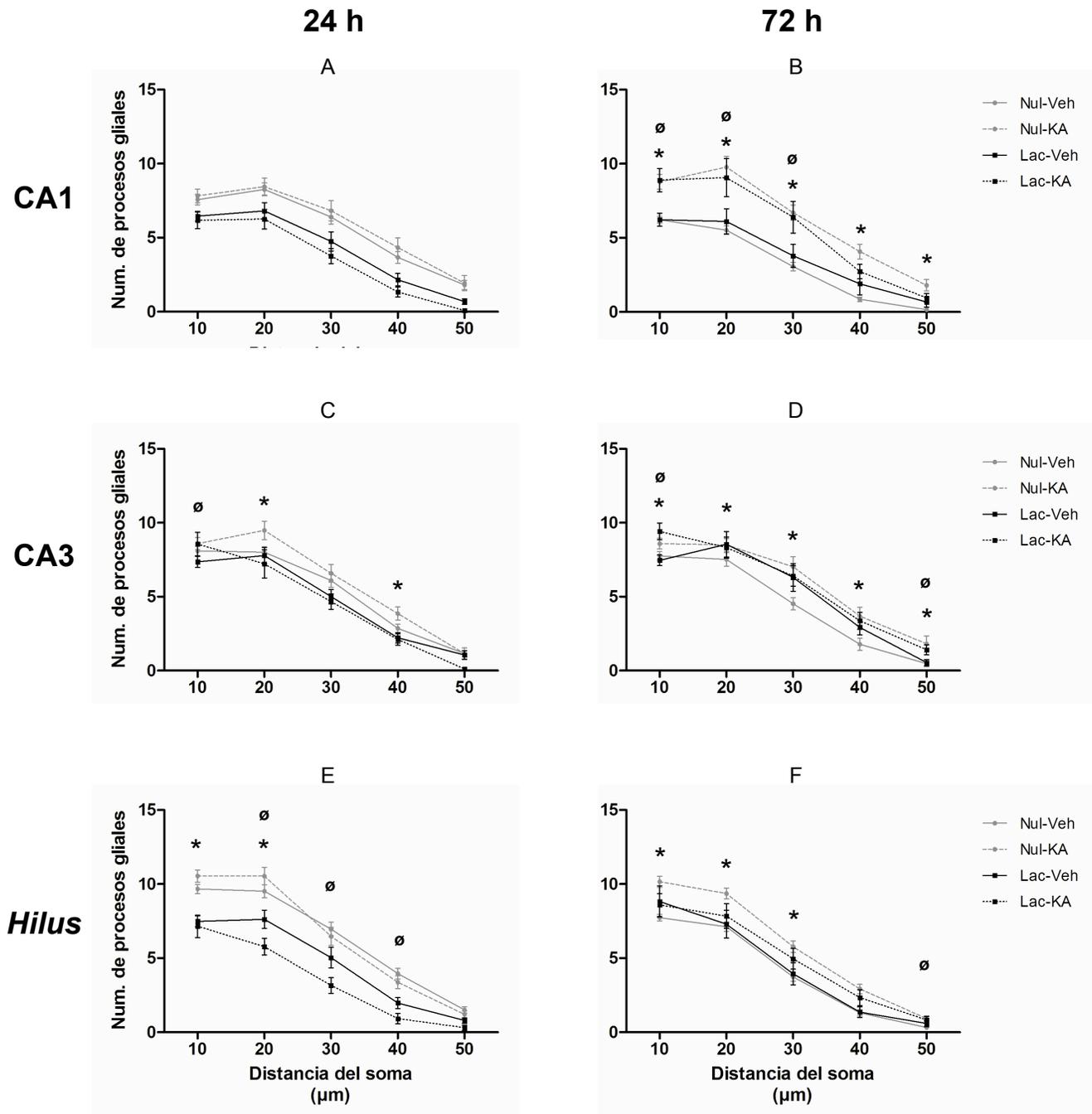


Fig. 12. Número de procesos astrocíticos en una distancia de 10 a 50 µm a partir del cuerpo celular (procesos primarios y sus ramificaciones) determinados para cada célula. Los datos son presentados como el promedio ± el error estándar de la media, n=50. *p<0.01 diferente de su control correspondiente en ratas nulíparas y ∅p<0.1 diferente del control correspondiente en ratas lactantes.

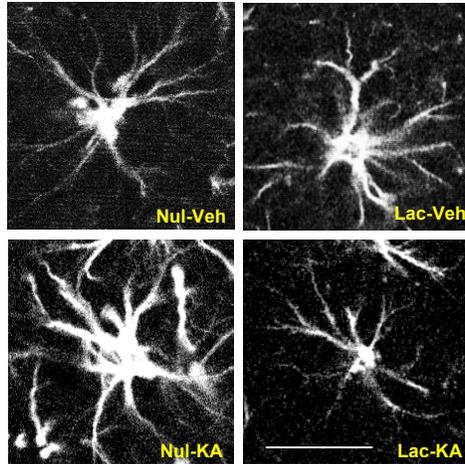


Figura 13. Cambios morfológicos observados en astrocitos GFAP-ir del *hilus* del giro dentado en ratas nulíparas o lactantes tratadas con KA o sol. salina (Veh) durante 72 horas. El KA induce una sobreexpresión de GFAP en ratas nulíparas, mientras que en las lactantes, se observa el efecto contrario. Tamaño de la barra: 15 μ m.

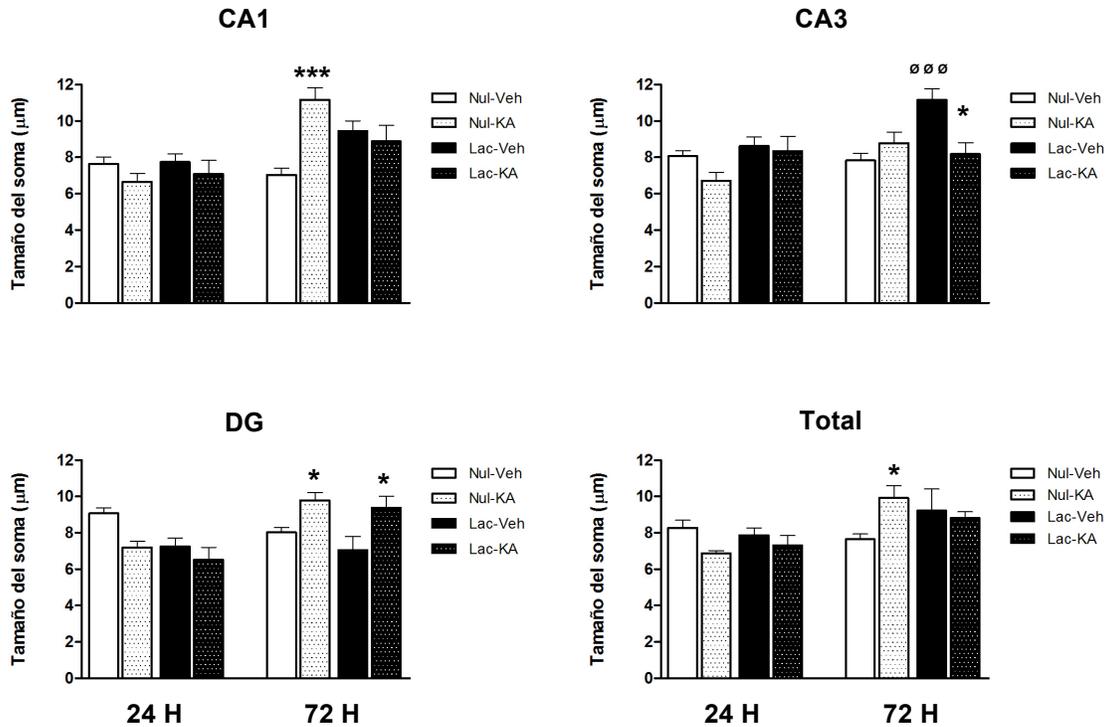


Fig. 14. Tamaño del soma de astrocitos en el hipocampo de ratas nulíparas o lactantes. En ratas nulíparas el tratamiento prolongado con KA (72 h) aumenta el tamaño en las células astrocíticas GFAP-ir en CA1 y giro dentado. En los somas de astrocitos de ratas lactantes en condiciones basales se observó un aumento en CA3, sin embargo el tratamiento prolongado con KA (72 h) induce el efecto contrario en esta área, mientras que en el *hilus* del giro dentado el KA también aumenta el tamaño del soma. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparado con su control correspondiente tratado con vehículo y ø $p < 0.01$ comparado con ratas nulíparas en condiciones basales). La grafica inferior derecha corresponde a la suma total del tamaño de los somas de las tres áreas analizadas. Las barras representan el promedio \pm EE, $n=50$.

VII.2 MICROGLÍA

Mediante la inmunotinción contra Iba1, un marcador específico de microglía, detectamos una respuesta microglial caracterizada por un aumento en el número de células de este tipo después de la lesión con KA en ratas nulíparas. En este grupo, las células Iba1-ir están ampliamente distribuidas en las tres regiones del hipocampo analizadas en este estudio; además, cabe destacar que esta respuesta no solo se limitó al hipocampo sino a regiones distales de las áreas analizadas observándose, incluso, en la corteza cerebral (Fig. 14).

El aumento en la proliferación de microglía causada por el KA en ratas nulíparas se vio potenciado aún más por el tiempo de exposición. A las 72 h después de la aplicación de KA, el número de células gliales fue mayor que a las 24 h post-inyección.

Por el contrario, las ratas lactantes no presentaron incremento en el número de este tipo celular en ninguna de las áreas del hipocampo analizadas, lo que nos sugiere que durante la lactancia el KA no desencadenó la respuesta inflamatoria típica que se ha reportado en las ratas ciclantes y en machos (Fig. 15).

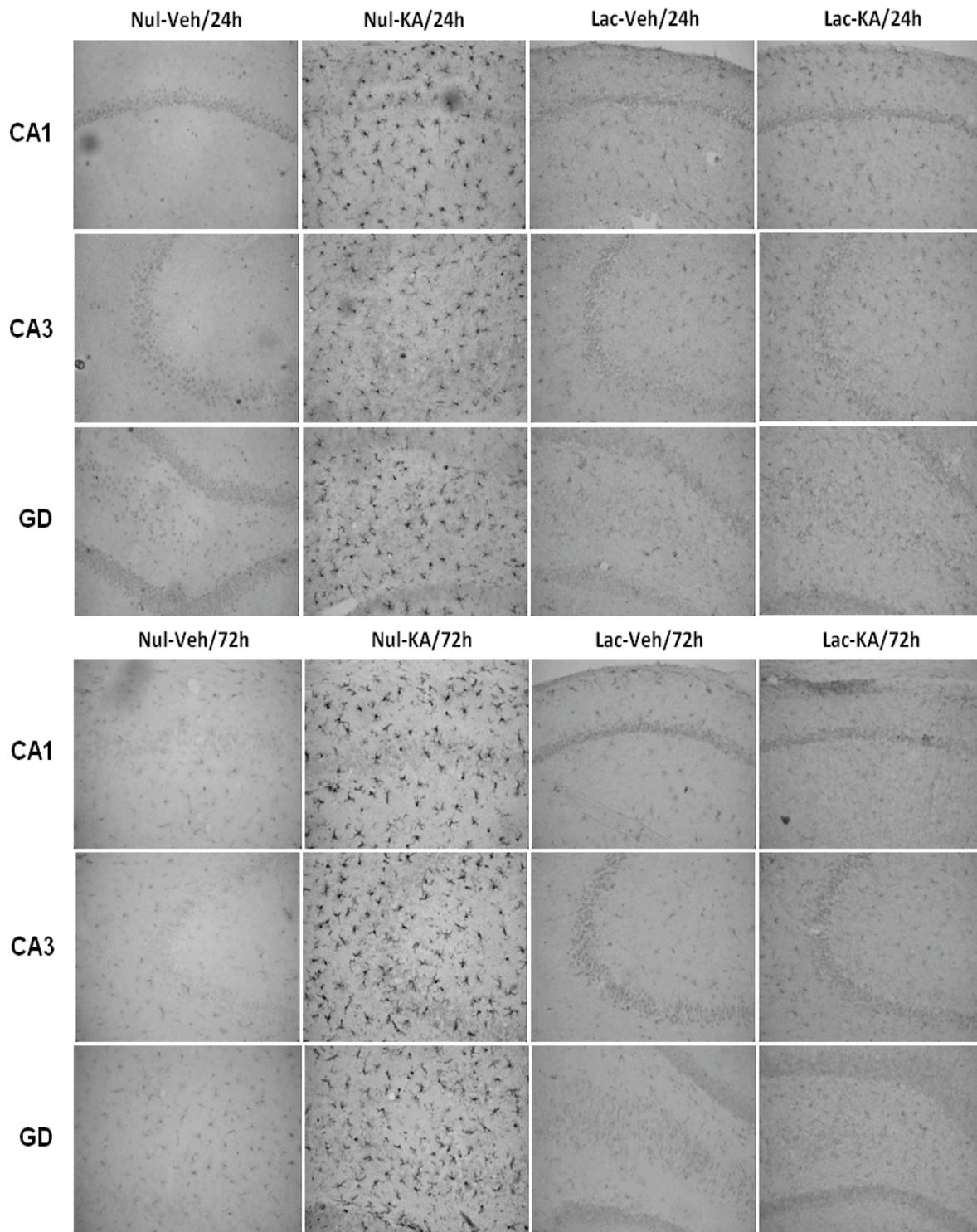


Figura 15. Microfotografías de las células microgliales Iba1-ir en el hipocampo de ratas nulíparas y lactantes tratadas con KA o vehículo 24 y 72 horas. El tratamiento con KA induce un aumento de células microgliales en todo el hipocampo de las ratas nulíparas, pero no en las lactantes.

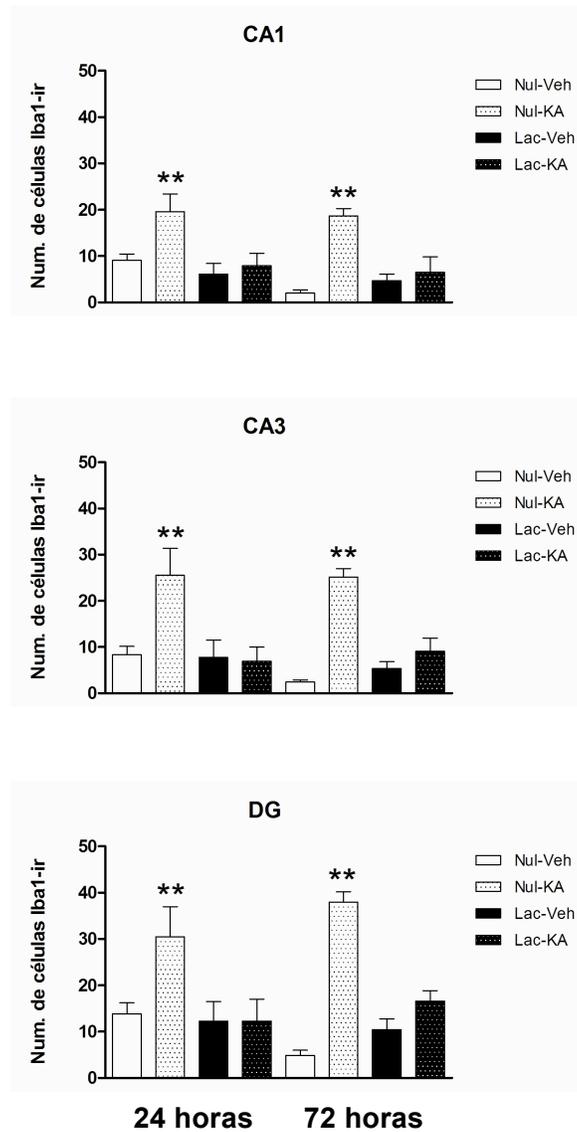


Fig. 16. Número de células inmunorreactivas a Iba1 en las áreas CA1, CA3 e *hilus* del giro dentado del hipocampo de ratas nulíparas o lactantes. Se observa que la exposición al KA, durante 24 y 72 horas, indujo un incremento significativo en el número de células de la microglía en ratas nulíparas (** p<0.01 y *** p<0.001 comparado con su control tratado con vehículo), mientras que en ratas lactantes no hubo incremento. En ratas lactantes y nulíparas tratadas con vehículo, el número de células inmunorreactivas a Iba1 es bajo ya que la expresión de este marcador se asocia con la inflamación causada por la lesión. Las barras representan el promedio \pm EE, n=5.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se investigó cómo la lactancia influye en la respuesta astrocítica y microglial en el hipocampo de la rata madre comparando la respuesta celular que induce una lesión excitotóxica en el hipocampo de ratas lactantes con la de ratas nulíparas. Un trabajo previo de nuestro grupo reportó que la lactancia protege al hipocampo de la rata madre contra el efecto deletéreo del KA. La importancia de este estudio, radica en el análisis de la magnitud de la respuesta glial en el hipocampo de ratas lactantes inducida por daño excitotóxico, lo cual nos daría una idea sobre la magnitud de la respuesta inflamatoria causada por este agente y sobre el posible papel de la glía previniendo el daño celular.

La administración de KA en roedores es ampliamente usada como modelo experimental de epilepsia y resulta en la manifestación de procesos neurodegenerativos y respuesta glial en el hipocampo. Mediante el uso de este modelo de excitotoxicidad, previamente mostramos que durante la lactancia las neuronas de CA1, CA3 y CA4/giro dentado del hipocampo presentan una baja sensibilidad al daño excitotóxico, lo cual indica un claro fenómeno de neuroprotección en estas áreas (Vanoye-Carlo et al., 2008, Cabrera et al., 2009). En el presente estudio, ratas nulíparas y lactantes fueron inyectadas vía i.c.v. con KA. El análisis se realizó a las 24 y 72 horas después de la inyección y se evaluó la respuesta glial y microglial mediante inmunohistoquímica para GFAP e Iba1, respectivamente. Además, se analizaron los cambios morfológicos en los astrocitos GFAP-ir en CA1, CA3 y en el *hilus* del giro dentado del hipocampo. Los resultados encontrados confirman lo reportado anteriormente, ya que observamos que durante la lactancia se previene la respuesta glial y microglial, y además encontramos que los astrocitos del *hilus* del giro dentado son sometidos a una remodelación anatómica que incluye un aumento en el número de dichas células y la retracción de sus procesos, lo cual sugiere un fenómeno de plasticidad inducida por la lactancia en este tipo celular.

Además, encontramos que la respuesta glial y microglial varía de acuerdo con el área hipocampal analizada (CA1, CA3 y GD) y el estado reproductivo de las

hembras (núlíparas y lactantes). Nuestros resultados muestran que el KA aumenta el número de astrocitos y microglía en el hipocampo en ratas nulíparas. Los cambios morfológicos observados en los astrocitos de este grupo experimental fueron hipertrofia de los procesos y somas fusiformes característicos de la respuesta glial tal como se ha reportado en otros estudios con este mismo modelo. Esta respuesta glial ha sido bien descrita en ratas ciclantes y machos, y las características de esta respuesta han sido correlacionadas con el ambiente hormonal (Anderson et al., 1991; Azcoitia et al., 1999; Ciriza et al., 2004; Toomaya et al., 2002).

Asimismo, observamos que la exposición al KA en ratas lactantes aumenta el número de astrocitos en el *hilus* del giro dentado sólo a las 72 después de la inyección. Sin embargo, observamos un incremento de células GFAP inmunorreactivas y cambios morfológicos en la condición basal en esta misma zona, lo cual se discutirá con mayor detalle más adelante.

VIII.1 RESPUESTA ASTROCÍTICA

Las propiedades bioquímicas de la glía cambian de acuerdo con las señales del micro-ambiente donde los niveles hormonales y la presencia de factores dañinos tienen un papel importante. Las fluctuaciones en el número y forma de astrocitos en el adulto, se ha usado como indicador de plasticidad cerebral durante la reparación del tejido después de un daño o lesión en el sistema nervioso central.

Estudios de daño neuronal han reportado que las hormonas y sus receptores actúan regulando la respuesta al daño o lesión modulando la expresión de moléculas implicadas en las funciones reparadoras (Garcia-Estrada et al., 1993).

Además, existen estudios que sugieren que la astrocitosis reactiva o gliosis está acompañada de proliferación de astrocitos, los cuales son capaces de dividirse después de sufrir daño neuronal y formar células multipotentes (Buffo et al., 2008).

En este trabajo de tesis encontramos que el número de células GFAP-ir es mayor en el giro dentado del hipocampo de ratas lactantes que en el de las nulíparas. Esto puede relacionarse con la acción hormonal a la que está expuesta la rata lactante. Por ejemplo, con respecto a las hormonas, se ha visto que la PRL, una

hormona que se encuentra en altas concentraciones durante la lactancia, estimula la mitogénesis en astrocitos en cultivo (De Vito et al., 1992). En modelos de hipoxia/isquemia, el tratamiento central con PRL exhibe fuertes propiedades gliotróficas, indicando que esta hormona tiene un importante rol en la recuperación del tejido cerebral dañado a través de respuestas gliales (Modersheim et al., 2007), además también participa en las acciones neuroprotectoras de los estrógenos (Azcoitia et al., 2001). En relación a otra hormona que está presente en altos niveles durante esta etapa reproductiva, Tanapat (1999) encontró que la progesterona se relaciona con niveles elevados de proliferación celular en ratas hembras. La rata lactante presenta altos niveles circulantes de esta hormona, por lo que es sugerente pensar que el aumento en el número de células positivas a GFAP encontrado en el giro dentado de las ratas lactantes pueda estar relacionado con algún mecanismo inductor de proliferación celular en esta área. Por otro lado, la experiencia materna y el ambiente enriquecido que esta condición representa por la exposición a las crías, la estimulación sensorial, y por la estimulación neurogénica de la succión, posiblemente también participen en incrementar los niveles de GFAP en el giro dentado, tal como ocurre en el área preóptica medial de ratas hembra (Feathersone et al., 2000). Una expresión aumentada de GFAP y bFGF en el cerebro de la madre ha sido descrita para otras áreas cerebrales como la corteza cerebral en particular en la circunvolución del cíngulo (Salmaso y Woodside, 2008), y se ha mostrado que está regulada por las hormonas esteroides (estrógenos y progesterona) y la experiencia maternal (Salmaso et al., 2009). Por lo que, se puede pensar que el incremento de células GFAP inmunorreactivas en el giro dentado se deba a esta influencia hormonal en combinación con la experiencia maternal.

El hipocampo es una estructura cerebral que presenta una gran capacidad de plasticidad relacionada con el aprendizaje específico y la memoria, además de que el giro dentado es un área bien conocida por presentar elevada tasa de neurogénesis en el cerebro adulto. Estos cambios plásticos en las células gliales, dirigidos por las hormonas y sus receptores, se han visto involucrados en los mecanismos de plasticidad sináptica y neuronal (García-Segura et al., 1986). Dado

que durante el embarazo y la lactancia ocurren numerosos cambios, el cerebro de la madre es considerado un modelo útil de neuroplasticidad. Varios estudios en el embarazo y la lactancia de ratas han documentado la existencia de neuroplasticidad en el hipocampo de la madre, como un aumento en las espinas dendríticas en CA1, menor neurogénesis, y una significativa mejora en pruebas de aprendizaje y memoria espacial (Kinsley y Lambert, 2008; Pawluski et al., 2009). Aunque estos datos son muy atractivos para especular que a partir de la proliferación celular se pueda inducir la formación de nuevas neuronas, algunos grupos de investigadores reportan que durante la lactancia la tasa de neurogénesis en giro dentado no se modifica o está disminuida (Shingo et al., 2003; Furuta y Bridges, 2005). Sin embargo, Pawlusky y Galea (2008) encontraron datos que sugieren que la neurogénesis en el hipocampo es afectada sólo durante el período postparto en ratas primíparas, las cuales presentan neurogénesis en el giro dentado a los 21 días después del parto, en comparación con ratas múltiparas y nulíparas.

Así, con base en estos datos, podemos especular que el aumento de células inmunorreactivas a GFAP en el hipocampo de ratas lactantes reportadas en este estudio puede sugerir proliferación celular a partir de la glía en el giro dentado durante esta etapa reproductiva. Sin embargo, a pesar de estas evidencias que apoyan la idea de la proliferación celular, son necesarios más estudios ya que aún está por definir si estas células gliales tienen capacidad de supervivencia, diferenciación, migración a otras zonas del cerebro e incluso si tienen capacidad de establecer conexiones en diferentes redes, pudiendo quizás, dar origen a nuevas neuronas.

Por otra parte, a pesar de que el aumento en el número de células gliales sugiere proliferación celular, no en todos los casos es así. Si bien los astrocitos reactivos ejercen efectos neuroprotectores, también pueden exacerbar el daño, por lo que la inhibición de la gliosis también puede llegar a ser neuroprotectora (Mourlevat et al., 2003). Por un lado los astrocitos median la reparación celular a través de la secreción factores neurotróficos (Sasaki et al., 2004), la expresión del factor de crecimiento nervioso y GDNF (Chen et al., 2004); minimizan el daño y muerte

neuronal a través de la manutención del nivel homeostático de neurotransmisores (Newman et al., 2003); protegen a las neuronas a través de la regulación de la síntesis y uso de factores metabólicos (Magistretti, 2006); después de lesiones traumáticas, los astrocitos reactivos disminuyen el daño tisular controlando y restaurando la integridad de la barrera hematoencefálica, evitando la extensión de edemas vasogénicos y citotóxicos mediante transportadores de iones y aquaporinas (Chen y Swanson, 2003). Por otra parte, la cicatriz glial supone un grave impedimento para la regeneración axonal ya que forma una barrera física que impide el crecimiento de las neuritas (Le Roux y Reh, 1996; Fawcett et al., 2006). Además, en la matriz extracelular de la cicatriz glial se acumulan numerosas moléculas que inhiben la regeneración axonal (Fawcett y Asher, 1999) y se ha demostrado que la inhibición de la astrogliosis estimula la regeneración axonal y el crecimiento de neuritas, no solo por la ausencia de un impedimento físico sino también por la falta de secreción de moléculas inhibitorias del crecimiento axonal (Fawcett y Asher, 1999; Gates y Dunnett, 2001; Sandvig et al., 2004). En co-cultivos de neuronas y astrocitos, la inhibición de la gliosis provoca una mayor supervivencia neuronal, un aumento en la extensión de las neuritas y una mayor longitud de las mismas (Menet et al., 2001). *In vivo*, la inhibición de la gliosis astrocitaria permite una recuperación motora en las ratas con hemisección medular, aunque no por regeneración de larga distancia (Menet et al., 2001). La disrupción de la cicatriz glial también permite una mejor integración anatómica y funcional de nuevas neuronas en el tejido nervioso, a partir de trasplantes neuronales (Kinouchi et al., 2003).

En los resultados del presente trabajo se observó un claro aumento en el número de células positivas a GFAP inducido por la lesión con KA en ratas nulíparas, mientras que en las lactantes sólo mostraron un pequeño aumento en el giro dentado a 72 h después de la lesión. Esto indica que en comparación con las nulíparas, el hipocampo de la madre está modificado de alguna manera en la que ocurre una lesión menor (Cabrera et al., 2009), por lo tanto una menor respuesta astrocítica típica de la lesión con KA.

VIII.1.2 Morfología de los astrocitos

Las regiones CA1, CA3 y el *hilus* del giro dentado poseen predominantemente astrocitos protoplasmáticos de forma irregular con procesos cortos y ramificados, pero cuando existe una lesión en el cerebro estos se alteran totalmente.

Nuestros resultados muestran claramente las características morfológicas de la respuesta glial al daño ocasionado por el KA en ratas nulíparas. Esta respuesta glial, como lo mencioné antes, se caracteriza por un aumento en los niveles de la GFAP y cambios morfológicos como extensión de los procesos astrocitarios y un soma fusiforme. La importancia de la ocurrencia de dichos cambios se basa en la formación de la cicatriz glial que limita la extensión del daño. Estos resultados corresponden con lo reportado previamente por Arias y colaboradores (2009), quienes reportaron similares respuestas en ratas ciclantes.

La baja o nula respuesta glial al KA en el hipocampo de ratas lactantes, apoya la idea de que no hubo respuesta inflamatoria en estas áreas. Esto puede explicarse por el hecho de que, debido a que durante la lactancia hay menor daño por el KA, la respuesta inflamatoria debe ser nula.

En el presente estudio, observamos que durante la lactancia, *per se*, se induce una forma redonda del soma de los astrocitos con procesos cortos. Podemos pensar que la posible consecuencia de estos cambios en la glía del giro dentado que se observan durante la lactancia, tenga alguna implicación en el funcionamiento del hipocampo, ya que los cambios morfológicos han sido asociados con una dinámica interacción con neuronas (Hirrlinger et al., 2004) a través de sus receptores. Los estudios *in vivo* e *in vitro*, han cuestionado el rol fisiológico de los receptores glutamatérgicos de la glía. La formación de filipodios como resultado de la activación de los receptores glutamatérgicos ha permitido detectar sinapsis activas y mediar cambios funcionales y morfológicos en el SNC (Steinhauser y Gallo, 1996). Posiblemente, los cambios en la morfología y cantidad de células gliales se relacionen con la modulación de la transmisión sináptica como ha sido demostrado en el SON de ratas lactantes (Piet et al., 2004, Bonfardin et al., 2010). Si bien, las características morfológicas en la respuesta

glial y los cambios observados son dependientes del sexo, del ciclo estral y del estado reproductivo de la hembra, queda por determinar su importancia fisiológica.

VIII.2 RESPUESTA MICROGLIAL

La microglía reacciona rápidamente cuando se presentan diferentes procesos neurodegenerativos y de lesión, produciendo citocinas y eliminando restos celulares por fagocitosis. Estos eventos se relacionan con un incremento en la proliferación microglial, la cual deriva de los progenitores residentes de la médula ósea, y pueden tener efectos neuroprotectores contra daño excitotóxico. Si bien, estas células se han visto implicadas en la restricción del daño y están moduladas por hormonas (Simard y Rivest, 2007); una proliferación sostenida de la microglía puede tener un efecto contrario. Aunque la microglía, y macrófagos residentes del SNC, responden casi a cualquier tipo de daño, aun no está bien definido si éstas juegan un rol importante en el restablecimiento de la homeostasis y de la restauración de la función del tejido.

En ratas nulíparas tratadas con KA, encontramos un aumento del número de células microgliales Iba1+ en el hipocampo como resultado de los efectos tóxicos del kainato. Además, la presencia de estas células fue observada de manera generalizada en el cerebro. Estos datos corresponden con lo reportado previamente por Andersson y colaboradores (1991), quienes describieron que la microglía responde a sitios distales que están relacionados con las rutas de proyección y terminales de las células piramidales que fueron dañadas después de un pulso de KA, tanto en ratones hembra como en machos. Incluso esta respuesta microglial se activa unas cuantas horas después de la inyección de KA y permanece reactiva hasta 35 días después de la inyección, al cabo de los cuales, estas células empiezan a disminuir en número. Además, otros estudios aportaron evidencia de que los monocitos humanos son quimiotácticos al KA, por lo que es posible pensar que la activación temprana de la microglía en el hipocampo sea un efecto directo del KA *per se* (Andersson et al., 1991). También, observamos que la proliferación microglial aumenta conforme se incrementa el tiempo de exposición al KA. El hecho de que se presente este aumento en

respuesta a la exposición prolongada a la excitotoxina, nos hace pensar en un efecto acumulativo: tanto del kainato *per se*, como se mencionó anteriormente, como del efecto de daño celular que sufre el tejido por los efectos tóxicos del KA. Es bien conocido que la microglía responde a citocinas tales como la IL-1 β y el TNF α , conocidas por expresarse durante situaciones que ponen en riesgo la integridad del tejido en el SN (infección, lesiones mecánicas, hipoxia/isquemia, neurodegeneración, etc.) y que están ligadas a la gliosis reactiva.

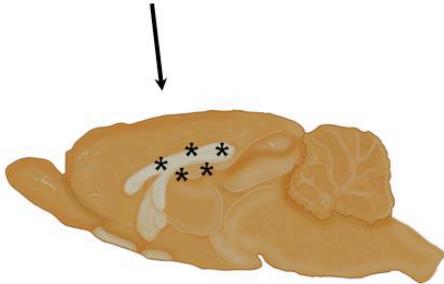
Debido a que las ratas lactantes expuestas al KA durante un tiempo corto (24 h) no presentaron incremento en el número de células microgliales, es posible especular que las hormonas durante esta etapa reproductiva, pudieran también estar modulando, no solo el efecto quimiotáctico del KA incidiendo en la represión de su activación, si no también estar participando en la modulación de la expresión de citocinas y la regulación del tiempo de la reactividad microglial evitando que ésta sea sostenida.

Debido a que el daño neuronal es mínimo, incluso 72 horas después de la inyección con KA en ratas lactantes (Cabrera et al., 2009), es posible pensar que la activación de la microglía iría en paralelo a la magnitud del daño.

Estos datos sustentan reportes previos a este trabajo por nuestro grupo de laboratorio, en los cuales observamos un escaso o nulo daño celular en el hipocampo de ratas lactantes tratadas con KA (Vanoye-Carlo et al., 2008 y Cabrera et al. 2009) y apoyan la idea de que el incremento de células GFAP+ en el giro dentado de ratas lactantes intactas (tratadas con vehículo), reportado en este trabajo, no es producto de la respuesta inflamatoria. En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de tesis nos abren la posibilidad de extender el análisis de este fenómeno de plasticidad tan interesante en el giro dentado durante la lactancia (Fig. 16).

Nulípara

Excitotoxina (KA)

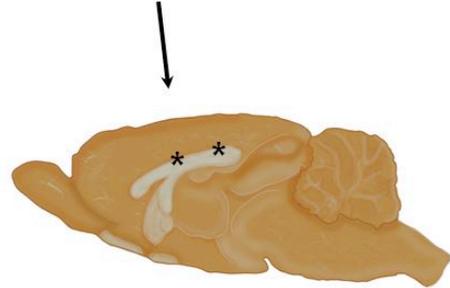


Clara respuesta astrocítica y microglial

Bajo: estradiol, progesterona y prolactina.
Corticosterona normal.

Lactante

Excitotoxina (KA)



**Respuesta astrocítica solo 72 h post
KA en el giro dentado
Nula respuesta microglial.**

Bajo: estradiol.
Alto: progesterona, prolactina y corticosterona.
Además: succión y estímulos exteroceptivos.

Fig. 17. Esquema que resume los resultados de este trabajo y las diferencias entre ratas nulíparas y lactantes.

IX. CONCLUSIONES

- I. La lactancia *per se*, induce la expresión de GFAP en el *hilus* del giro dentado, previene la respuesta glial que se presenta en el área CA1 y CA3 del hipocampo de ratas nulíparas después del daño ocasionado por ácido kaínico, y retrasa la respuesta glial en el giro dentado.
- II. Durante la lactancia se inducen cambios morfológicos en los astrocitos del *hilus* del giro dentado que se caracterizan por una disminución del número de procesos y forma redonda y aumentada del soma de estas células en CA3.
- III. El bajo número de células microgliales soportan la evidencia del fenómeno de neuroprotección en el hipocampo durante la lactancia, debido a que no hay un aumento de este tipo glial típico de la respuesta inflamatoria que se induce normalmente en respuesta a la lesión por KA en ratas durante el ciclo estral.

Las posibles explicaciones de este fenómeno observado durante la lactancia son:

- I. La menor cantidad de receptores glutamatérgicos, incluidos los AMPA y kainato (Standley, 1999) en el hipocampo durante el embarazo.
- II. La exposición crónica a las hormonas de la lactancia, principalmente prolactina y progesterona, y sus posibles consecuencias sobre neurotransmisión e inflamación.
- III. El ambiente enriquecido que representa la maternidad.
- IV. El mayor número de astrocitos en el giro dentado de la rata lactante que pudiera regular la neurotransmisión.
- V. La menor respuesta glial después de la lesión con KA. En las ratas nulíparas, la respuesta astrocítica pudiera exacerbar la reacción inflamatoria a la lesión.

X. REFERENCIAS

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.* 25, 323-332.

Andersson P.B., Perry V.H., Gordon S. 1991. The kinetics and morphological characteristics of the macrophage-microglial response to kainic acid induced neuronal degeneration. *Neuroscience* 42, 201-14.

Arias C., Zepeda A., Hernández-Ortega K., Leal-Galicia P., Lojero C., Camacho-Arroyo I. 2009. Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus. *Horm. Behav.* 55, 257–263.

Azcoitia I., García Ovejero D., Chowen J.A., García-Segura L.M. 2001. Astroglía play a key role in the neuroprotective actions of estrogen. *Prog. Brain Res.* 132, 469-478.

Barreto G., Veiga S., Azcoitia I., García-Segura L.M., García-Ovejero D. 2007. Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, estradiol and dihydrotestosterone. *Eur. J. Neurosci.* 25, 3039–3046.

Ben-Ari Y., Cossart R. 2000. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends. Neurosci.* 23, 580-587.

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.

Bonfardin V., Fossat P., Theodosis D. T., and Oliet S. 2010. Glia-Dependent Switch of Kainate Receptor Presynaptic Action. *J. Neurosci.* 30(3), 985–995.

Boudaba C., Linn D.M., Halmos K.C., Tasker J.G. 2003. Increased tonic activation of presynaptic metabotropic glutamate receptor in the rat supraoptic nucleus following chronic dehydration. *J. Physiol.* 551, 815– 823.

Buffo A., Rite I., Tripathi P., Lepier A., Colak D. 2008. Origin and progeny of reactive gliosis: a source of multipotent cells in the injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 3581-86.

Cabrera V., Cantu D., Ramos E., Vanoye-Carlo A., Cerbón M., Morales T. 2009. Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity. *Neurosci. Lett.* 461(2), 136-139.

Chen Y., Swanson R.A. 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23(2):137-49.

Chen L.W., Hu H.J., Liu H.L., Yung K.K., Chan Y.S. 2004. Identification of brain-derived neurotrophic factor in nestin-expressing astroglial cells in the neostriatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *Neuroscience.* 126(4):941-53.

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.

Conejo N.M., González-Pardo H., Cimadevilla J.M., Argüelles J.A., Díaz F., Vallejo-Seco G., Arias J.L. 2005. Influence of gonadal steroids on the glial fibrillary

acidic proteinimmunoreactive astrocyte population in young rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 79, 488–494.

Cooke B.M., Woolley C.S. 2005. Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS. *J. Neurobiol.* 64, 34–46.

Day J.R., Laping N.J., Lampert-Etchells M., Brown S.A., O'Callaghan J.P., McNeill T.H., Finch C.E. 1993. Gonadal steroids regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the adult male rat hippocampus. *Neuroscience* 55, 435–443.

Del Cerro, S., García-Estrada, J., García-Segura, L.M. 1995. Neuroactive steroids regulate astroglia morphology in hippocampal cultures from adult rats. *Glia.* 14, 65–71.

De Vito W.J., Stone S., Avakian C. 1992. Prolactin-estimated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 130, 2549-2556.

Fawcett J.W., Asher R.A. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 49, 377-91.

Fawcett JW. 2006. Novel strategies for protection and repair of the central nervous system. *Clin Med.* 6, 598-603.

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, 158-72.

Fizman M.L. 2003. Neuroprotección y factores tróficos. *Revista Neurológica Argentina.* 28, 6-10.

Frerking M., Nicoll R.A. 2000. Synaptic kainite receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 342-351.

Furuta S. y Bridges R.S. 2005. Gestation-induced cell proliferation in the rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 156, 61– 66.

Galea L.A. 2008. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res.* 57, 332–341.

Galea L.A., Spritzer M.D., Barker J.M., Pawluski J.L., 2006. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus.* 16, 225–232.

Garcia-Estrada J., Del Rio J.A., Luquin S., Soriano E., Garcia-Segura L.M. 1993. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res.* 19, 271-8.

García-Ovejero D., Veiga S., García-Segura L.M., DonCarlos L.L. 2002. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J. Comp. Neurol.* 450, 256–271.

Garcia-Segura L.M., Baetens D., Naftolin F. 1986. Synaptic remodelling in arcuate nucleus after injection of estradiol valerate in adult female rats. *Brain Res.* 366, 131–136.

Garcia-Segura L.M., Chowen J.A., Dueñas M., Parducz A., Naftolin F. 1996. Gonadal steroids and astroglial plasticity. *Cell Mol. Neurobiol.* 16, 225–237.

Gates M.A., Dunnett S.B. 2001. The influence of astrocytes on the development, regeneration and reconstruction of the nigrostriatal dopamine system. *Restor Neurol Neurosci.* 19, 67-83.

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.

Kinouchi R., Takeda M., Yang L., Wilhelmsson U., Lundkvist A., Pekny M., Chen D.F. 2003. Robust neural integration from retinal transplants in mice deficient in GFAP and vimentin. *Nat Neurosci.* 6, 863-8.

Kinsley C.H., Lambert K.G. 2008. Reproduction-induced neuroplasticity: natural behavioural and neuronal alterations associated with the production and care of offspring. *J. Neuroendocrinol.* 20, 515-525.

Kinsley C.H., Madonia L., Gifford G.W., Tureski K., Griffin G.R., Lowry C., Williams J., Collins J., McLearnie 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.

Le Roux P.D., Reh T.A. 1996. Reactive astroglia support primary dendritic but not axonal outgrowth from mouse cortical neurons in vitro. *Exp Neurol.* 137, 49-65.

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, 111-29.

Magistretti P.J. 2006. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol.* 209, 2304-11.

Menet V., Giménez y Ribotta M., Chauvet N., Drian M.J., Lannoy J., Colucci-Guyon E., Privat A. 2001. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci.* 15, 6147-58.

Milner T.A., McEwen B.S., Hayashi S., Li C.J., Reagan L.P., Alves S.E. 2001. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J. Comp. Neurol.* 429, 355–371.

Mödersheim 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, 963-73.

Neville M.C., McFaden T.B., Forsyth I. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 7, 49-66.

Newman E.A. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 26, 536-42.

Nilsson M., Pekny M. 2007. Enriched environment and astrocytes in central nervous system regeneration. *J. Rehabil. Med.* 39, 345–352.

Oliet S.H., Piet R., Poulain D.A. 2001. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292, 923–926.

Palomero-Gallagher N., Bidmon H.J., Zilles K. 2003. AMPA, kainate and NMDA receptor densities in the hippocampus of untrated male rats and females in estrus and diestrus. *J. Comp. Neurol.* 459, 468-474.

Pascual-Leone A., Amedi A., Fregni F., Merabet L.B. 2005. The plastic human brain cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 377-401.

Pawluski J.L., Galea L.A. 2006. Hippocampal morphology is differentially affected by reproductive experience in the mother. *J. Neurobiol.* 66, 71-81.

Pawluski J.L., Brummelte S., Barha C.K., Crozier T.M., Galea L.A. 2009. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 343–357.

Piet R., Vargova L., Sykova E., Poulain D.A., Oliet S.H. 2004. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2151–2155.

Rodríguez-Moreno A. 2003. Receptores de kainato. Función en la regulación de la transmisión sináptica gabaérgica en el hipocampo., *Rev. Neurol.* 36(9), 852-859.

Rozovsky I., Wei M., Stone D.J., Zanjani H., Anderson C.P., Morgan T., Finch C.E. 2002. Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. *Endocrinology* 143, 636–646.

Salmaso N., Nadeau J., Woodside B. 2009. Steroid hormones and maternal experience interact to induce glial plasticity in the cingulate cortex. *Eur. J. Neurosci.* 29, 786-794.

Salmaso N., Popeski N., Peronace L. A., Woodside B. 2005. Differential effects of reproductive and hormonal state on basic fibroblast growth factor and glial fibrillary acid protein immunoreactivity in the hypothalamus and cingulate cortex of female rats. *Neuroscience* 134, 1431-1440.

Salmaso N. y Woodside B. 2008. Fluctuations in astrocytic basic fibroblast growth factor in the cingulate cortex of cycling, ovariectomized and postpartum animals. *Neuroscience* 154, 932-939.

Sandvig A., Berry M., Barrett L.B., Butt A., Logan A. 2004. Myelin, reactive glia and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*. 46, 225-51.

Sasaki T., Hirabayashi J., Manya H., Kasai K., Endo T. 2004. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology*. 14, 357-63.

Shingo T., Gregg C., Enwere E., Fujikawa H., Hassam R., Geary C., Cross, J.C., Weiss S. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299, 117–120.

Standley C.A. 1999. N-methyl-D-aspartate receptor binding is altered and seizures potential reduced in pregnant rats. *Brain Res.* 844, 10-19.

Steinhäuser C. y Gallo V. 1996. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* 19(8), 339-345.

Stone, D.J., Song, Y., Anderson, C.P., Krohn, K.K., Finch, C.E., Rozovsky, I. 1998. Bidirectional transcription regulation of glial fibrillary acidic protein by estradiol *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 139, 3202–3209.

Storer P.D., Jones K.J. 2003. Glial fibrillary acidic protein expression in the hamster red nucleus: effects of axotomy and testosterone treatment. *Exp. Neurol.* 184, 939–946.

Struble R.G., Afridi S., Beckman-Randall S., Li M., Cady C., Nathan B., McAsey M.E. 2006. Neocortical and hippocampal glial fibrillary acidic protein immunoreactivity shows region-specific variation during the mouse estrous cycle. *Neuroendocrinology* 83, 325–335.

Simard A.R. y Rivest S. 2007. Neuroprotective effects of resident microglia following acute brain injury. *J. Comp. Neurol.* 504, 716–729.

Tanapat P., Hastings N.B., Reeves A.J., Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J. Neurosci.* 19, 5792–5801.

Teichberg V. I. 1991. Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *FASEB J.* 5, 3086-3091.

Tejadilla D, Cerbón M, Morales T. 2010. Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neurosci.* 169, 1178-85.

Tournell C.E., Bergstrom R.A., Ferreira A. 2006. Progesterone-induced agrin expression in astrocytes modulates glia-neuron interactions leading to synapse formation. *Neuroscience* 141, 1327–1338.

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.

Theodosis D.T. 2002. Oxytocin-secreting neurons: a physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* 23, 101–135.

Tooyama I., Bellier J.P., Park M., Minnash P., Uemura S., Hisano T., Iwami M., Aimi Y., Yasuhara O., Kimura H. 2002. Morphologic study of neuronal death, glial activation, and progenitor cell division in the hippocampus of rat models of epilepsy. *Epilepsia* 43(9), 39-43.

Vanoye-Carlo A., Mendoza-Rodríguez C.A., Rangel C., Rodríguez-Dorantes M., Morales T., Cerbón M.A. 2008. Perfil de expresión del hipocampo de la rata lactante en respuesta a la administración de kainato mediante el uso de microarreglos. Memorias del XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Mérida, Yucatán, del 16 al 21 de noviembre de 2008.

Vanoye-Carlo A., Morales T., Ramos E., Mendoza-Rodríguez A., Cerbón M. 2008. Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Horm. Behav.* 53, 112-123.

Wang D., Bordey A. 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* 86, 342-67.

Wang J., Tanila H., Puoliväli J., Kadish I., van Groen T. 2003. Sex differences in the amount and deposition of amyloid β in APP^{swe} and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 14, 318–327.

Wang Y.F., Hatton G.I. 2009. Astrocytic plasticity and patterned oxytocin neuronal activity: dynamic interactions. *J. Neurosci.* 29, 1743-54.

Waters T.A., Torres-Reveron A., McEwen B.S., Milner T.A. 2008. Ultrastructural localization of extranuclear progesterin receptors in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 511, 34–46.