



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS JURQUILLA**

**PAPEL DE LAS HORMONAS OVÁRICAS EN LA NEUROPROTECCIÓN
DEL HIPOCAMPO DURANTE LA LACTANCIA**

Tesis que para obtener el grado de Licenciado en Psicología

Presenta:

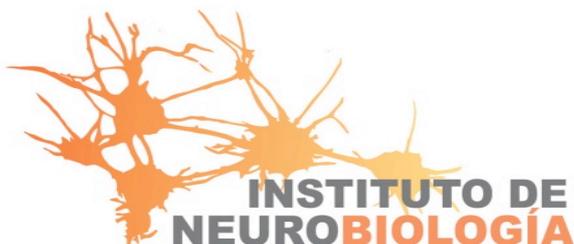
José Luis Ortega Sáenz

Directora de Tesis:

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Revisor:

Dr. Fernando Peña Ortega





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el laboratorio D-05 del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología campus Juriquilla, Querétaro, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Morales Guzmán.

Recibió la invaluable revisión, comentarios, críticas y sugerencias del Dr. Fernando Peña Ortega.

Recibió el apoyo técnico del personal del INB:

Biol. María Eugenia Ramos.

Dr. Flavio Mena Jara.

M.V.Z Alejandra Castilla León.

M. en C. Nilda Adela Navarro Padilla.

Laboratorista Víctor Pérez.

M.V.Z Martín García Servín.

I.S.C. Elsa Nydia Hernández Ríos

Esta tesis contó con el apoyo de recursos otorgados por PAPIIT-UNAM (IN202812) y CONACYT 128090.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes siempre me han apoyado en todo, esto es de ustedes. Gracias!

Agradezco infinitamente a mi querido Instituto de Neurobiología por darme la oportunidad de crecer en mi vida profesional, brindándome las herramientas necesarias para la realización de esta tesis, por el crecimiento científico brindado durante este año de trabajo y por enseñarme el significado del trabajo profesional en la investigación científica.

A Mariela Ramos quien hizo posible en algún momento mi estancia en Querétaro, gracias por el apoyo brindado, ya que sin ella, hubiera sido más difícil llegar a estas instancias. Y por último darle las gracias porque me dejó muchas cosas buenas como persona profesional, pero más que nada como ser humano.

A la ciudad de Querétaro que me hizo ver cosas más allá de lo evidente y me hizo ser una mejor persona, dándome crecimiento científico y personal pero sobre todo, espiritual.

A mi tutora la Dra. María Teresa Morales Guzmán por el apoyo brindado durante este tiempo ya que sin él, hubiera sido más difícil llegar a esta meta. Por último, darle las gracias por el crecimiento intelectual y científico que me brindó durante este tiempo.

A mi técnico académico María Eugenia Ramos (Maru) por la atención brindada durante todo este tiempo de trabajo, muchas gracias por la paciencia, por los consejos y el conocimiento dado.

A mi revisor, el Dr. Fernando Peña Ortega por su tiempo y trabajo en mi formación, por sus consejos académicos y apoyo en general desde mi llegada al INB.

Al Dr. Hugo Merchant por sus consejos, por recordarme siempre que aún no llego a mi meta y por ser un ejemplo a seguir como investigador y persona.

A todo el personal del laboratorio D-05 que me brindo su ayuda en todos mis experimentos, a Víctor Pérez quien hizo mi estancia en el laboratorio más agradable, por esas escapadas a desayunar y por cuidar de mis animales en mi ausencia.

A mis primos Jorge Ortega Moody y Miescha Kay, que me apoyaron desde un principio que llegué a Querétaro.

A pilo y a toda su familia que me brindaron un techo y comida durante los primeros meses de mi llegada, por darme ese calor de familia y hacerme sentir un miembro más de ellos. Gracias por el apoyo brindado.

A todos mis compañeros y amigos de la facultad de Psicología quienes hicieron mi paso por la universidad algo inolvidable y hasta el momento la etapa más maravillosa de mi vida. Todos los que vivieron y compartieron conmigo todos estos años, desde los primeros días hasta los últimos. Gracias por todos los momentos vividos y compartidos, todos ustedes tienen un lugar especial en mi sistema límbico.

A todos mis maestros de la facultad por su tiempo, dedicación y formación.

A mi maestro, psicólogo y amigo, Gustavo Patiño por sus consejos durante la carrera.

A mi padre académico el Dr. Eduardo Calixto quién es piedra angular en mi formación, pero sobre todo por enseñarme el camino de lo que hoy en día tanto quiero y hago con gusto que es la Ciencia.

Y por último, precisamente porque los últimos siempre serán los primeros, a Dios y a todos esos ángeles mandados para darme dirección y luz en mi camino, ya que sin ellos, seguramente seguiría perdido.

Esta tesis fue realizada con el apoyo económico de proyecto PAPIIT-UNAM IN202812 y CONACYT 128090.

A todos..... GRACIAS !!!

DEDICATORIAS

Esta tesis esta dedicada a toda mi familia, en especial a mis padres **José Luis Ortega Anaya** y **María Elena Sáenz Herrera**, que de no haber sido por su apoyo y **confianza** incondicional en algún momento en mí, no hubiera podido llegar a obtener este logro, que es más de ellos que mío. Les agradezco infinitamente porque gracias a ustedes soy la persona que soy en un presente siempre los honrará porque es lo único que tengo que ofrecerles, éste trabajo se los dedico, LOS AMO!

A mi alma mater la UNAM que me dio mi formación, siendo ésta, un escudo y una espada para afrontar los retos que me esperan en un futuro. Siempre portaré orgullosamente tu escudo en mi corazón y te honraré en mi vida profesional como un buen Psicólogo. GRACIAS UNAM!

A mis amigos **Jorge Alberto Villar, Martín Beltrán, Germaín Correa, Israel Alejandro Reyes**. Ustedes mejor que nadie saben que soy una persona de pocas palabras, pero hoy quiero darles las gracias. Gracias porque me han acompañado a lo largo de este viaje, gracias por el apoyo que me han brindado, gracias por las borracheras, por los consejos, por los buenos momentos y las mujeres que hemos disfrutado y que seguiremos gozando, gracias por esas mentadas de madre con significado a te quiero, gracias por ayudarme a tener ese equilibrio que toda persona necesita, ésta se las dedico amigos....

Si pensaste que ya te había olvidado, NO LO HAGAS NUNCA! Te lo dedico a ti que eres el amor de mi vida... **MI FACULTAD DE PSICOLOGÍA!** Gracias por todos los momentos que me hiciste pasar, gracias por todas las personas que conocí gracias a ti, por tu formación, por tus clases, por tus exámenes, por tus retos, por hacerme tan feliz y darme este conocimiento que llevo y comparto siempre que puedo. Quiero que sepas que a todo lugar que valla te voy a honrar con trabajo, estudio y ética, y siempre diré orgullosamente que soy tu hijo. **FACULTAD DE PSICOLOGIA SIEMPRE SERAS EL AMOR DE MI VIDA!**

Goya...!

RESUMEN

La experiencia reproductiva induce modificaciones morfológicas y funcionales en diversas áreas del cerebro de la hembra en los mamíferos. Durante la fase de lactancia, las hormonas y el estímulo de succión, tienen un papel preponderante en los procesos de plasticidad cerebral de la madre. Estudios previos de nuestro grupo han documentado que la lactancia protege al hipocampo dorsal de la rata contra daño excitotóxico inducido por la administración sistémica o intracerebral de ácido kaínico (AK), en comparación con ratas vírgenes en diestro. La lactancia se caracteriza por fluctuaciones hormonales altas, principalmente; prolactina, oxitocina, estrógenos, progesterona y corticosteroides. En el presente estudio nos interesó determinar si la ausencia de hormonas ováricas durante la lactancia incrementaba el daño excitotóxico en el hipocampo dorsal de la rata lactante. Para ello, se utilizaron ratas lactantes ovariectomizadas (OVX) el día dos post parto o intactas (SHAM) y fueron inyectadas el día 15 post parto con una única dosis sistémica de 7.5 mg/kg p.c de AK y con su vehículo correspondiente. El daño celular fue determinado en las áreas, CA1, CA3 y CA4 del hipocampo por conteo del número de células teñidas con la tinción de NISSL.

Los resultados mostraron que el daño excitotóxico causado por el AK fue mayor en las ratas lactantes OVX, ya que el número de células en las diferentes regiones del hipocampo analizadas (CA1, CA3 y CA4) fue menor en las ratas OVX-AK, en comparación con el grupo de las ratas intactas (SHAM). Por otro lado, los grupos que recibieron únicamente solución salina (SHAM-SAL), no mostraron diferencias significativas entre ellos.

Los resultados obtenidos mostraron que la pérdida celular en las regiones analizadas del hipocampo de ratas lactantes ovariectomizadas OVX-AK fue similar al de las ratas vírgenes en la fase de diestro tratadas con AK (Virgen-AK). Estos resultados sugieren que las hormonas ováricas, en efecto, participan en el fenómeno de neuroprotección durante la lactancia, ya que la falta de exposición a las hormonas ováricas en esta fase, hizo mas vulnerable al hipocampo de las hembras ante la lesión excitotóxica.

Financiado por PAPIIT-UNAM IN 202812 y CONACYT 128090.

*Hay quienes no desean ser libres para no tener que escoger;
Hay quienes no desean ser dignos para no tener que pensar.*

Burrhus Frederic Skinner

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1.- Conceptos Teóricos	2
I.1.1 Lactancia	2
I.1.2 Plasticidad neuronal	5
I.1.3 Plasticidad del hipocampo en la lactancia	6
I.1.4 Neuroprotección	7
I.1.5 Excitabilidad neuronal y excitotoxicidad	8
I.1.6 Daño neuronal	12
I.2.- Hipocampo	14
I.2.1 Hipocampo y glutamato	19
I.3.- Modelo experimental	20
I.3.1 Justificación del modelo experimental	20
II. ANTECEDENTES	20
II.1.1 Hormonas durante el ciclo reproductivo	20
II.1.2 Plasticidad del hipocampo en la lactancia	23
II.1.3 Hipocampo y hormonas en la lactancia	24
II.1.4 Acciones de los estrógenos	25
II.1.5 Acciones de la progesterona	26
II.1.6 Neuroprotección durante la lactancia	28
III. JUSTIFICACIÓN	29
IV. HIPÓTESIS	30

V. OBJETIVOS.....	30
V.1.1 Objetivo General.....	30
V.1.2 Objetivos particulares.....	30
VI. MATERIAL Y MÉTODO.....	31
VI.1 Animales.....	32
VI.1.1 Ratas lactantes intactas y OVX.....	32
VI.1.2 Vírgenes.....	32
VI.2 Paradigmas experimentales.....	32
VI.3 Histología.....	33
VI.3.1 Perfusión y obtención de cortes.....	33
VI.3.2 Tinción de Nissl.....	34
VI.4 Análisis estadístico.....	36
VII. RESULTADOS.....	37
VII.1 Tinción de Nissl.....	38
VII.2 Tasa de crecimiento de las crías.....	40
VIII. DISCUSIÓN.....	41
IX. CONCLUSIONES.....	45
X. BIBLIOGRAFÍA.....	46

I. INTRODUCCIÓN.

Durante la experiencia reproductiva se generan modificaciones anatómico-funcionales en el cerebro de las hembras de los mamíferos. Estos cambios inician con la fecundación y finalizan con el destete [1]. Las modificaciones que se llevan a cabo en el cerebro de la madre, favorecen un mejor desempeño y adaptación para el cuidado de la progenie durante las primeras etapas del desarrollo [2]. Los cambios adaptativos que se presentan durante la maternidad incluyen modificaciones fisiológicas, anatómicas y conductuales, dando como resultado la aparición de conducta maternal y lactogenesis (lactancia). Los cambios endocrinos más importantes, se presentan durante el embarazo y la lactancia. Estos cambios en las concentraciones hormonales, implican a las hormonas esteroideas (como estrógenos, progesterona y cortisol), y a las hormonas peptídicas (como la prolactina y oxitocina) [3, 4]. La alta fluctuación de hormonas, genera procesos de neuroprotección como parte de la plasticidad cerebral que se lleva a cabo durante estos periodos [5]. En este sentido, las mayores modificaciones estructurales y funcionales que se dan en el cerebro de la madre, ocurren durante la lactancia debido a la estimulación de succión brindada por la progenie, generando a su vez los altos niveles hormonales. La lactancia representa un estado en donde señales internas desencadenan una reorganización sistemática, que es mantenida por estímulos aferentes (entrada), incluyendo la succión, produciendo respuestas eferentes (salida) adaptativas. El trabajo de plasticidad en el cerebro materno se ha centrado en el hipotálamo y estructuras límbicas asociadas con la fisiología de la lactancia [6, 7]. Las alteraciones morfológicas inducidas por la lactancia incluyen remodelación de la estructura celular en los núcleos del hipotálamo y otras áreas del cerebro especialmente del sistema límbico, en donde los cambios funcionales incluyen una gran variedad de modificaciones relacionadas con la neurotransmisión, estrés, ansiedad, desempeño cognitivo como el aprendizaje y memoria, y particularmente aquéllas relacionadas con la conducta maternal [8, 9]. A raíz de esto, estudios recientes han examinado los cambios dinámicos y las consecuencias de éstos en el cerebro materno, especialmente en el hipocampo. De la misma manera, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el hipocampo dorsal de la rata lactante es menos sensible ante el daño excitotóxico por la administración de ácido kaínico [10, 11].

I.1 Conceptos Teóricos

I.1.1 Lactancia

«Creo que mejor me dedicaré a estudiar el otro misterio

más grande de la humanidad: la mujer»

DR. EMMETT BROWN.

La lactancia es la fase final del ciclo reproductivo de los mamíferos, y es un estado fisiológico hiperprolactinéxico y transitorio que tiene como finalidad proporcionar alimentación y un desarrollo sano a las crías recién nacidas [3]. La lactancia en las hembras de los mamíferos se presenta posterior al parto y es generada por factores endocrinos (secreción de hormonas) y externos (estimulación de las crías). Este periodo es fundamental para la vida y supervivencia de las crías y por lo tanto, de la especie misma [4].

La lactancia es una de las características más importantes dentro del desarrollo de la conducta materna debido a que es exclusiva de las hembras. Durante este periodo los factores endocrinos y exteroceptivos, generan modificaciones anatómico-funcionales en el cerebro de la madre con la finalidad de promover el cuidado y producción de leche para la progenie [4]. Las hembras de los mamíferos, desde los roedores hasta los humanos, pasan por importantes cambios fisiológicos y conductuales durante su ciclo reproductivo. El ciclo reproductivo comprende varias fases estrechamente relacionadas como son: la gestación, el parto y la lactancia. La transición entre estas fases implica que, lo que antes era un organismo dedicado a satisfacer únicamente sus necesidades y ver por su supervivencia, ahora necesita adaptarse a las demandas de su progenie y redirigir todos sus recursos disponibles para procurar la supervivencia de la misma [3, 4]. Tales adaptaciones conllevan a cambios en la fisiología general de la madre, en especial, en aspectos metabólicos, neuroendocrinos y conductuales [12-14]. Asimismo, antes del nacimiento, el consumo energético de la madre es mayor que el del macho para proveer de los recursos suficientes a la progenie durante la lactancia. En los roedores, las hembras preñadas, aumentan su ingesta diaria de calorías en un rango de 18% a 25% comparado con el de los machos o hembras vírgenes [1].

En los mamíferos, el gasto energético en las hembras alcanza su pico máximo durante la lactancia alcanzando de 2.5 a 5 veces más, en comparación con las hembras que no se encuentran en estado de reproducción. Además su ingesta calórica se incrementa en un 200%, dependiendo parcialmente del tamaño de la camada [1]. Los primeros cambios en los

factores endocrinos y fisiológicos durante el ciclo reproductivo de la hembra son iniciados primeramente, por la fecundación e implican principalmente a las hormonas esteroideas como son los estrógenos, la progesterona, el cortisol y también a las hormonas peptídicas; oxitocina y prolactina que preparan a las glándulas mamarias para la lactancia. Durante la lactancia la madre también se encuentra expuesta a un ambiente enriquecido ya que las crías durante este periodo mantienen estimulando todos sus sentidos [4]. Las hembras lactantes pueden mostrar cambios fisiológicos marcados como hipertrofia en el hígado, riñones, órganos del tracto digestivo, además de afectar la fecundidad a través de varios mecanismos [15, 16]. De la misma manera, la estimulación en los pezones de la madre genera cambios hormonales que prolongan el periodo post-lactante de anestro e impide una siguiente preñez [110].

La lactancia es sin duda uno de los procesos más importantes en la vida de cualquier mamífero ya que al nacer depende totalmente de la alimentación brindada por la madre. Esta alimentación, proporciona diversos nutrientes y sustancias bioactivas como factores de crecimiento, proteínas, hormonas y péptidos biológicamente importantes para el crecimiento de la progenie que se transmiten a través de la leche [17, 18]. Estos factores que se encuentran en la leche durante este periodo son mayores a diferencia de los que se encuentran en el plasma materno [19]. Algunos de estos nutrientes son transportados a la leche por medio de la circulación sin sufrir cambios en su estructura y otros al parecer son modificados a través de glicosilación, fosforilación y proteólisis, dentro de la glándula mamaria (*Tabla 1*). Estas concentraciones elevadas de factores de crecimiento en la leche son relevantes por tres aspectos; 1) Los factores bioactivos de la leche pueden influir en el desarrollo/función de la glándula mamaria. Por ejemplo, las concentraciones altas de factores de crecimiento insulínico (IGFs) en las glándulas mamarias, coincide con el desarrollo y crecimiento de éstas durante el final del embarazo, 2) el mantenimiento y el cese de la lactancia, esta fuertemente influenciado por factores de crecimiento presentes en las secreciones mamarias, 3) las sustancias bioactivas de la leche, funcionan transfiriendo nutrientes en la regulación de crecimiento y diferenciación de varios tejidos en los neonatos [19]. La producción y expulsión de leche depende parcialmente de factores endocrinos para que se pueda llevar a cabo. Dentro de estos factores endocrinos u hormonales se encuentra la prolactina y la oxitocina, que son hormonas producidas y secretadas por la adenohipófisis [17]. Con base en esto y considerando la diversidad biológica de las especies de mamíferos existentes, podemos decir, que la lactancia es uno de los procesos mas importantes tanto en la ontogenia como en la filogenia de los mamíferos.

<ul style="list-style-type: none"> • *Hormonas hipofisarias 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Prolactina (PRL), hormona del crecimiento (GH), Hormona estimulante de la tiroides (TSH), Hormona foliculo estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), Adrenocorticotropina (ACTH), Oxitocina.</i>
<ul style="list-style-type: none"> • *Hormonas esteroideas 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Estradiol, Estriol, Progesterona, Testosterona, corticosterona, Vitamina D.</i>
<ul style="list-style-type: none"> • *Hormonas hipotalámicas 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Hormona estimulante de la tiroides (TRH), Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), Factor inhibidor de Prolactina, Factor liberador de prolactina, Hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GRF).</i>
<ul style="list-style-type: none"> • *Péptidos gastrointestinales 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Gastrina, bombesina, péptido inhibitorio gástrico, sustancia P, Neurotensina.</i>
<ul style="list-style-type: none"> • *Factores de crecimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Factores de crecimiento insulínico (IGFs).</i>
<ul style="list-style-type: none"> • *Hormonas tiroideas y paratiroideas 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>T3, T4, rT3, Calcitocina, PHT.</i>
<ul style="list-style-type: none"> • *Otros 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Prostaglandinas (PGE), cAMP, cGMP, Eritropoyetina.</i>

TABLA 1. Sustancias bioactivas en la leche. Se muestran las principales sustancias que se encuentran dentro de la leche, todas ellas importantes para el fortalecimiento y crecimiento de la progenie. (Modificado de Grosvenor y cols., 1992).

Dada la reorganización anatómica y funcional en el cerebro de la hembra de los mamíferos durante el ciclo reproductivo, éste se ha considerado un modelo natural de plasticidad morfológica, neuroquímica, y funcional del SNC. A raíz de estos eventos, existe una remodelación en áreas cerebrales que regulan el aprendizaje, la memoria, la agresividad (para protección de la camada), conducta depredadora, la respuesta neuroendocrina al estrés y al miedo, dando como resultado una atenuación en éstos últimos dos. De la misma manera, se ha demostrado que algunos de estos cambios que le confieren ventajas cognitivas a la madre persisten a largo plazo, aún cuando la hembra ha llegado a la vejez. Esta etapa, es un ejemplo del fenómeno conocido como plasticidad cerebral [4, 20].

I.1.2 Plasticidad Neuronal

«Ciencia es el largo camino que recorreremos para aprender
a no engañarnos a nosotros mismos»

RICHARD FEYNMAN.

El sistema nervioso tiene propiedades para adaptarse a los cambios generados en el medio ambiente y en el mismo organismo, dentro de estas propiedades se encuentra la “*plasticidad neuronal*” [20].

La *plasticidad* es la propiedad o capacidad intrínseca del sistema nervioso (SN), de generar cambios bioquímicos, moleculares, celulares, estructurales y funcionales con la finalidad de adaptarse a las variaciones del medio ambiente y minimizar los efectos aversivos en caso de una lesión y/o envejecimiento [20]. El término *plasticidad* fue dado por primera vez por el Psicólogo Americano William James al referir la susceptibilidad de modificación de la conducta humana, refiriéndose mayormente a modificaciones conductuales [21].

El cerebro es la fuente de la conducta humana, su estructura es influenciada por cambios ambientales, por la experiencia y también por modificaciones psicológicas, entre otras. En otras palabras, estas modificaciones son similares a los mecanismos que se presentan a lo largo del desarrollo ontogénico o al momento de adquirir un nuevo aprendizaje. De esta manera, todos los cambios que se generen en las aferencias (entrada) de cualquier sistema neuronal, aunado a los objetivos o demandas de las conexiones eferentes (salida) van a llevar a que el sistema presente una reorganización en sus redes neuronales.

Este tipo de cambios ó reorganización pueden ser demostrables en niveles conductuales, anatómicos, fisiológicos, celulares y moleculares [20]. Los procesos neuronales que se engloban dentro de la plasticidad neuronal son; crecimiento dendrítico, arborización, sinaptogénesis, neurogénesis, cambios en las funciones de las células gliales y mecanismos de protección neuronal (neuroprotección) [2, 20, 22].

De la misma manera, el desarrollo de nuevas tecnologías ha brindado la ventaja de poder estudiar este fenómeno en diferentes niveles y enfoques experimentales, los cuáles pueden ser: farmacológico, fisiológico, bioquímico, conductual, inmunológico y molecular (Brailowsky, 1998). Sin lugar a dudas, la plasticidad es una forma en que nuestro organismo y principalmente el cerebro nos muestra su capacidad para realizar modificaciones en sus funciones y compensar en un momento dado daños en el mismo [22]. Otro factor importante,

es que el cerebro tiene la capacidad de protegerse a si mismo para aminorar daños en un momento determinado. Se piensa que el estudio de estos mecanismos protectores ayudaría en gran forma a entender y explicar los procesos de muerte neuronal que se generan en diversas enfermedades neurodegenerativas.

Una de las formas como se hace mas evidente la plasticidad es cuando ocurre una lesión cerebral, enfocándose a atenuar las consecuencias de la lesión. Sin embargo, la plasticidad cerebral es un proceso que se encuentra activo durante toda la vida, generando cambios que favorecen la adaptación ante situaciones novedosas. Este mecanismo, puede observarse a cualquier edad y varía según el ambiente, género y estado fisiológico o endocrino del organismo; un ejemplo claro de esto, es la lactancia [2, 20, 23].

I.1.3 Plasticidad del hipocampo en la lactancia

Como ya se mencionó anteriormente, la transición a la maternidad que se lleva a cabo en las hembras de los mamíferos, genera una serie de adaptaciones neurobiológicas para poder satisfacer las necesidades que les impone su descendencia. En algunas cepas de roedores, se han observado modificaciones conductuales durante estos periodos, acompañadas de cambios en ciertas áreas del cerebro como el hipocampo, amígdala e hipófisis, generando neuroplasticidad más allá de las alteraciones hipotalámicas esperadas [2]. Los cambios en el hipotálamo, incluyen cambios conductuales en la madre y cambios en el volumen celular del área preóptica medial, así como una reorganización de las células oxitocinérgicas de los núcleos supraóptico y paraventricular durante el embarazo y la lactancia. Además, atenúa la respuesta al estrés y a la ansiedad [14, 24].

Por otra parte, el hipocampo es una de las estructuras implícitas en procesos cognoscitivos, principalmente, en el aprendizaje y la memoria. Diversos estudios han reportado, que durante la maternidad se genera una modificación en la concentración de las espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo [9]. De la misma manera, se observa un mejor desempeño en tareas de aprendizaje espacial y una disminución en marcadores de envejecimiento neuronal [24].

I.1.4 Neuroprotección

« El cerebro es mi segundo órgano en importancia.»

WOODY ALLEN

Uno de los procesos neuronales englobados dentro de la plasticidad neuronal del SNC es el de la protección neuronal o neuroprotección. Se piensa que este mecanismo se ha desarrollado a lo largo de la evolución y tiene como función principal la protección y adaptación ante factores dañinos [20].

La neuroprotección ha sido definida como el conjunto de mecanismos celulares dirigidos a prevenir, limitar o aminorar las lesiones que se puedan desencadenar como resultado de algún daño o muerte neuronal [25]. Estos mecanismos les permiten a los organismos cambiar su medio interno para poder adaptarse de manera más fácil y rápida al medio externo; dentro de estos mecanismos se encuentran los factores endógenos neuroprotectores. Esto es un claro ejemplo del tipo de ajustes que los organismos realizan para evitar o aminorar algún daño.

Los factores de neuroprotección varían en menor o mayor grado, dependiendo de diversos factores como el ambiente, la edad, el género y el estado fisiológico del organismo. Este último, es muy evidente en el caso de las hembras de los mamíferos, ya que dentro de su ciclo reproductivo presentan fluctuaciones hormonales y cambios fisiológicos derivados de las diferentes etapas del mismo. Existe evidencia de que algunas hormonas, como el caso de los esteroides ováricos y hormonas peptídicas, otorgan protección neuronal al disminuir las consecuencias de una lesión cerebral por hipoxia/isquemia o lesión traumática y daño excitotóxico [10, 11, 26].

Durante el ciclo reproductivo de los mamíferos, se sabe que la gestación y la lactancia ofrecen una protección significativa ante factores de daño como la excitotoxicidad y estrés [5, 10, 27-30].

I.1.5 Excitabilidad Neuronal y Excitotoxicidad

«La ciencia es la estética de la inteligencia»

BACHELARD GASTON

Sin duda alguna, la comunicación neuronal es básica y de gran importancia para los procesos que se llevan a cabo en el SNC. La comunicación que se genera entre las neuronas depende de la excitabilidad de cada una de ellas y de la interacción con su medio externo [31].

Para que se lleve a cabo esta comunicación, es necesario que se realicen diversos procesos que involucran el intercambio de iones (moléculas cargadas eléctricamente) entre el medio externo e interno de la célula. Este intercambio de iones se encuentra mediado por un equilibrio entre dos fuerzas opuestas: *la difusión y la presión electrostática* (gradiente electroquímico [110]).

El equilibrio que se presenta es dinámico, debido a que la concentración de los iones entre el medio extracelular e intracelular son diferentes, es aquí donde la presión electrostática y la difusión juegan su papel equilibrando el intercambio de estos iones a través de la membrana celular. Por otro lado, la célula cuenta con mecanismos propios que ayudan en este equilibrio como las proteínas que trabajan a partir de ATP, llamadas bombas ATP-asas. Los principales iones implícitos en este proceso son algunos de los aniones orgánicos que se encuentran dentro de la célula, el potasio (K⁺), el sodio (Na⁺), el calcio (Ca⁺), el cloro (Cl⁻) y en casos particulares el magnesio (Mg⁺). Todos estos iones se encuentran en mayor o menor concentración dentro y fuera de la célula (*Fig. 1a*).

Los cambios de concentración de los iones a través de la membrana se expresan como energía eléctrica; esta energía generada, es expresada en milivoltios mV (milésimas de un voltio). La energía se genera debido a que existe una diferencia de carga entre el interior de la célula y el exterior; en el interior de la célula se encuentra una carga negativa de -70mV aprox. con respecto al medio extracelular. A esta carga negativa dentro de la célula se le conoce como "*potencial de membrana en reposo*". Este término de potencial hace referencia a que existe una fuente de energía almacenada, que en este caso, es energía eléctrica; para ejemplificar éste término o principio imaginemos la función que tiene una pila.

El rompimiento del equilibrio entre el medio intracelular (carga negativa) y extracelular (carga positiva) genera un cambio en la polaridad en la membrana de la célula, debido a que la membrana se vuelve mas permeable, permitiendo pasar los cationes dentro de la célula y los aniones fuera de ella, esto a su vez, vuelve el interior de la célula positivo y el exterior negativo por un momento, debido a la difusión y a la presión electrostática. A este cambio de corrientes entre el interior de la célula y el exterior se le conoce como potencial de acción [31].

El potencial de acción solamente se puede llegar a producir si la membrana recibe un estímulo lo suficientemente fuerte para generar una carga positiva dentro de la célula, dando como resultado el intercambio de iones del medio extracelular al intracelular (*Fig. 1b*).

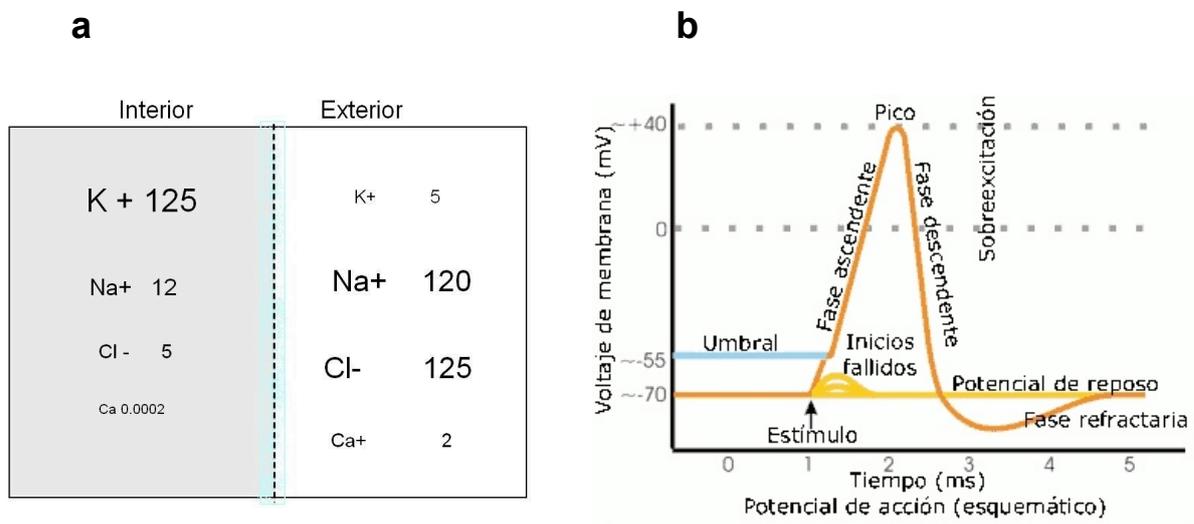


FIGURA 1. a) Concentración de iones en ambos lados de la membrana. El equilibrio en la concentración de iones en ambos lados de la membrana, se mantiene gracias a la difusión y a la presión electrostática dando como resultado un potencial de carga llamado, potencial de membrana en reposo. La concentración estable de iones (valores dado en mM= milimolar) a ambos lados de la membrana dará lugar al potencial de membrana en reposo. **b)** Si los cambios del voltaje en la célula son pequeños (potencial post-sináptico excitatorio), despolarizan de forma incompleta la membrana dando una propagación de voltaje pasiva sufriendo una atenuación en el tiempo (inicios fallidos); si por el contrario el estímulo sobrepasa el umbral, se produce el potencial de acción. (Modificado de Alberts, 2006).

Los mecanismos en la generación de los potenciales de acción involucran la apertura de canales iónicos (canales con un ionóforo) en donde se generan diferentes tipos de corrientes iónicas, principalmente las de Na⁺, K⁺, Cl⁻ y Ca⁺. Las corrientes de Ca⁺ son de suma importancia debido a que el ingreso de Ca⁺ al citosol a través de éstos canales iónicos, actúa como una señal que desencadena procesos intracelulares, como la secreción de moléculas de señalización.

Cuanto menor sea la concentración basal de Ca^{2+} libre en el citosol, mayor será la sensibilidad de la célula a un aumento del nivel citosólico de Ca^{2+} . Las células eucariontes (como las neuronas), en general mantienen una concentración citosólica de Ca^{2+} libre muy reducida (10^{-7} mM) en contraste con una concentración de Ca^{2+} extracelular mucho mayor (1-2 mM) (véase *Fig. 1a*). Esta concentración se logra en gran medida por medio de bombas de Ca^{2+} impulsadas por ATP localizadas en la membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplasmático que bombean activamente Ca^{2+} desde el citosol hacia el exterior de la célula [110]. Estas bombas permiten mantener los niveles óptimos de dicho catión, ya que si los niveles de Ca^{2+} aumentan debido a una sobre estimulación, más allá de excitar a la neurona, ésta sufrirá desintegración del retículo endoplasmático, detoxificación, liberando toxinas como especies reactivas de oxígeno ó bien sufrirá disfunción mitocondrial, seguida de apoptosis y necrosis [32].

Como se mencionó anteriormente, para que un potencial de acción se lleve a cabo, los cationes deben traspasar la membrana a través de canales como resultado de un desequilibrio en el *gradiente electroquímico* o bien, por la unión de un ligando a su receptor (un neurotransmisor, por ejemplo).

El principal ligando excitador en el sistema nervioso central (SNC) es el glutamato. El glutamato es un aminoácido que debido a su polaridad no puede atravesar la barrera hematoencefálica y por consiguiente solamente es sintetizado en el SNC a partir del ácido gamma-aminobutírico GABA. La síntesis y metabolismo del glutamato depende de la activación de dos receptores, ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y kainato, y uno metabotrópico (receptor metabotrópico de glutamato) en las interacciones entre terminales nerviosas y células gliales (astrocitos). La liberación de este neurotransmisor es dependiente de Ca^{2+} y su inactivación se produce principalmente por la captura dependiente de Na^{+} . Las excesivas cantidades de neurotransmisores excitatorios como el glutamato desencadenan mecanismos de muerte neuronal debido a la sobreexcitación, esta acción ha sido determinada como excitotoxicidad por glutamato. El término excitotoxicidad fué originalmente utilizado en referencia a la capacidad del glutamato y sus agonistas para intervenir en procesos de muerte neuronal [33, 34].

En otras palabras, el término excitotoxicidad puede ser definido como el daño neuronal causado por la sobre-activación de los receptores excitatorios, principalmente AMPA y

kainato [35-37]. Así como la prolongada activación de los receptores N- Metil-D-aspartato (NMDA) que permiten un incremento en el influjo de Ca^{+} hacia el interior de la célula. Existen muchos estudios donde se sugieren que la excitotoxicidad mediada por receptores glutamatérgicos puede ser la principal característica de patologías y degeneración incluyendo enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, y Huntington [32]. Los receptores AMPA y kainato están presentes, con una distribución heterogénea en las dendritas de las neuronas piramidales del hipocampo. Se conoce que la administración sistémica o intracerebral de AK (un agonista glutamatérgico) a roedores causa muerte de neuronas piramidales en las regiones hipocampales CA1 y CA3. Uno de los datos importantes es que la distribución específica de los receptores AMPA/Kainato y NMDA en el hipocampo son factores importantes en la susceptibilidad selectiva de neurodegeneración en estas neuronas debido a la permeabilidad de Ca^{+} [38].

I.1.6 Daño Neuronal

«Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro.»

SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL

Existen diversos factores que pueden desencadenar procesos de daño cerebral durante el paso del tiempo, estos factores pueden ser de diversa procedencia causando alteraciones estructurales o fisiológicas en el SNC. Debido a esto, es importante estudiar y conocer estas alteraciones o enfermedades ya que tienen una elevada incidencia en el mundo. Entre estas alteraciones se incluyen las enfermedades neurodegenerativas, los accidentes cerebrovasculares (falta de irrigación sanguínea), los traumatismos cerebrales, las lesiones en la médula espinal, la fiebre y el estrés, entre otros. De la misma manera también existen factores que dañan al SNC al comprometer el aporte de oxígeno (hipoxia/isquemia).

Como resultado de estos factores de daño neuronal, se pueden identificar dos patrones de daño posteriores a episodios destructivos: un daño primario, como consecuencia temprana del episodio patológico, y una degeneración neuronal secundaria (DNS) . Esta DNS consiste en un grupo de episodios patológicos que inducen la degeneración tardía en células que no fueron afectadas por el daño primario o que sólo fueron parcialmente dañadas. La DNS es proporcional al daño que se da en primera instancia (daño primario). El daño neuronal primario inicia un proceso de degeneración y muerte celular con la liberación de mediadores químicos al entorno extracelular. Se describe, que incluso después de la interrupción del estímulo desencadenante de daño neuronal primario, puede seguirse produciendo daño a las neuronas aledañas debido a la liberación de estos agentes tóxicos liberados por las primeras [39]. Estos agentes tóxicos son principalmente sustancias que se encuentran dentro del núcleo de la célula dañada. Un ejemplo de esto es, el caso de la hipoxia en donde se genera una disminución en la concentración de oxígeno en los tejidos, provocando muerte celular. Otro ejemplo de esto son las isquemias cerebrales; la isquemia se caracteriza por una merma transitoria o permanente de irrigación sanguínea teniendo como consecuencia, la generación de procesos hipóxicos y de excitotoxicidad por la sobre-activación de receptores excitatorios liberando glutamato y especies reactivas de oxígeno (ROS), dando como resultado final, muerte tisular por la activación de los mecanismos celulares que desencadenan necrosis y apoptosis.

Como se mencionó previamente, el glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC, se encuentra involucrado en funciones cognitivas superiores como el aprendizaje y un tipo de memoria a largo plazo representada por un fenómeno conocido como *potenciación a largo plazo*. Uno de los aspectos importantes en la regulación de éste aminoácido es que si se llega a presentar un desequilibrio en sus acciones, puede llevar a procesos excitotóxicos que contribuyen a una gran variedad de condiciones neurodegenerativas. Esto debido a que las concentraciones elevadas de glutamato pueden inducir lesiones tóxicas en neuronas que podrían asociarse a varias enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, Huntington y muy probablemente también Alzheimer. La comprensión de este tipo de mecanismos de muerte neuronal durante el desarrollo de cuadros patológicos, nos puede brindar información para favorecer el mecanismo de la neuroprotección y eventualmente generar mejores estrategias en la reparación del Sistema Nervioso.

I.2. Hipocampo

«Cada uno tiene el máximo de memoria para lo que le interesa y el mínimo para lo que no le interesa»

ARTHUR SCHOPENHAUER

El hipocampo es una estructura que forma parte del sistema límbico localizada en la parte medial e interna del lóbulo temporal bajo la superficie cortical. Por otro lado, forma parte de un conjunto de regiones que en conjunto dan lugar a la formación hipocampal [40]. Este conjunto de regiones son de suma importancia ya que se encuentran implicadas en procesos cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria [41].

La formación hipocampal esta compuesta por cuatro regiones de la corteza relativamente simples. Estas incluyen: 1) La corteza entorrinal, 2) la circunvolución dentada, (ó giro dentado) 3) el hipocampo, que esta compuesto por subdivisiones conocidas como: CA1, CA2, CA3 y CA4, además del complejo subícular, que a su vez también está dividido en 3 partes: a) subículo, b) presubículo y c) parasubículo [42]. El hipocampo esta en íntima relación anatómica y funcional con la corteza entorrinal (CE). En los roedores esta región se encuentra dividida en subdivisiones medial y lateral [40]. La formación hipocampal en la rata es una estructura que mide aproximadamente 1.2 cm². Su ubicación obedece a dos ejes, el longitudinal en forma de "C" limitándose rostro-dorsalmente con el septum pasando por detrás y a lo largo del diencéfalo, este gran eje corre en dirección septo-temporal. En el eje transversal es donde se encuentra el giro dentado en su extremo proximal y el surco rinal en el extremo distal. El hipocampo se pliega hacia arriba y hacia adentro en la porción interna de la corteza temporal para formar la superficie ventral del asta anterior del ventrículo lateral. Un extremo limita con los núcleos amigdalinos y uno de sus bordes se fusiona con la circunvolución parahipocámpica, que forma la superficie de la corteza ventromedial del lóbulo temporal [11, 43] (Fig. 2).

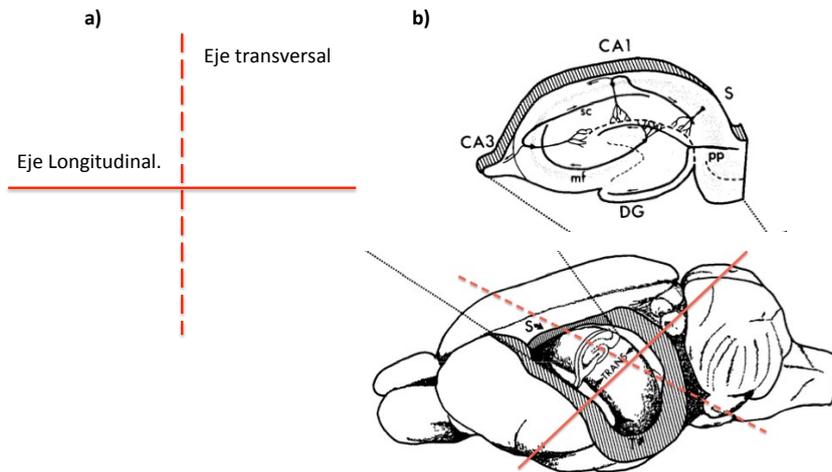


Fig. 2. Ubicación de la formación hipocampal. a) Se muestran los ejes longitudinal y transversal y b) los límites septal, giro dentado, surco rinal y lóbulo temporal de la FH en la rata. (Modificado de Amaral, 1989).

El hipocampo tiene una forma de C en un corte coronal, el contorno del mismo semeja un cuerno de carnero y por eso en ocasiones, es llamado cuerno de Ammón, que es el nombre de una deidad Egipcia con cabeza de carnero [44]. Una de las características particulares de la formación hipocampal, es que cada campo se vincula a través de proyecciones excitatorias unidireccionales (*Fig. 3 A*).

Los trabajos pioneros de Ramón y Cajal, Lorente de Nó y algunos trabajos de degeneración mediante la técnica de Golgi, dieron a conocer que la corteza entorrinal es una de las regiones de la formación hipocampal que juega un papel muy importante por su función [42, 45, 46]. Estos estudios demostraron, que a partir de la corteza entorrinal se origina una proyección hacia el giro dentado y posteriormente al hipocampo a través de una vía que se conoce como “*vía perforante*”. Este tipo de estudios mostraron que las fibras que emanan de la corteza entorrinal continúan viajando principalmente a través de un haz compacto que Ramón y Cajal llamó “*haz angular*”. Las fibras de la vía perforante viajan dorsalmente y hacen un giro dentro de un plano transversal, perforando la lamina piramidal del subículo hasta entrar al giro dentado y posteriormente al hipocampo. Estas fibras se distribuyen dentro de la capa molecular del giro dentado, del estrato hipocampal y del la capa molecular del subículo [47-49]. La CE tiene a su vez, interconexión con muchas otras partes de la corteza cerebral. Por ello, se ha propuesto que la CE sirve como la principal interface entre el hipocampo y otras partes del cerebro [40, 50, 51] (*Fig. 3 B*).

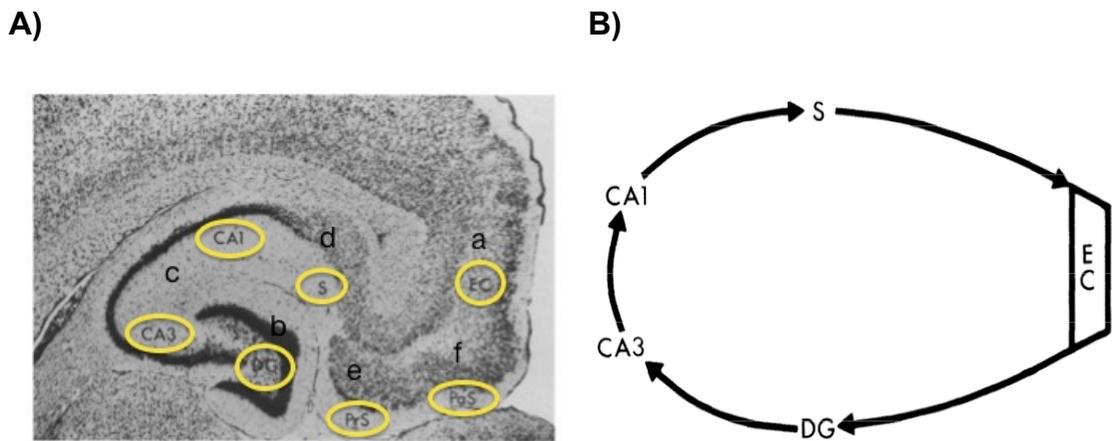


Fig. 3. A) Microfotografía de una sección horizontal de la formación hipocámpal de la rata. La formación del hipocampo se compone de cuatro regiones distintas en su citoarquitectura: **a)** la corteza entorrinal (CE), **b)** el giro dentado (DG), **c)** el hipocampo (dividido en campos CA4, CA2, CA3 y CA1) y el complejo subícular que se subdivide en; **d)** subículo (S), **e)** presubículo (PrS) y el **f)** parasubículo (PaS). **B)** Una de las características principales de la formación hipocámpal es que cada uno de sus campos se relacionan mediante proyecciones excitatorias unidireccionales. (Modificado de Amaral et al, 1989).

Por otro lado, el giro dentado se divide en tres capas: la capa molecular, en donde se originan las fibras musgosas, la capa de las células granulares que son el principal tipo de células del giro dentado y por último, una capa profunda o polimórfica formada principalmente por una variedad de interneuronas [52]. Las células del hipocampo son neuronas piramidales que se agrupan en una capa morfológicamente estrechamente relacionada. En lo profundo de la capa de las células piramidales se encuentra el “stratum oriens” en donde las dendritas basales de las células piramidales descienden y coexisten con una serie de neuronas no piramidales [40]. La región en que se encuentran las dendritas apicales de las células piramidales se divide en un estrato más profundo el *radiatum* y un estrato superficial el *lacunosum-moleculare* [42]. Justo a la altura de CA3, la región que se localiza por encima de la capa de las células piramidales, contiene las fibras musgosas del giro dentado y se llama estrato lúcido (Fig. 4). Las células piramidales de CA3 tienen axones de asociación colaterales que proyectan dentro de CA3 y dan lugar a la mayor entrada de CA1, las llamadas colaterales de Schaffer [53].

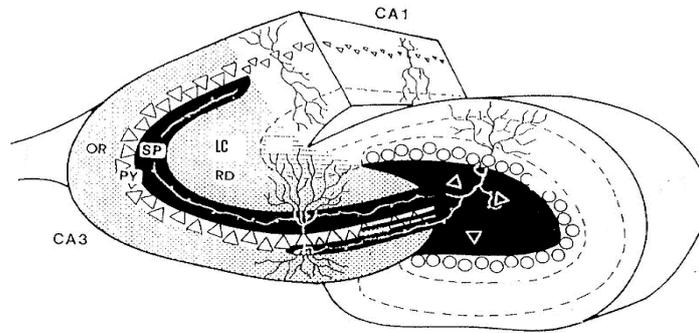


Figura 4. Las regiones del hipocampo. Diagrama del hipocampo que muestra las dos neuronas principales del hipocampo Piramidales y Musgos así como el stratum oriens (OR), el stratum radiatum (RD), el stratum lacunosum (LC) y el stratum piramidales.(SP) de la región del hipocampo que proyectan de CA3 hacia CA1 (Modificado de Berberich et al, 2005).

Como ya se mencionó anteriormente, en la formación hipocampal el flujo de información es en gran medida unidireccional dando muchas veces la idea de un circuito cerrado. Este flujo de información se lleva a cabo con señales que se propagan a través de una serie de capas de células empaquetadas. Este flujo de información comienza primero en el giro dentado, mandando sus aferencias a la capa de células piramidales localizadas en CA3, posteriormente, esta información viaja a través de las colaterales de Schaffer hasta la capa continua localizada en CA1, ésta información entra al subículo y sale para llegar de nuevo a la CE (Fig. 5).

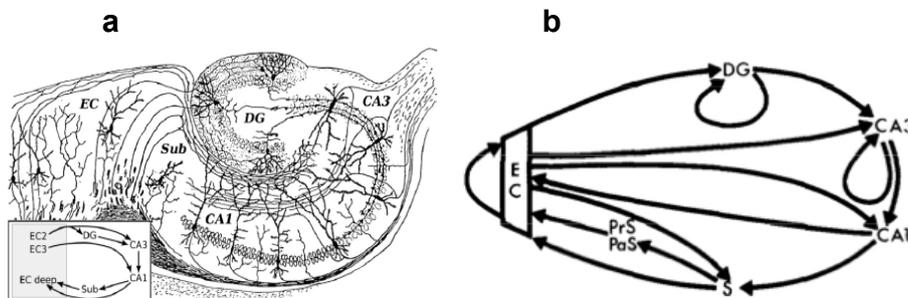


Figura 5. El circuito del hipocampo y la corteza entorrinal. a) En éste clásico esquema de Ramón y Cajal se observa como la Corteza entorrinal (CE) proyecta hacia el giro dentado (DG), éste hacia la capa CA3 y esta a su vez proyecta hacia la capa de CA1 y después hacia el Subículo (Sub) para regresar de nuevo hacia la CE. b) También se pueden observar otras proyecciones que pueden ir directas de la EC a CA3 sin pasar por el DG o de la EC al campo CA1 así como de CA1 a la EC. (Modificado de Ramón y Cajal, 1911).

La formación hipocampal es una de las estructuras más estudiadas debido a que se encuentra estrechamente relacionada con numerosas enfermedades y patologías como las enfermedades neurodegenerativas, la epilepsia, entre otras. Además de que existe el

conocimiento de que en esta estructura radica la memoria y se generan los principales procesos de aprendizaje [54]. También es una estructura que facilita su estudio por medio de aproximaciones *in vitro*, a través de la utilización de rebanadas con diferentes tipos de cortes o con diferentes tipos de técnicas [50, 51] (Fig. 6). Durante los últimos 30 años las células piramidales del hipocampo han sido las neuronas más ampliamente estudiadas, como resultado de esto; existe gran información acerca de su desarrollo, sinaptogénesis, receptores, neurotransmisores, canales iónicos y microcircuitos Además del gran número de estudios sobre aprendizaje y epilepsia que existen. Estos y otros hallazgos es lo que hacen de ésta estructura un área de gran interés y un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de plasticidad [50, 51, 55].

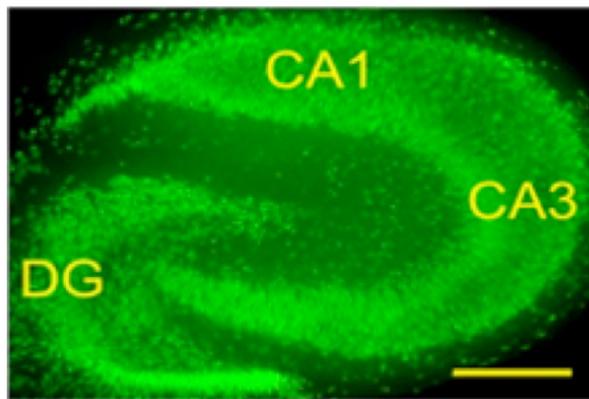


Fig. 6. Aspecto de un cultivo de rebanada de hipocampo de rata. Se muestra un cultivo maduro (es decir, 21 días in vitro) de hipocampo que se tiñe con NeuN (inmunohistoquímica) para ilustrar su citoarquitectura. Las neuronas piramidales se muestran en las áreas CA1 y CA3 y las granulares en el giro dentado (DG). Nótese también la presencia de múltiples interneuronas. La barra de escala representa 250 micras (Modificado de Mitchel et al, 2010).

En los últimos 15 años, el hipocampo ha sido estudiado en relación con la reproducción y se ha encontrado que durante éste periodo le ocurren algunas adaptaciones morfológicas, fisiológicas y funcionales. Este tipo de adaptaciones se encuentra principalmente relacionada con la neurogénesis, la neurotransmisión, el aprendizaje y la memoria que se lleva a cabo durante las diferentes etapas del ciclo reproductivo [4]. Estudios del mismo autor han demostrado que durante el embarazo, las hormonas que se encuentran implicadas en este estado tienen la capacidad de modificar la concentración de espinas dendríticas en el hipocampo [4].

I.2.1 Hipocampo y glutamato.

Una de las características principales del hipocampo es que mayoritariamente todas sus neuronas poseen receptores excitatorios. La afinidad de estos receptores son principalmente por glutamato. Como ya se mencionó anteriormente, el glutamato es el principal aminoácido excitador del SN y es una de las llaves mediadoras de comunicación intercelular, plasticidad neuronal, desarrollo, diferenciación neuronal y particularmente se encuentra implícito en procesos de aprendizaje y memoria. Esto explica en gran medida, el porque que haya tantos receptores a él en el hipocampo [56]. Los receptores glutamatérgicos, NMDA, AMPA y kainato tienen una distribución diferencial dependiendo del nivel rostro-caudal y del área hipocampal.

Hoy en día se conocen varios tipos de agonistas glutamatérgicos y uno de ellos es el ácido kaínico (*Fig.7*). El AK es un agonista del glutamato proveniente de las algas marinas, éste es cerca de 50 veces más potente que el glutamato mismo y su inyección intracerebral produce destrucción selectiva de cuerpos neuronales, daños electrofisiológicos y conductuales [57]. Este tipo de efectos neurotóxicos han sido utilizados a nivel experimental para inducir lesiones en sistemas de los cuales queremos ver su función. Diversos estudios han reportado la susceptibilidad del hipocampo tras la administración de AK, en particular en las áreas CA1, CA3 y GD [58-60].

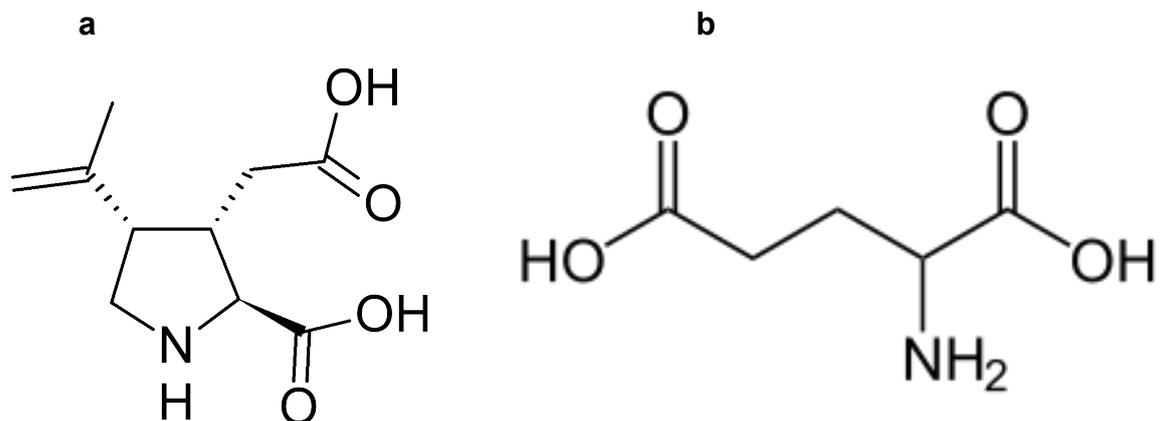


Fig. 7 Moléculas de Ácido kaínico (a) y ácido glutámico (b) (glutamato). Nótese la gran similitud entre ambas moléculas con relación a su estructura molecular.

I.3 Modelo experimental

I.3.1 Justificación del modelo experimental

Nuestro equipo de trabajo se interesa principalmente en analizar los mecanismos neuroendocrinos de protección que se presentan durante la maternidad, especialmente durante la lactancia en la rata. Durante este periodo reproductivo se presentan varios cambios que modifican la fisiología de la madre generando cambios en su metabolismo, así como en su conducta para poder afrontar las demandas que esta condición genera. Este tipo de adaptaciones, cambios conductuales y emocionales se dan en gran medida por la fluctuación de los niveles hormonales; principalmente de las hormonas esteroideas (estradiol, progesterona y corticosterona) y peptídicas (oxitocina y prolactina). Por otro lado, las aferencias que recibe la madre del medio circundante como la estimulación otorgada por las crías tiene un papel de suma importancia en la regulación de estas funciones. Estudios previos de nuestro grupo han documentado que durante la lactancia, el hipocampo de la rata lactante es más resistente al daño excitotóxico inducido por AK en comparación con el de las ratas vírgenes en estado de diestro [10, 28]. Por lo que la lactancia es un modelo fisiológico para el estudio de la plasticidad cerebral relacionada con mecanismos de neuroprotección [5].

II. ANTECEDENTES:

II.1.1 Hormonas durante el ciclo reproductivo

Una de las características principales que tienen las hembras de los mamíferos desde los roedores hasta los humanos, es que a lo largo de su vida presentan en menor o mayor grado variaciones en sus niveles hormonales. El inicio de estas variaciones hormonales son más notables durante la pubertad. Una vez que la pubertad se presenta, las hembras en los mamíferos comienzan a desplegar una ciclicidad y con ello la capacidad de reproducción. Esto significa, que dentro de esta ciclicidad o periodos, se secretan hormonas que le dan la capacidad para que el ciclo reproductivo se lleve a cabo. Los cambios hormonales generados por el ciclo reproductivo se presentan de manera cíclica durante cierto tiempo o periodos de manera regular y son dirigidos por factores endocrinos [4]. A pesar de que durante estos periodos hay cambios en los niveles hormonales, estas fluctuaciones tienen regularidades dentro del mismo periodo. Estas variaciones en los niveles hormonales

también tienen la capacidad de generar un gran impacto en la fisiología del organismo, generando incluso modificaciones conductuales.

Las etapas del ciclo reproductivo comprenden varias fases subsecuentes estrechamente relacionadas como lo son: el apareamiento, el embarazo, el parto y la lactancia. La transición entre estas fases implica que lo que en un momento era un organismo dedicado a satisfacer únicamente sus necesidades metabólicas y supervivencia, ahora necesita adaptarse a las demandas que las crías le imponen y también a redirigir todos sus conductas y recursos disponibles para asegurar la supervivencia de su camada [3, 4]. Tales adaptaciones inician con el embarazo y finalizan con el destete e inciden en la fisiología de la madre, en particular, sobre aspectos metabólicos, regulación endocrina y generación de conducta maternal [12-14, 61]. Una vez que se lleva a cabo la fecundación, se comienzan a generar cambios de mayor magnitud en la fisiología de la madre como resultado de la gestación. Uno de los principales cambios que se presentan durante la gestación es la fluctuación de algunas hormonas (cambios endocrinos). Las fluctuaciones hormonales durante la gestación o embarazo tienen como principal característica la participación de hormonas ováricas (estradiol y progesterona) y peptídicas (prolactina y oxitocina). Durante el embarazo, se mantienen niveles altos de estrógenos, progesterona, prolactina y lactógeno placentario, que realizan su labor al preparar las glándulas mamarias de la madre para la lactancia.

En el caso particular de la rata, el embarazo es establecido y mantenido por hormonas secretadas por la adenohipófisis y por el estradiol durante la primera mitad y posteriormente durante la segunda mitad, las unidades fetoplacentarias toman el control sobre el ovario incrementando los niveles de hormonas esteroideas, principalmente de progesterona [62, 63], inhibiendo la acción luteólica pituitaria hasta el final del embarazo cuando el parto es iniciado [64, 65]. La progesterona posterior a la copula tiene un incremento rápido manteniéndose en una meseta para el día 15 (15-20), declinando poco antes de llegar al término del embarazo (*Fig. 8*).

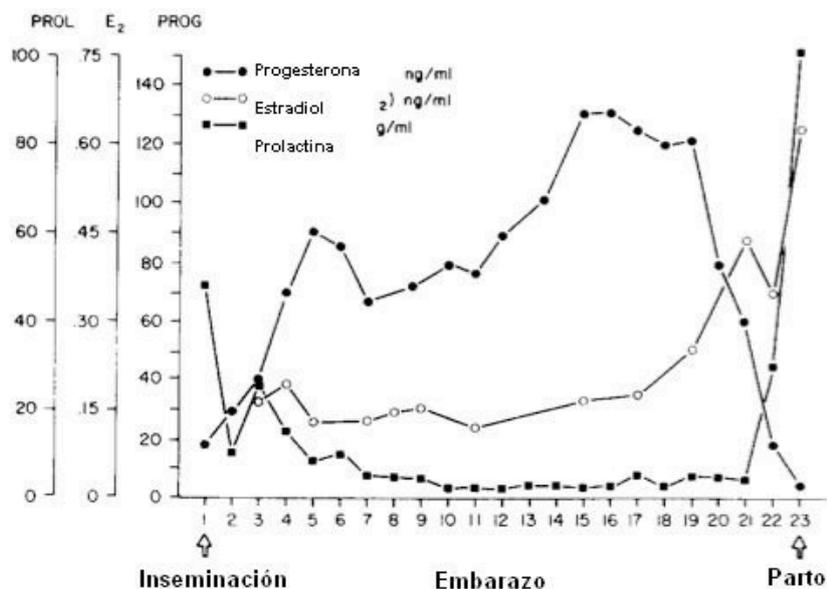


Fig. 8 Concentraciones hormonales plasmáticas durante el embarazo en la rata. Progesterona (Pepe y Rothchild, 1974), estradiol 17 β (Shaikh, 1971), y prolactina (Mirishige y cols., 1973). Modificado de Rosenblat y cols., (1979).

Posterior al parto, los niveles de hormonas feto-placentarios tienen un decremento y se inicia la lactancia dejando a la hipófisis como la encargada de generar la retroalimentación positiva, generada principalmente por la prolactina a medida que su secreción aumenta. A partir de ese momento, la secreción láctea es dependiente totalmente del estímulo brindado por la succión de las crías. La transferencia de leche de la madre a las crías se lleva a cabo mediante un proceso de evacuación láctea que se da por la succión, para la cual la oxitocina es fundamental. Este proceso representa uno más de los reflejos neuroendocrinos clásicos de los organismos, donde el estímulo dado por la succión de las crías, es recibido por receptores específicos y las eferencias son enviadas al SNC llegando al hipotálamo que es la vía final de esta estimulación [3, 12]. De este mismo lado, durante la lactancia se genera una reorganización en las redes neuronales, en particular con las involucradas en mantener las demandas sobre el metabolismo y el balance hídrico de la madre [12].

Durante la lactancia se hace una división en tres etapas subsecuentes y con características específicas en relación a las fluctuaciones circulantes de prolactina, oxitocina, estrógenos y progesterona. En relación con las hormonas ováricas, el nivel circulante de estrógenos aumenta en demasía al momento del parto y se mantiene alto durante los primeros días posteriores. Por otro lado, los niveles de progesterona a pesar de que tienen un gran decremento en relación con los niveles que presenta durante el embarazo, se mantienen significativamente elevados en comparación con los niveles basales del proestro, gracias al

mantenimiento del cuerpo lúteo y a la liberación de prolactina que se da como respuesta a la succión de las crías durante la lactancia (Fig. 9). Por otra parte, la concentración de oxitocina se incrementa para la inducción del parto, contrayendo el útero y dilatando la vagina, y durante la lactancia promoviendo la expulsión de leche. Estos niveles se mantienen elevados durante el tiempo que el estímulo de succión se encuentra presente [15, 66].

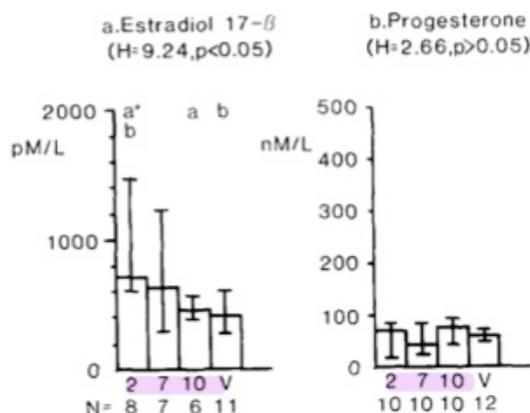


Fig.9 Concentraciones de plasma de 17β estradiol y progesterona en ratas vírgenes y ratas lactantes tomadas durante los 10 días posteriores al parto (Tomado de Orpen y Furman 1987).

II.1.2 Hipocampo y hormonas en la lactancia

Durante la maternidad los altos niveles hormonales principalmente de hormonas peptídicas (prolactina, oxitocina) y esteroideas u ováricas (estrógenos y progesterona), tienen un gran impacto en la fisiología de la madre generando cambios estructurales y funcionales en algunas áreas del cerebro materno. Estos dos factores; 1) niveles altos de hormonas y 2) modificaciones estructurales y funcionales, tienen el propósito de preparar a la madre para el nacimiento de su prole, generando posteriormente conducta maternal y lactogenesis durante la lactancia [66, 67].

Una de las estructuras que presentan mayor modificación durante este periodo, principalmente en los roedores es el hipocampo. Las modificaciones en el hipocampo ayudan a la madre a adaptarse a las demandas que les genera su camada ya que tiene que recordar la ubicación de fuentes potenciales de comida, agua, de descanso y de lugares peligrosos por la presencia de depredadores. Todas estas cuestiones se resumen en un incremento en las habilidades cognitivas de la madre [2]. Se ha reportado que el embarazo y el estímulo brindado por la cría(s) durante la lactancia, facilitan el aprendizaje espacial y la memoria en la rata [8, 68] de la misma manera, la respuesta ante el estrés y la ansiedad es

atenuada en hembras con experiencia reproductiva [69]. Estas modificaciones en el hipocampo facilitan las habilidades de navegación necesarias para adaptarse [8, 68]. Todas estas adaptaciones son facilitadas en gran medida por los altos niveles de hormonas que se presentan durante el embarazo y la lactancia. El hipocampo es una de las estructuras donde se llevan a cabo el mayor número de cambios y donde las hormonas actúan de forma directa para establecer aprendizajes y en términos generales una facilidad para adaptarse de manera más exitosa.

II.1.3 Hipocampo y esteroides

Todas las hormonas esteroideas son sintetizadas a partir del colesterol, que es el principal metabolito, y forman parte de la familia de los pregnanos. Estas hormonas comparten la característica principal de ser hormonas lipofílicas, dando como resultado, la capacidad de atravesar libremente la membrana plasmática debido a que su principal receptor se encuentra dentro de la célula, ya que es un receptor citoplasmático (nuclear), aunque también pueden generar sus efectos a través de receptores membranales (Fig. 10). Este complejo, hormona-receptor, tiene su mecanismo de acción en el ADN, lo que provoca la activación de genes y/o modulación en la transcripción del mismo [70].

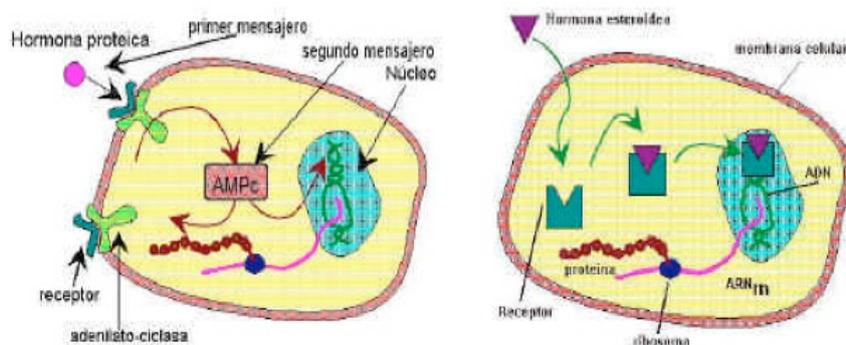


FIGURA 10. Receptores dependiendo el tipo de hormona. Cada tipo de hormona genera su acción dependiendo el tipo de receptor al que se une. La activación de receptores membranales genera su actividad a través de segundos mensajeros como el Ca^{+} , cAMP, IP3, entre otros. Por otro lado, los receptores nucleares se encuentran dentro de las células, estos receptores son específicos de las hormonas que tienen la capacidad de cruzar la membrana por su naturaleza lipofílica (solubles en la fase lipídica de la membrana celular).

Dentro de la familia de los esteroides, existen 5 categorías de hormonas esteroideas: 1) Progestinas, 2) Glucocorticoides (cortisol y corticosterona), 3) Mineralocorticoides (aldosterona), 4) Andrógenos (Testosterona, Di-hidrotestosterona, Androsterona y 5)

Estrógenos (estradiol, estriol, estrona). Diversos estudios han demostrado que en el hipocampo se sintetizan gran cantidad de estos esteroides [4, 71-74].

Una de las hormonas que tiene una mayor interacción con el hipocampo son los estrógenos. Estudios realizados por McEwen, han documentado la presencia de receptores a estrógenos (ERs) alfa y beta en todas las partes de las neuronas del hipocampo [75, 76]. Se sabe también que existe una variante en los niveles de estrógenos dependiendo de la etapa del ciclo estral en plasma, en ERs y en la espinogénesis de dicha estructura. Además, de que los animales tienen un mejor rendimiento en tareas de aprendizaje, cuando los niveles de estrógenos se encuentran más elevados. En contraparte, también se ha encontrado que la memoria espacial se ve afectada en animales con deficiencia estrogénica experimental, apoyando estas hipótesis.

Esto coincide con una facilitación del aprendizaje que se da en las mujeres las primeras dos semanas del ciclo menstrual, que son los días en donde los niveles séricos de estrógenos se encuentran en sus niveles más altos. En mujeres post-menopáusicas bajo tratamiento de sustitución hormonal con estrógenos, se observa una mejoría en funciones cognitivas como la memoria verbal de corto y largo plazo [77] y también aminora las deficiencias en el aprendizaje y memoria relacionadas con el envejecimiento [24].

Esto puede ser explicado debido a que el estradiol es un inductor de la sinaptogénesis, acompañado de la facilitación de la inducción de potenciación a largo plazo (LTP) al tener acciones sobre receptores NMDA, incrementando las corrientes de Ca^{+} . El estradiol también afecta a las células piramidales, probablemente a través de la inhibición de interneuronas GABAérgicas. Esto también modula inespecíficamente sistemas activadores que contribuyen significativamente con la neuroplasticidad [78]. Además, el receptor a estrógenos se modifica en presencia de un agente tóxico como el kainato [79]. Por otro lado, otra de las hormonas esteroideas que tienen mayor impacto en el hipocampo es la progesterona, debido a que se encuentra implícita tanto en la expresión de genes, como en la concentración de espinas dendríticas en diversas etapas del ciclo estral en la rata [9, 80].

II.1.4 Acciones de los estrógenos

Los estrógenos forman parte de las principales hormonas ováricas, como ya se mencionó, son sintetizados a partir del colesterol formando parte de la familia de los pregnanos. Existen dos tipos de receptores de estrógenos (ERs) que son los $ER\alpha$ y los $ER\beta$ mediando la mayor parte de las funciones biológicas generadas por los estrógenos. Estos receptores son parte

de la familia de los receptores nucleares y son ampliamente distribuidos en el cerebro y médula espinal [72, 81]. En el hipocampo hay una prevalencia de receptores de tipo ER β en relación con los ER α . Los estrógenos tienen la característica de modular la expresión de genes en diferentes tejidos, sus efectos más estudiados se encuentran en el tracto reproductivo y en el sistema nervioso central SNC [82]. Los estrógenos y sus receptores activan funciones celulares a través de mecanismos genómicos y no genómicos. Los mecanismos genómicos requieren de una serie de pasos como la unión de los estrógenos con su receptor, la translocación de los receptores dentro del núcleo, dimerización y la interacción con sitios específicos de unión a los receptores de estrógenos, para los promotores de genes regulados por estrógeno. Por otra parte, los mecanismos de acción no genómicos consisten en la activación de diferentes vías de señalización incluyendo la activación de protein-quinasas (MAPK), adenosin monofosfato cíclico (AMPc), como respuesta vinculante a la proteína de unión (CREB) y regulando concentraciones iónicas intracelulares a través de la modulación de canales iónicos y homeostasis de Ca⁺. En adición, los estrógenos son capaces de modular genes antiapoptóticos como las proteínas de la familia Bcl-2 y caspasas [83]. Los receptores de estrógenos son mediadores de diferentes efectos en la estructura y función del SNC, incluyendo excitabilidad, liberación de neurotransmisores, procesos de memoria, densidad en las espinas dendríticas, sinapsis, neurogénesis y neuroprotección [84, 85]. Durante la lactancia diversos estudios a través de hibridación *in situ* han encontrado dentro del sistema límbico una gran expresión de ERs, principalmente en las áreas del hipocampo, amígdala y septum lateral [86, 87]. Hoy en día es más que aceptado que los estrógenos a través de sus receptores participan en procesos de neuroprotección en diversos modelos de neurodegeneración y de isquemia [88, 89]. Estos mecanismos de neuroprotección por parte de los ERs se ha relacionado con la regulación de la transcripción de moléculas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas [90].

II.1.5 Acciones de la progesterona

La progesterona es la segunda de las hormonas ováricas, de la misma manera es una hormona esteroidea y también forma parte de la familia de los pregnanos, sus metabolitos son la alopregnenolona y la dihidroprogesterona [91]. Así mismo, se conoce que estos metabolitos disminuyen significativamente la pérdida de células en el hipocampo después de la inducción de AK. La progesterona es sintetizada principalmente en el ovario (cuerpo lúteo) en la mujer y en los testículos y corteza adrenal en el hombre. Los mecanismos por los

cuales la progesterona ejerce sus efectos, es a través de sus receptores (PRs) que al igual que los receptores de estrógenos (ERs) han sido descritos como factores de transcripción nuclear mediante elementos específicos de respuesta. En otras palabras la progesterona ejerce de igual manera sus efectos mediante la regulación de la transcripción en las regiones promotoras. Este mecanismo puede ser relevante para la regulación en la expresión de neurotrofinas que también parece ser regulada por la progesterona [92].

La progesterona al igual que los estrógenos, tiene la capacidad de actuar a través de mecanismos nucleares ó genómicos y no genómicos, como la activación de factores de crecimiento asociados a vías de transducción de señales y la activación de diversas vías de señalización de supervivencia neuronal como las cinasas [93]. También se sabe que es capaz de regular sistemas GABAérgicos, ya que uno de sus principales metabolitos es la alopregnanolona y éste es el alostérico GABAérgico más potente que se conoce. El tratamiento con progesterona también tiene la característica de reducir las crisis convulsivas en una variedad de modelos experimentales, incluyendo el modelo de epilepsia por la inducción de AK, donde se ha visto reduce el daño en el hipocampo [94]. También estimula la proliferación de las espinas dendríticas en el hipocampo [95-97], recordando que las espinas dendríticas son sitios importantes para mejorar la eficacia sináptica de las redes involucradas en el aprendizaje y la plasticidad neuronal [98-100], y por último como posible fuente de aprendizaje Hebbiano [101-103].

Otros estudios han hecho ver que la progesterona también se ha mostrado como factor neuroprotector mediante la activación de vías de señalización específicas relevantes en la neuroprotección como las CREB [93] y también incrementando la expresión de proteínas antiapoptóticas como las Bcl2 [104].

Recientemente se comenzó a implementar el uso de progesterona en ensayos clínicos de nivel tres para contrarrestar los efectos nocivos posteriores a lesiones traumáticas en el cerebro, como accidentes cerebrales vasculares, entre otros [105, 106]. Las hormonas esteroideas son capaces también de modificar potenciales de membrana y actividad eléctrica en diversas regiones del cerebro [92, 107-110]. Estudios recientes del mismo autor han demostrado que la progesterona reduce significativamente la apoptosis en el núcleo estriado mediante el bloqueo de canales de Ca⁺ tipo L dependientes de voltaje, evitando así, la activación de procesos nucleares activados por Ca⁺ [92] (*Fig. 11*).

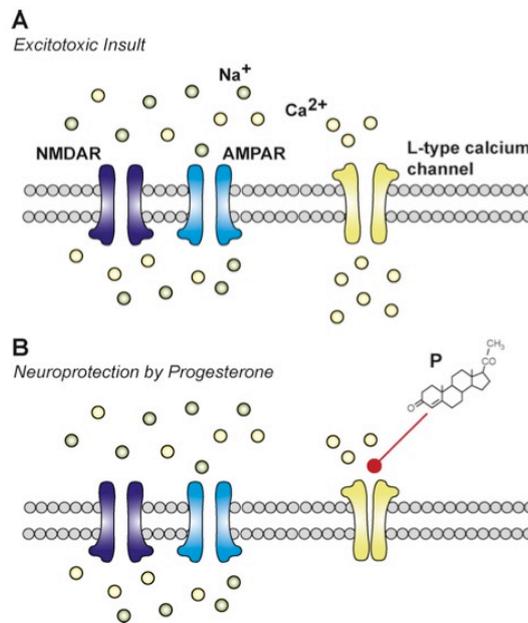


Fig. 11. Supuesto mecanismo por el cual la progesterona ejerce sus efectos neuroprotectores. El daño excitotóxico es caracterizado por un alto flujo de iones de Na⁺ y Ca²⁺ a través de los receptores glutamatérgicos. Seguido de la despolarización se genera una apertura de canales de Ca²⁺ tipo L. El flujo constante de Ca²⁺ a través de los canales tipo L contribuye a una incremento de Ca²⁺ intracelular activando vías de señalización de muerte neuronal activadas por el mismo catión. La aplicación extracelular de progesterona bloquea los canales de Ca²⁺ tipo L, inhibiendo el flujo de los cationes de Ca²⁺ protegiendo así a la neurona de muerte por excitotoxicidad (Luoma, 2011).

I.1.6 Neuroprotección durante la lactancia

Estudios previos de nuestro grupo han reportado que la lactancia previene el daño celular por excitotoxicidad inducido por AK en áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo dorsal, comparado con ratas vírgenes en fase de diestro. Se ha puesto de manifiesto que las fluctuaciones altas de hormonas, como las hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona) y hormonas peptídicas (prolactina y oxitocina) tienen un rol de neuroprotección en el hipocampo durante la lactancia [10, 11, 28].

III. JUSTIFICACIÓN

«La mejor estructura no garantizará los resultados ni el rendimiento.

Pero la estructura equivocada es una garantía de fracaso»

PETER DRUCKER.

La maternidad ocasiona cambios y adaptaciones en el cerebro de la madre que sirven para poder satisfacer la demanda que se presenta durante la reproducción. Estas adaptaciones están dirigidas a preservar la integridad de la madre así como la supervivencia de la camada (Morales, 2011).

Algunos estudios reportan que durante la lactancia se presentan procesos que brindan protección neuronal como resultado de la plasticidad cerebral que se da durante esta etapa. Del mismo lado las hormonas que participan en ella, tienen un papel fundamental en ésta neuroprotección [10, 28]. Una de las maneras por las cuales se ha demostrado que las hormonas brindan protección a las neuronas durante este periodo, ha sido mediante la administración de (AK), un agonista glutamatérgico que induce muerte neuronal por excitotoxicidad. Esto se explica debido a que durante la lactancia se presentan altos niveles de hormonas brindando un soporte a las modificaciones funcionales y estructurales en el cerebro de la madre debido a la plasticidad cerebral que se genera en este periodo.

Durante esta etapa, la exposición crónica y los niveles elevados de hormonas ováricas (estrógenos y progesterona), así como la regulación de los receptores glutamatérgicos son de suma importancia, ya que se sabe que tienen una estrecha relación en la protección de daño generado por kainato. Por ejemplo, se sabe que la progesterona tiene efectos neuroprotectores al inhibir la muerte neuronal bloqueando canales de calcio (Ca⁺) dependientes de voltaje, activar vías de señalización relacionadas con factores de supervivencia neuronal y modulación del sistema GABAérgico. Otras hormonas cuya secreción se encuentra aumentada durante esta fase, son la prolactina, oxitocina, glucocorticoides, adrenocorticotropina, hormona del crecimiento, hormonas tiroideas e insulina que en conjunto se denomina “*complejo hormonal galactopoyético*”. Por otro lado, la prolactina es una de las hormonas que se sabe que tiene varias acciones centrales afectando la conducta maternal, la respuesta emocional y que también ha reportado tener efectos neuroprotectores al aumentar la tasa de supervivencia de las neuronas en el hipocampo. Además de generar efectos en la regulación de la expresión de crisis

convulsivas y propuesto como un agente potencial para la remielinización (en el caso de la enfermedad de esclerosis múltiple).

Debido a que durante la lactancia se observa un proceso de neuroprotección en el hipocampo de la madre ante la administración de AK y que las hormonas tienen un papel relevante en este fenómeno, es importante analizar si las hormonas ováricas otorgan una protección en esta estructura durante la lactancia.

Así, el objetivo principal de este estudio es estudiar la protección neuronal que aportan las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) durante este periodo. Para ello, se utilizó el modelo de la rata (madre) lactante ovariectomizada. Este modelo es útil, ya que cuenta con toda la complejidad hormonal y sensorial que representa la lactancia, pero sin la presencia de las hormonas ováricas, en especial de la progesterona, que es la que se encuentra elevada en madres lactantes intactas durante la mayor parte de la fase de lactancia.

IV. HIPÓTESIS.

La ausencia de hormonas ováricas durante la lactancia, aumentará la neurodegeneración o muerte neuronal inducida por la administración de AK en el hipocampo dorsal de la rata.

V. OBJETIVOS.

V.1.1 General.

* Determinar si las hormonas ováricas generan un efecto neuroprotector en el hipocampo dorsal de la rata durante la lactancia por la inducción de AK.

V.2.1 Particulares

* Comparar la neurodegeneración generada por AK en el hipocampo dorsal de ratas lactantes intactas y ratas lactantes ovariectomizadas.

* Estimar un nivel de neuroprotección que brindan las diferentes hormonas implícitas durante la lactancia.

* Comparar si existe alguna diferencia en la tasa de crecimiento de las crías debido a la falta de hormonas ováricas durante la lactancia, como consecuencia del retiro de estas durante la lactancia.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

VI.1. Animales

Los animales empleados en el presente estudio fueron 25 ratas hembras vírgenes (en fase de diestro) y lactantes (5 x grupo) de la cepa Wistar (lco: WI (IOPS AF/Han) con pesos aproximados a 250-300 grs de peso corporal, mantenidas en ciclo L-O (12:12) y temperatura ambiental controlada (24°+2°C). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* de agua y comida (*Rat chow, Purina*) y estuvieron alojados en cajas de acrílico transparente de 47cm. x 25.5 x 20 cm. de altura.

Las ratas lactantes se sometieron a una cirugía en donde se les extrajeron los ovarios (ovarectomía), dos días después de haber parido a sus crías.

La distribución de las diferentes condiciones experimentales se esquematiza en la siguiente figura (Fig. 12).

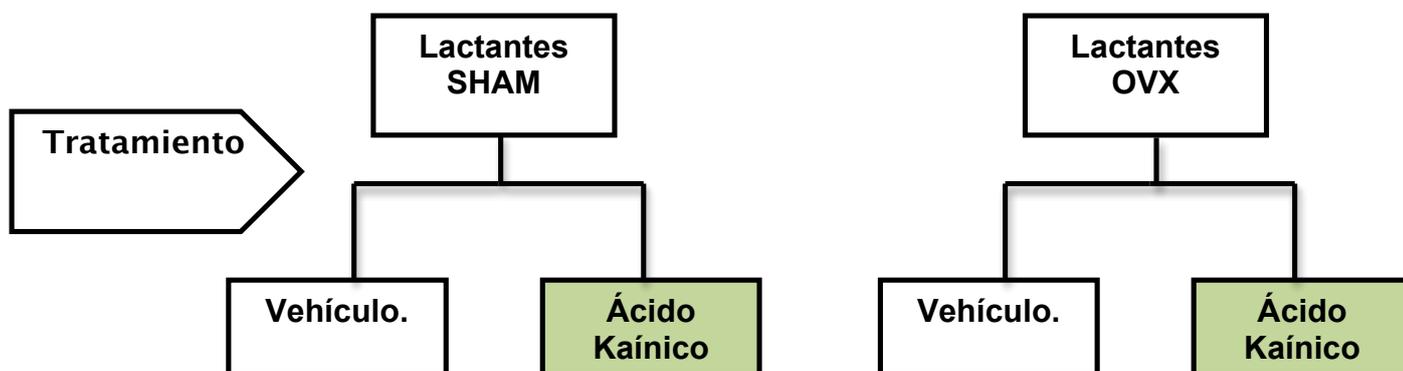


Fig. 12. Diferentes condiciones experimentales. Se presenta la distribución de las cuatro condiciones experimentales a) SHAM-SAL/Vehículo, b) SHAM/AK, c) OVX-SAL/Vehículo, d) OVX/AK.

Todas las manipulaciones a las que se sometieron los animales se hicieron de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de mamíferos en Investigación en Neurociencias y Conducta del National Research Council; y el protocolo fue revisado por el comité de Bioética del Instituto de Neurobiología.

VI.1.1 Ratas lactantes intactas y ovariectomizadas (OVX)

Las ratas lactantes que se utilizaron en este estudio se dividieron en cuatro grupos. 1) Ratas lactantes intactas (Sham) / Vehículo, 2) Ratas lactantes intactas (Sham) / ácido kaínico, 3) Ratas lactantes (ovariectomizadas)/Vehículo, 4) Ratas lactantes (ovariectomizadas)/ácido kaínico. Cada grupo estuvo formado por 5 animales y se ajustó su camada a 10 crías a partir de su nacimiento respectivamente. Las ratas fueron sometidas a la cirugía “sham” o a la ovariectomía 2 días posteriores al nacimiento de las crías. El diseño experimental que se realizó para ambos grupos se esquematiza en la siguiente figura (Fig. 13).

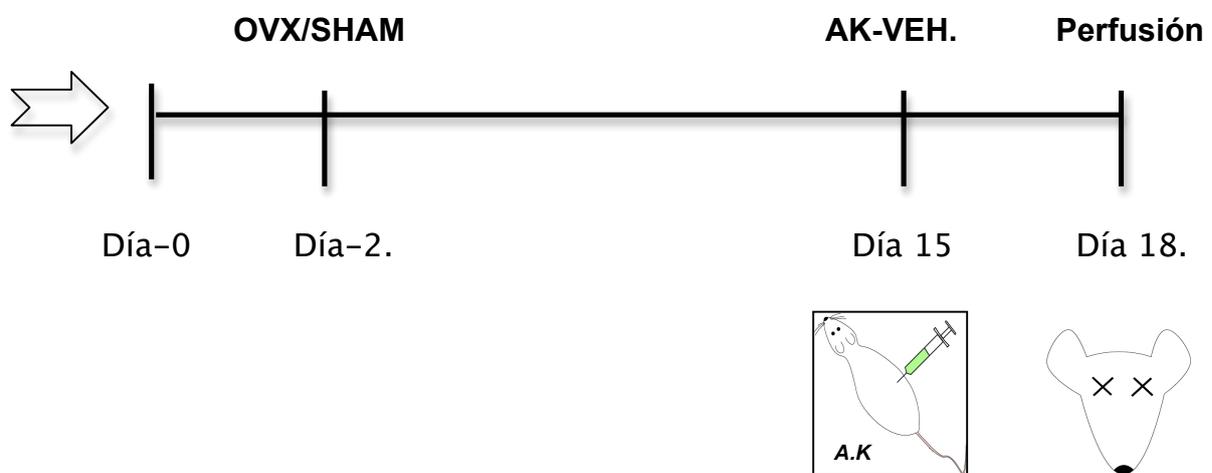


Fig. 13. Diseño experimental. Esquema de la ovariectomización/sham y lesión excitotóxica, en las cuatro condiciones experimentales. A partir del primer día. Donde inicia, el día del nacimiento de las crías, al día 18 que finaliza la lactancia, donde se perfunde a los animales y se extrae el cerebro.

VI.1.2 Ratas Vírgenes

Por último, se obtuvo un grupo de ratas vírgenes en fase de diestro (nulíparas) / AK, con el fin de obtener un grupo control y poder tener una comparación del daño excitotóxico producido por la administración de AK con respecto a las ratas lactantes.

VI.2 Paradigmas experimentales

*Daño excitotóxico por la administración intraperitoneal (sistémica) de AK:

Los animales recibieron una inyección intraperitoneal (ip.) de ácido kaínico de 7.5 mg/kg. pc el día 15 posterior a que nacieron las crías (post-parto). Todos los animales fueron

perfundidos 48 horas después de haber recibido la administración de ácido kaínico, la cuál se realizó a las 11am. en todos los casos.

VI.3 HISTOLOGIA

VI.3.1 Perfusión y obtención de cortes

Cuarenta y ocho horas después de la administración de ácido kaínico/vehículo, los animales fueron anestesiados y perfundidos con 250 ml de solución salina isotónica (0.9%), seguido de 250 ml de PBS (buffer de fosfatos, *Sigma*) con PAF (paraformaldehído, *Sigma*). Posteriormente los cerebros se removieron y se fijaron en PAF 4% durante 12 horas. Al día siguiente, para su crioprotección se suspendieron en PBS con un gradiente de sacarosa al 10% manteniendo siempre el tejido en refrigeración a (4°C). Posterior a la crioprotección del cerebro se preparó para realizar los cortes y comenzar con los protocolos de histología (*Fig. 14*).

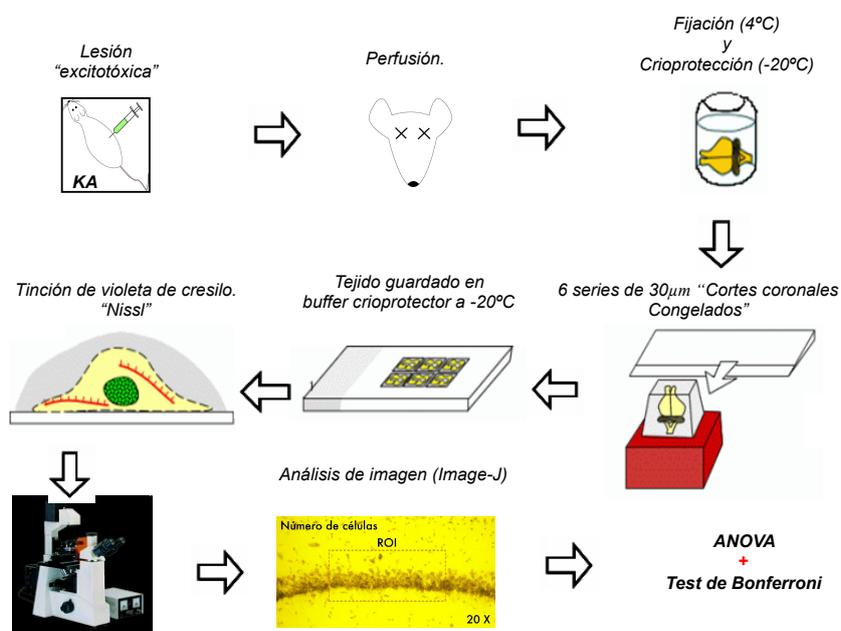


Fig. 14. Procesamiento del tejido. Número de pasos a los que se sometió el tejido a partir de la lesión excitotóxica inducida por la administración de ácido Kaínico para obtener los parámetros de cuantificación de células y pixeles.

Se realizaron cortes de hipocampo dorsal coronales de 30 µm de espesor con un micrótopo de congelación. Los cortes del hipocampo se colectaron en 5 series en una caja estéril para cultivo (cajas Costar, 6x5 pozos) a modo de tener una serie representativa del hipocampo (*Fig. 15*). De esta manera, cada serie contiene un corte cada 150 µm y la serie de tejido siguiente corresponde a secciones consecutivas. Esto a su vez, otorga una reconstrucción

tridimensional del hipocampo. Los cortes fueron almacenados en solución crioprotectora (600 ml de etilenglicol, *Fisher Scientific*, 300g de sacarosa *Sigma*, 500ml PBS y 500 ml de H₂O desionizada).

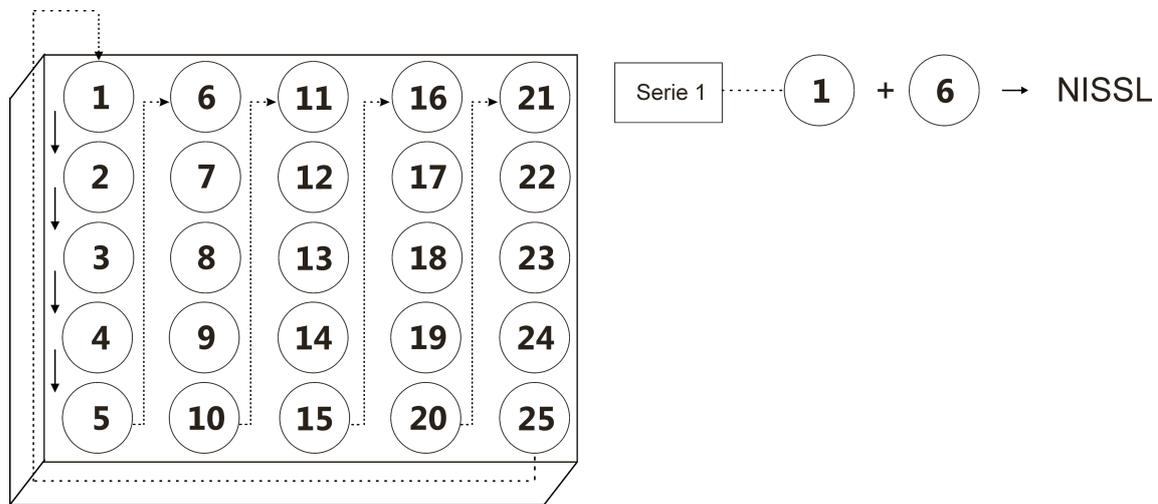


Fig. 15. Almacenamiento de tejido, "Muestreo 1 en 5".

Orden de colocación de los cortes del tejido hipocámpal en la caja de cultivo, entre cada serie hay 150µm de diferencia. Una vez almacenados, el tejido se almacena a -20° C hasta su procesamiento para los diferentes protocolos experimentales (este tipo de muestreo permite hacer una reconstrucción tridimensional con el tejido recolectado).

VI.3.2 Tinción de Nissl

La tinción de Nissl es una técnica histológica desarrollada por el neurólogo Alemán Franz Nissl en el siglo XIX. Esta tinción utiliza sustancias o colorantes *básicos* que tiñen principalmente las acumulaciones basófilas, llamadas también "*cuerpos de Nissl*", ubicados en el núcleo de las células nerviosas. Estas acumulaciones ó "*cuerpos de Nissl*" son el retículo endoplasmático rugoso, lugar en donde se da una intensa síntesis de proteínas (*Fig. 16*).

Esta técnica nos permitió teñir las células del hipocampo, lo que nos dio un indicador de la morfología gruesa y de muerte neuronal por daño excitotóxico.

Nuestro protocolo hace uso de un tren de tinción para someter el tejido a los siguientes pasos: **1)** Lavado con Buffer de fosfatos, **2)** montaje sobre porta objetos, **3)** secado a temperatura ambiente, **4)** lavado con H₂OD, **5)** deshidratación gradual en gradientes de concentración creciente de etanol (50%, 70%, 95%, y 100%), **6)** aclarado con xileno, **7)** Rehidratación gradual en gradientes de concentración decrecientes de etanol (100%, 95%,

70% y 50%), **8)** Teñido en solución de tionina [(0.25%) violeta de cresilo] durante diez minutos, **9)** lavado con H₂O, **10)** Deshidratación gradual en gradientes de concentración creciente de etanol (50%, 70%, 95% y 100%), **11)** aclarado con xileno, **12)** inclusión con resina (DPX, *Electron Microscopy Science-BDH, mountant for microscopy*) y cubre objetos, **13)** Secado de laminillas **14)** Observación en microscopio de campo claro y fluorescencia **15)** captura de imágenes digitales de las áreas de interés **16)** Análisis de imágenes y áreas de interés.

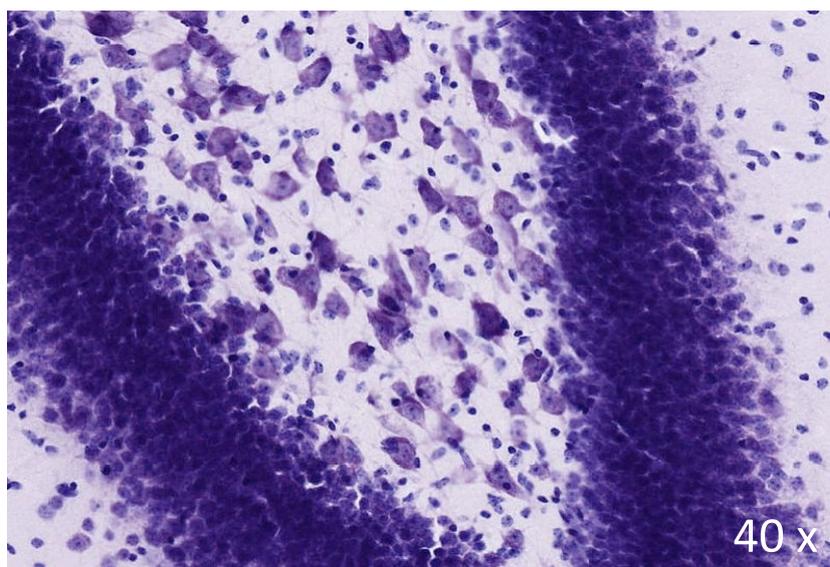


Fig. 16. Tinción de Nissl. Imagen de una sección histológica del hipocampo de roedor con tinción de Nissl mostrando varios tipos de neuronas (núcleos).

VI.4 Obtención de Datos

Los datos se obtuvieron mediante imágenes tomadas en microscopio de campo claro de las diferentes áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4 (*Fig. 17,a*). Estas imágenes se digitalizaron y se analizaron con el programa *Image J*, contabilizando el número de células teñidas bajo un protocolo establecido. Para cada área hipocampal se estableció una región representativa, *región de interés* (ROI) en donde se cuantificó el número de células.

Se cuantificaron 6 rebanadas de 30 μ m por cada animal de las áreas CA1, CA3 y CA4 para el análisis estadístico (*Fig. 17,b*). Por otra parte, también se obtuvieron datos con los pesos de las crías lactantes. Esto con el principal objetivo de saber si la retirada de las hormonas ováricas, tenía algún efecto sobre la tasa de crecimiento de las crías. Esto se obtuvo registrando el peso corporal de las crías por las mañanas cada tercer día, durante los 18 días que duró el experimento (lactancia).

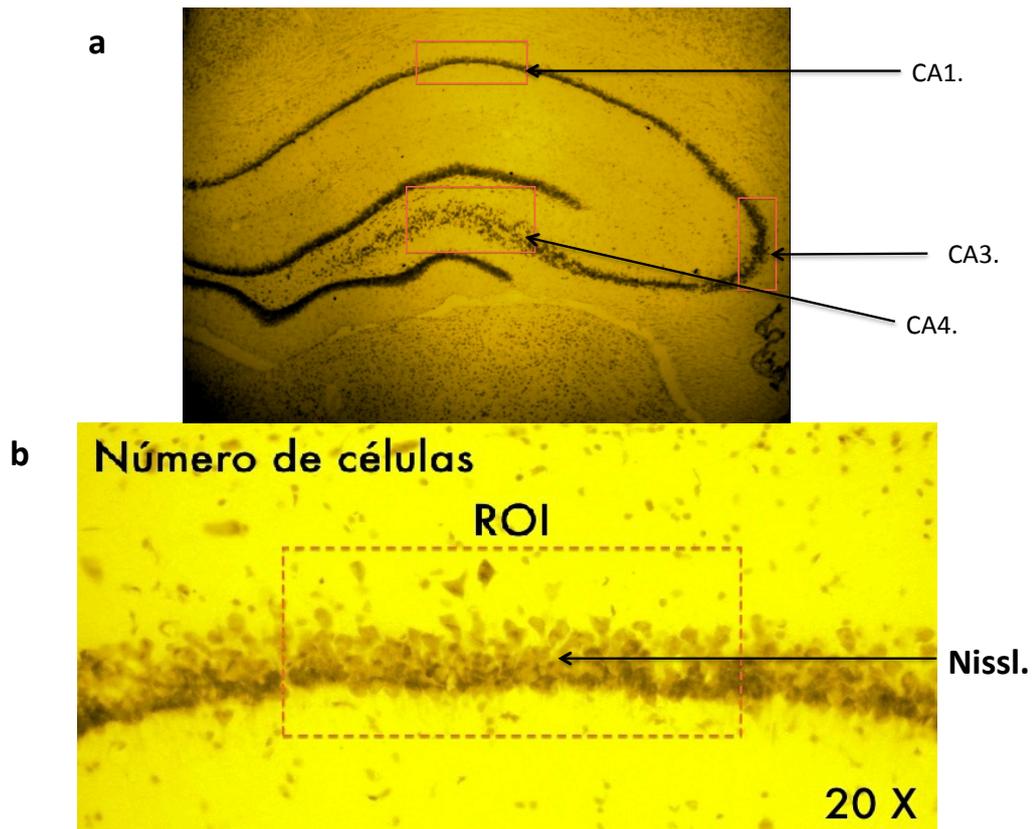


Fig. 17. Areas hipocampales bajo estudio. a) Corte coronal de hipocampo dorsal de 30 μm que muestra las tres regiones estudiadas. b) Se muestra el tipo de imagen analizada, "campo claro" en las que se observan las dimensiones de la región de interés (ROI), en donde se cuantifico el número de células. Dichas imágenes fueron procesadas con el software "Image-J".

VI.4 Análisis estadístico

Utilizando el programa estadístico Graph Pad *PRISM* se aplicaron análisis de Varianza de una vía, seguidas de la prueba de comparación múltiple *Bonferrioni*, para cada uno de los grupos experimentales (OVX-AK, OVX-SAL, SHAM-AK, SHAM-SAL) (Fig. 18). Las gráficas representan el promedio \pm error estándar, a partir de una $p < 0.05$ que fue considerada estadísticamente significativa. Se utilizó también una T de Student para la comparación de pares entre grupos (Fig. 22).

VII. RESULTADOS

VII.1.1 Tinción de Nissl

El conteo celular realizado en las laminillas procesadas mediante la técnica histológica de Nissl, nos reveló, que la administración sistémica de ácido kaínico, indujo degeneración en el hipocampo dorsal causado por daño excitotóxico. En las figuras siguientes se pueden observar las diferencias de daño que presentaron los grupos experimentales. En donde las condiciones de las ratas lactantes intactas/kaínico (SHAM-AK) y el grupo de lactantes Intactas/salina (SHAM- SAL) fueron los grupos que presentaron menor degeneración en las áreas del hipocampo dorsal analizadas. De la misma manera se puede observar que el grupo de ratas ovariectomizadas que se les administró únicamente solución salina (OVX-SAL), no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo de ratas lactantes intactas (SHAM-AK; SHAM-SAL) sobre el número de células por región de interés (ROI).

Por otro lado, en los grupos de ratas lactantes ovariectomizadas (OVX-AK) se encontraron diferencias significativas con los grupos mencionados a excepción del grupo de ratas vírgenes en fase de “*estro*”, en las tres áreas hipocampales bajo estudio (*= $P < 0.05$ y ***= $P < 0.001$). Estas diferencias, nos indican que durante la lactancia, las hormonas ováricas se encuentran brindando un efecto de protección neuronal, ya que en este caso se encuentran ejerciendo su efecto neuroprotector en el hipocampo dorsal, amortiguando el daño excitotóxico del AK (*Figuras 18 y 19*). Además se realizó un estimado porcentual de las células que no fueron dañadas entre el grupo que contó con la exposición a las hormonas ováricas (SHAM-AK) durante la lactancia en comparación con el grupo que no la tuvo (OVX-AK) (*Fig. 20*).

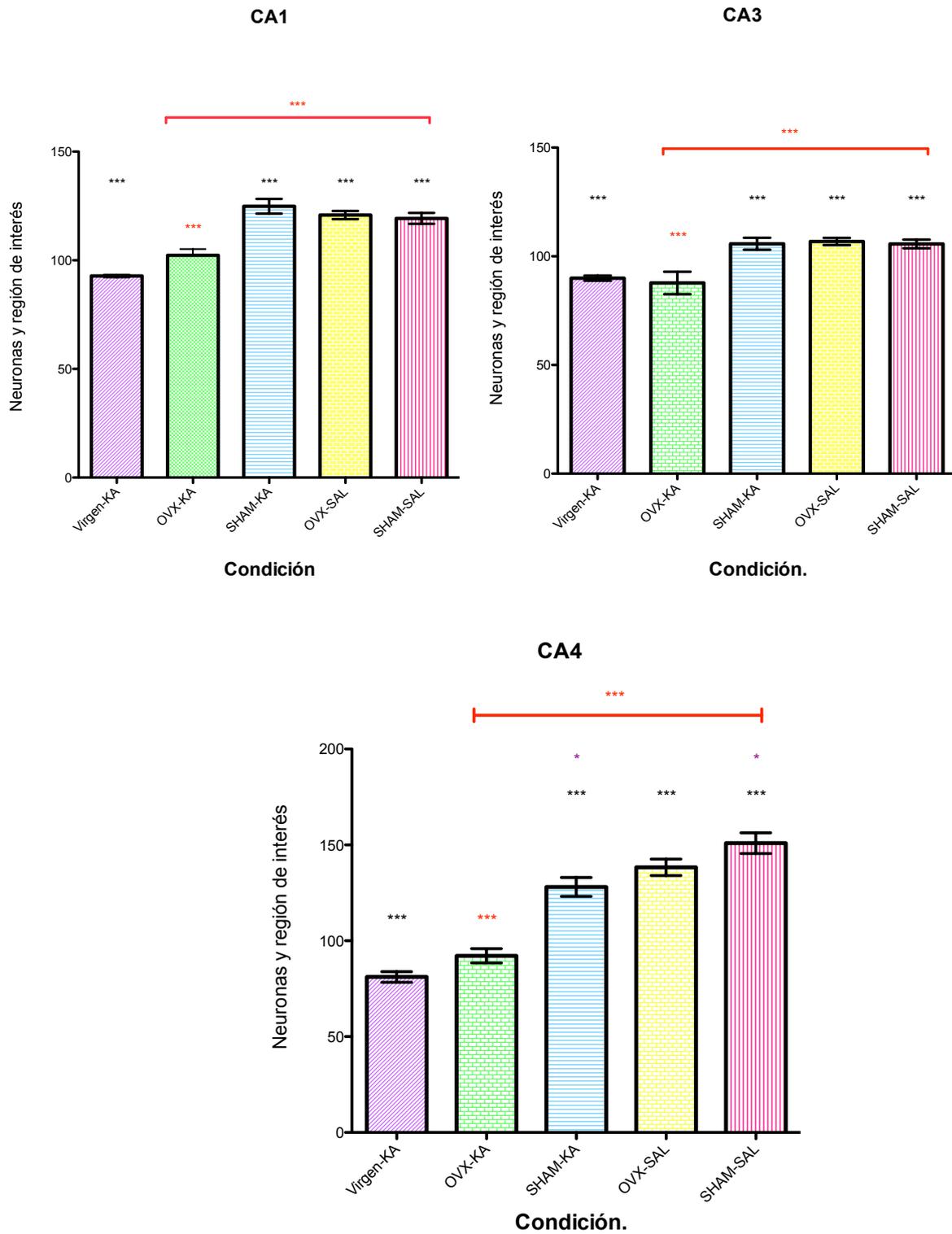


Fig. 18,19,20. Tinción de Nissl. Cuantificación del número de células por región de interés (ROI) en las áreas hipocámpales CA1, CA3 y CA4, de las 5 condiciones experimentales (OVX-AK; OVX-SAL; SHAM-AK; SHAM-SAL y Virgen-AK). Nivel de significancia $*=P<0.05$ y $***=P<0.001$.

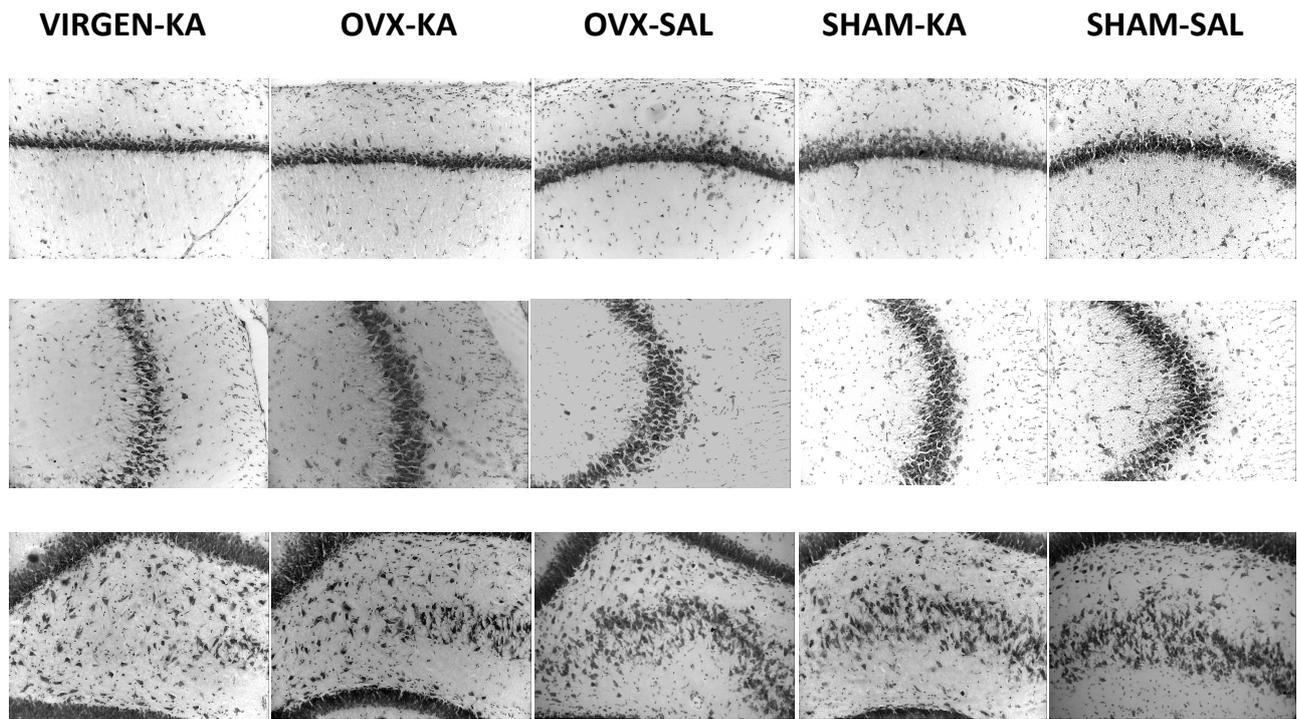


Fig. 21. Tinción de Nissl. Fotografías digitales capturadas en microscopio de campo claro de las áreas hipocampales CA1, CA3 y CA4, que muestran la técnica histológica de las 5 condiciones experimentales; Virgen-KA, OVX-KA, OVX-SAL, SHAM-KA y SHAM-SAL respectivamente. Amplificación 20x $P = <0.05$ y 0.001

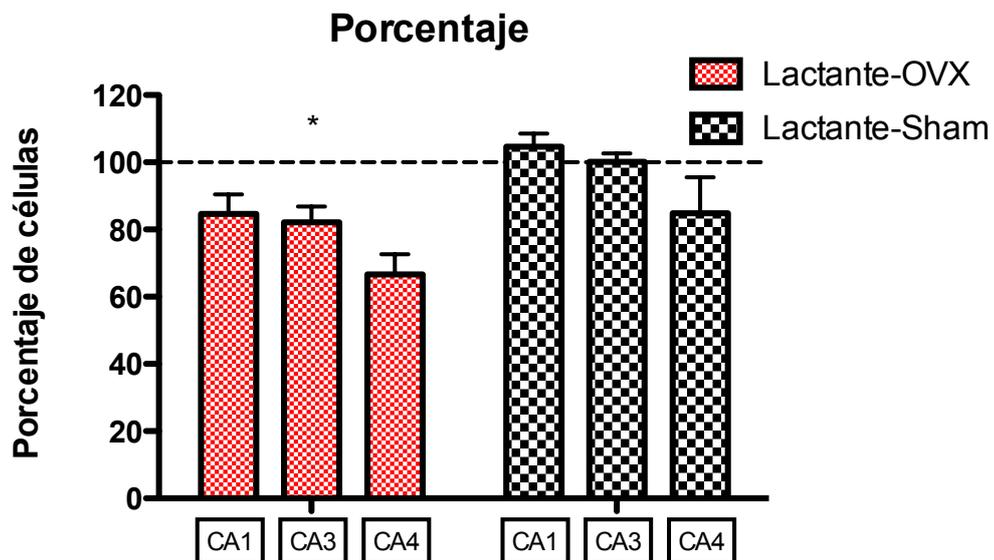


Fig. 22. Porcentaje de células. Porcentaje de células entre los grupos en donde hubo exposición a las hormonas ováricas (SHAM) y en donde no hubo durante la lactancia (OVX) Las barras representan la desviación estándar $N=5$; $*=P<0.05$.

VII.1.2 Tasa de crecimiento de las crías

Otro de los aspectos que se investigaron en este estudio, fue la tasa de crecimiento de las crías durante la lactancia (peso en gramos). Debido a que en algunos grupos, a las ratas lactantes se les removieron los ovarios con el fin de eliminar la principal fuente de hormonas ováricas durante la lactancia. Se investigó si la falta de hormonas ováricas influye en el crecimiento de las crías durante la lactancia. Los resultados que se obtuvieron durante la lactancia mostraron que no hubo diferencias significativas entre las crías de las ratas lactantes intactas y las ratas lactantes ovariectomizadas (* $P > 0.05$). Esto nos indica, que la falta de hormonas ováricas durante la lactancia no influye en la tasa de crecimiento de las crías de ninguna forma (Fig. 23).

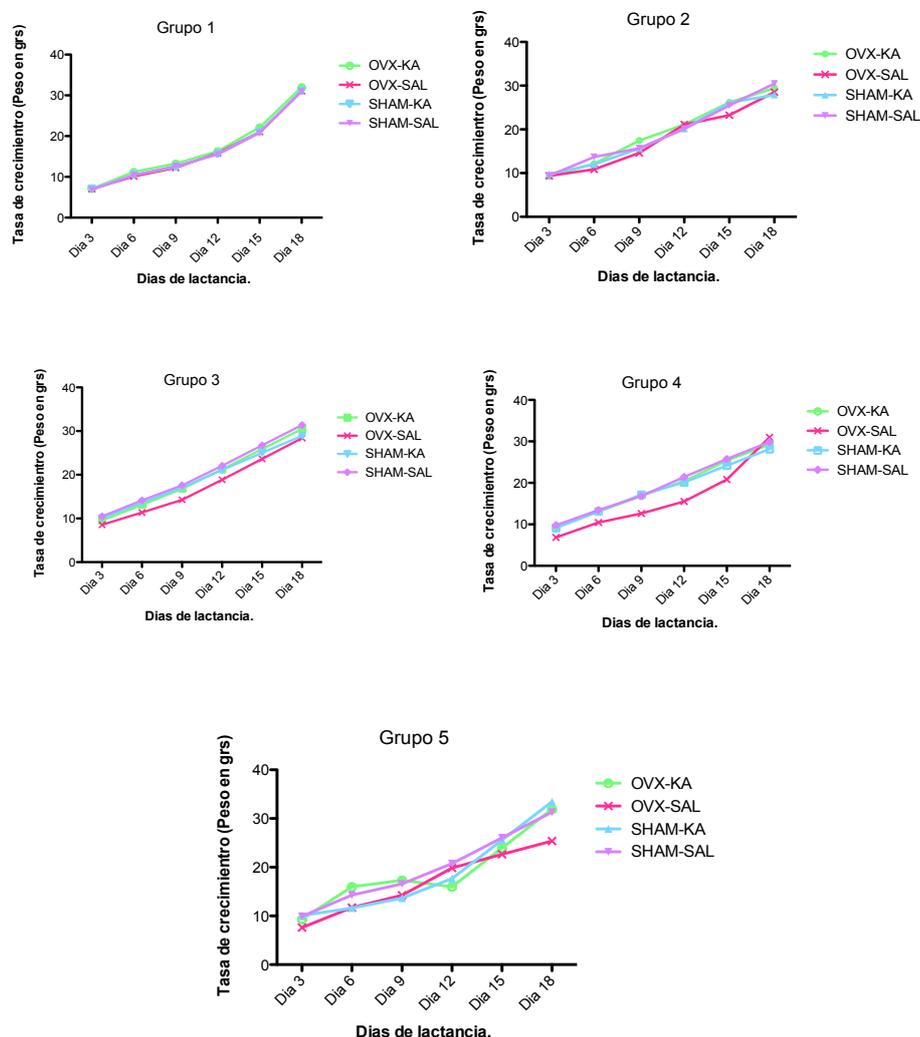


Fig.23. Tasa de crecimiento. Las siguientes gráficas representan el promedio de la tasa de crecimiento de las crías durante la lactancia. Se representan las diferentes condiciones con sus diferentes grupos. Como se puede observar no se presentaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones. Lo que nos sugiere que la falta de hormonas ováricas no afectó el crecimiento de las crías durante la lactancia ya que todas presentaron la misma tasa de crecimiento $N=5$; $P > 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue determinar si la ausencia de hormonas ováricas durante la lactancia, incrementaba el daño excitotóxico en el hipocampo dorsal de la rata lactante por la administración de ácido kaínico. El resultado final mostró que las hormonas ováricas, en efecto, participan en el mecanismo de protección que se presenta durante la lactancia. Esto debido a que el daño excitotóxico causado por la administración de ácido kaínico fue mayor en las ratas lactantes que tuvieron una ovariectomización (OVX), en comparación con el grupo de ratas lactantes intactas (SHAM). Por otro lado, las condiciones en donde se administró únicamente solución salina (SHAM-SAL, OVX-SAL) con fines de control experimental, no registraron diferencias significativas con sus similares en términos de números de células marcadas por región analizada en las diferentes áreas del hipocampo (CA1, CA3 y CA4). Por otra parte los resultados muestran una gran pérdida de células en los grupos de ratas OVX-AK y Virgen-AK, reafirmando la vulnerabilidad selectiva de esta área hipocampal [111]. Una posible interpretación de estos resultados, es que la falta de hormonas ováricas durante la lactancia hizo más vulnerable al hipocampo de las madres.

Es sabido que las experiencias reproductivas en las hembras de los mamíferos generan diversas modificaciones anatómicas y funcionales en el cerebro de la madre [4, 9]. Estas modificaciones favorecen el cuidado de la progenie [5, 63]. La lactancia es la fase final del ciclo reproductivo de los mamíferos, y se caracteriza por ser un estado hiperprolactinémico y transitorio que tiene la finalidad de proporcionarle alimentación y un desarrollo sano a las crías recién nacidas [3, 4]. Esta alimentación brindada a través de la leche proporciona diversos nutrientes y sustancias bioactivas como factores de crecimiento, proteínas, hormonas y péptidos biológicamente importantes para la progenie [17, 18]. Por otro lado, es durante este periodo donde ocurren las mayores modificaciones estructurales y funcionales en el cerebro de la madre debido a la estimulación por la succión de las crías generando también altos niveles hormonales. Debido a que durante esta fase del ciclo reproductivo se presenta esta reorganización anatómica-funcional, este periodo ha sido considerado un modelo natural de plasticidad morfológica, neuroquímica y funcional del sistema nervioso central [4, 9]. La plasticidad cerebral es la capacidad o propiedad intrínseca del Sistema Nervioso de generar cambios bioquímicos, moleculares, celulares, estructurales y funcionales con la finalidad de adaptarse a las variaciones del medio y minimizar los efectos aversivos en caso de una lesión y/o envejecimiento. Los procesos neuronales que ocurren dentro de la plasticidad neuronal son: crecimiento dendrítico, arborización, sinaptogénesis, neurogénesis, cambios en las funciones de las células gliales y mecanismos de protección

neuronal (neuroprotección) [20, 22]. Esto último, tiene como función la protección y facilidad de adaptación ante factores dañinos, por lo que la neuroprotección ha sido definida como el conjunto de procesos orientados a prevenir, limitar o aminorar las lesiones que se puedan desencadenar como resultado de algún daño o muerte neuronal [25].

Por otro lado, la administración intracerebral o intraperitoneal de ácido kaínico genera una serie de manifestaciones clínicas y cambios patológicos en roedores, como ataques epilépticos recurrentes, cambios conductuales, estrés oxidativo incluyendo la generación de radicales libres, muerte neuronal y activación glial [38].

Estudios de nuestro grupo han demostrado que la lactancia genera procesos de protección neuronal en el hipocampo dorsal al aminorar el daño selectivo por excitotoxicidad por la administración de ácido kaínico [10, 28]. La explicación a esto es que durante la lactancia se presentan niveles hormonales altos, principalmente de hormonas como la prolactina, oxitocina, glucocorticoides, adrenocorticotropina (ACTH), hormona del crecimiento, hormonas tiroideas, insulina y hormonas ováricas (estrógenos y progesterona), que en conjunto es denominado *complejo hormonal galactopoyetico* [3]. Además se sabe que algunas de ellas pueden tener acciones neuroprotectoras. Así, este complejo hormonal puede tener acciones protectoras como resultado de la reestructuración que se da en el cerebro de la madre durante éste periodo [4, 10]. Las principales hormonas que mayoritariamente generan estos efectos neuroprotectores durante la lactancia son la prolactina y las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona), ya que tienen acciones que favorecen la supervivencia neuronal [11, 105]. Durante la lactancia los niveles de prolactina se mantienen elevados como respuesta de la estimulación de succión de las crías [15]. Por otro lado, en relación con las hormonas ováricas, el nivel circulante de estrógeno aumenta al momento del parto manteniéndose alto durante los primeros días posteriores y por último los niveles de progesterona a pesar de que tienen un gran decremento en relación con los niveles que presenta durante el embarazo, en la lactancia se siguen manteniendo elevados en comparación con los niveles basales del estado de proestro gracias al mantenimiento del cuerpo lúteo y a la liberación de prolactina que se libera por la succión de las crías [66].

En el caso de las hormonas ováricas, la progesterona es la que tiene mayor participación durante la lactancia, debido a que se presenta con mayor concentración y tiempo en comparación con su similar el estradiol (estrógenos) [15, 16, 66]. Existe mucha información que demuestra que las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) poseen características en el ámbito de la protección neuronal [93, 106]. Sin embargo, por otro lado la

prolactina también ha mostrado tener efectos protectores contra el daño excitotóxico por ácido kaínico.

Esto nos sugiere en gran medida que la fluctuación de hormonas ováricas, principalmente la progesterona, tiene una participación considerable en la protección que se está llevando a cabo en la lactancia [11, 66].

Por otro lado no podemos decir con exactitud de que manera las hormonas ováricas se encuentran generando este proceso de protección durante la lactancia, esto en base a que la técnica utilizada nos brinda únicamente información morfológica de las estructuras analizadas, ya que su característica principal es la de teñir los núcleos (retículo endoplasmático) de aquellas células que no fueron afectadas por el ácido kaínico. Sin embargo la explicación de este mecanismo se puede dar parcialmente en base a los mecanismos de muerte por excitotoxicidad que se tienen sabidos, teniendo como fuentes primarias la activación de vías de señalización y factores de muerte neuronal como la apoptosis y necrosis por el incremento intracelular de Ca^{+} debido a la sobre estimulación de receptores glutamatérgicos. Sobre este contexto podemos decir que las hormonas ováricas pudieran estar ejerciendo su efecto a través de algunos de estos mecanismos ya que diversos estudios indican que tienen la capacidad de modular la entrada de algunos iones, principalmente el Ca^{+} mediante el bloqueo de ciertos canales [92, 107].

En base a esta información, podemos decir que las hormonas ováricas son de importancia para que la protección durante la lactancia se lleve a cabo. Sin embargo, no podemos afirmar que éste fenómeno de neuroprotección es llevado únicamente por estas dos hormonas, ya que como mencionamos anteriormente, estas hormonas son solo una parte de un complejo hormonal que se presenta durante este periodo (complejo hormonal galactopoyético), además de que la prolactina también ha mostrado tener propiedades de neuroprotección y también presenta niveles altos en sus concentraciones durante la lactancia pudiendo estar ayudando en gran medida o porcentaje a la protección de manera más integral [11]. Apoyando esto, estudios previos de nuestro equipo han mostrado con la misma técnica, que se genera una pérdida similar al 50% de células en las regiones analizadas en ratas en estado de diestro [28], esto en comparación de un 75-80% que se obtuvo en el grupo de las ratas lactantes OVX-AK.

El presente modelo de la rata lactante ovariectomizada fue de utilidad para estos estudios, ya que la lactancia representa una situación compleja donde varias hormonas influyen en el cerebro de la madre, al igual que la estimulación externa (succión de las crías y señales

exteroceptivas). En este trabajo, también se evaluó la tasa de crecimiento de las crías durante el periodo de lactancia, con el objetivo principal de saber si la retirada de hormonas ováricas tendría algún impacto en su crecimiento. Los resultados mostraron que todas las crías independientemente de la condición experimental de la madre, tuvieron un crecimiento similar que no se afectó por la ovariectomía. Esto nos permite decir que las hormonas ováricas no afectaron el aporte nutricional para las crías de las ratas lactantes.

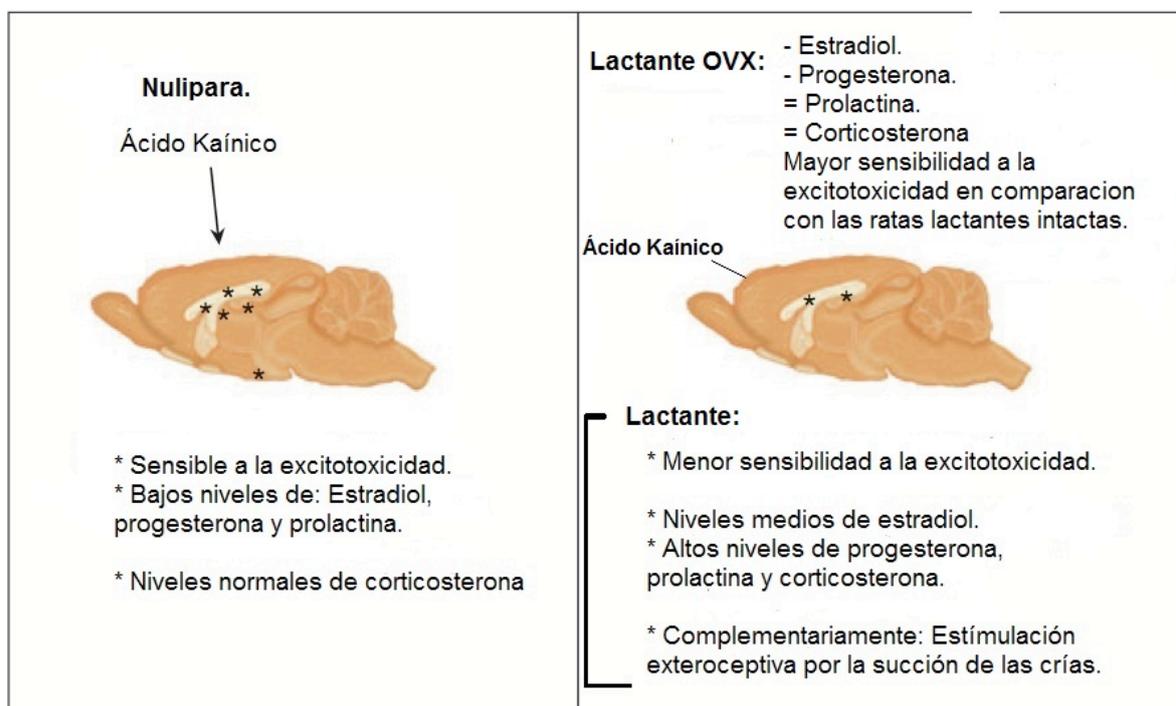
En síntesis, los resultados presentados en este trabajo, muestran diferencias estadísticamente significativas de que las hormonas ováricas generan un efecto de neuroprotección en el hipocampo dorsal durante la lactancia en la rata hembra siendo parte importante del fenómeno de neuroprotección que se da durante la lactancia. Este junto con otros estudios previos, sugieren que la exposición hormonal crónica es importante en la neuroprotección, lo cual hace interesante contar con más estudios sobre estas hormonas para abordarlas desde otras perspectivas.

IX. CONCLUSIONES

El ácido kaínico mostró el daño excitotóxico esperado en los grupos control. Este efecto se tradujo en una disminución en el número de células en las zonas hipocampales estudiadas (CA1, CA3 y CA4) durante la lactancia.

De manera general, observamos que la falta de hormonas ováricas durante la lactancia, incremento en gran medida la degeneración en dichas zonas del hipocampo. Sugiriendo que durante la lactancia las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) generan en gran medida la protección dada durante esta fase del ciclo reproductivo. Por otro lado, el crecimiento de las crías durante la lactancia fue similar entre cada uno de los grupos, concluyendo que la falta de hormonas ováricas durante la lactancia no genera cambios en la tasa de crecimiento de las crías.

En conclusión, los resultados del presente estudio muestran que las hormonas ováricas previenen el daño excitotóxico por la administración de ácido kaínico durante la lactancia y la falta de éstas no afectan el desarrollo de las crías durante la lactancia.



Esquema. El presente diagrama nos muestra los diferentes resultados del tratamiento con ácido kaínico en las ratas nulíparas, lactantes y lactantes OVX. Las ratas lactantes que no tienen exposición a las hormonas ováricas durante la lactancia tienen mayor sensibilidad al daño excitotóxico que las ratas lactantes intactas, teniendo un daño similar al de las ratas nulíparas.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Clutton-Brock, T.H. and A.C. Vincent, *Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females*. Nature, 1991. **351**(6321): p. 58–60.
2. Kinsley, C.H. and K.G. Lambert, *Reproduction-induced neuroplasticity: natural behavioural and neuronal alterations associated with the production and care of offspring*. J Neuroendocrinol, 2008. **20**(4): p. 515–25.
3. Mepham, T.B., *Physiology of lactation* 1987, Milton Keynes ; Philadelphia: Open University Press. xvi, 207 p.
4. Kinsley, C.H. and K.G. Lambert, *The maternal brain*. Sci Am, 2006. **294**(1): p. 72–9.
5. Morales, T., *Recent findings on neuroprotection against excitotoxicity in the hippocampus of female rats*. J Neuroendocrinol, 2011. **23**(11): p. 994–1001.
6. Oliet, S.H., *Functional consequences of morphological neuroglial changes in the magnocellular nuclei of the hypothalamus*. J Neuroendocrinol, 2002. **14**(3): p. 241–6.
7. Armstrong, W.E. and G.I. Hatton, *The puzzle of pulsatile oxytocin secretion during lactation: some new pieces*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **291**(1): p. R26–8.
8. Kinsley, C.H., et al., *Motherhood improves learning and memory*. Nature, 1999. **402**(6758): p. 137–8.
9. Kinsley, C.H., et al., *Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines*. Horm Behav, 2006. **49**(2): p. 131–42.
10. Cabrera, V., et al., *Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity*. Neurosci Lett, 2009. **461**(2): p. 136–9.
11. Tejadilla, D., M. Cerbon, and T. Morales, *Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones*. Neuroscience, 2010. **169**(3): p. 1178–85.
12. Russell, J.A., A.J. Douglas, and C.D. Ingram, *Brain preparations for maternity--adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview*. Prog Brain Res, 2001. **133**: p. 1–38.
13. Neumann, I.D., S.A. Kromer, and O.J. Bosch, *Effects of psycho-social stress during pregnancy on neuroendocrine and behavioural parameters in lactation depend on the genetically determined stress vulnerability*. Psychoneuroendocrinology, 2005. **30**(8): p. 791–806.
14. Neumann, I.D., et al., *Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin*. Eur J Neurosci, 2001. **13**(5): p. 1016–24.
15. Smith, M.S., *The effects of high levels of progesterone secretion during lactation on the control of gonadotropin secretion in the rat*. Endocrinology, 1981. **109**(5): p. 1509–17.
16. Smith, M.S., *Effects of the intensity of the suckling stimulus and ovarian steroids on pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during lactation*. Biol Reprod, 1984. **31**(3): p. 548–55.
17. Koldovsky, O. and W. Thornburg, *Hormones in milk*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1987. **6**(2): p. 172–96.
18. West, H.J., *The clearance of bromosulphthalein from plasma as a measure of the changes in hepatic function during pregnancy and lactation in ewes*. Br Vet J, 1989. **145**(6): p. 506–16.

19. Grosvenor, C.E. and F. Mena, *Regulation of prolactin transformation in the rat pituitary*. Ciba Found Symp, 1992. **168**: p. 69–80; discussion 80–6.
20. Pascual-Leone, A., et al., *The plastic human brain cortex*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 377–401.
21. Berlucchi, G. and H.A. Buchtel, *Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning*. Exp Brain Res, 2009. **192**(3): p. 307–19.
22. Llorens-Martin, M., I. Torres-Aleman, and J.L. Trejo, *Mechanisms mediating brain plasticity: IGF1 and adult hippocampal neurogenesis*. Neuroscientist, 2009. **15**(2): p. 134–48.
23. Bakos, J., et al., *Enriched environment influences hormonal status and hippocampal brain derived neurotrophic factor in a sex dependent manner*. Neuroscience, 2009. **164**(2): p. 788–97.
24. Gatewood, J.D., et al., *Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory an positively affects brain aging in the rat*. Brain Research Bulletin, 2005. **66**(2): p. 91–98.
25. Alexi, T., et al., *Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases*. Progress in Neurobiology, 2000. **60**(5): p. 409–470.
26. Letechipia-Vallejo, G., I. Gonzalez-Burgos, and M. Cervantes, *Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats*. Archives of Medical Research, 2001. **32**(3): p. 186–192.
27. Lightman, S.L., et al., *Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis*. Prog Brain Res, 2001. **133**: p. 111–29.
28. Vanoye-Carlo, A., et al., *Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat*. Horm Behav, 2008. **53**(1): p. 112–23.
29. Monasterio, N. and T. Morales, *Nitric oxide has a role in attenuating the neuroendocrine response to anaphylactoid stress during lactation*. Brain Res, 2011. **1402**: p. 54–66.
30. Monasterio, N., E. Ramos, and T. Morales, *Changes in c-Fos and NOS expression in the PVH of lactating rats in response to excitotoxicity and stress*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1148**: p. 161–4.
31. Kandel, E.R., *Genes, synapses, and long-term memory*. J Cell Physiol, 1997. **173**(2): p. 124–5.
32. Mei, X., et al., *Role of intracellular calcium dynamics in the short-term memory in CVM model: a simulation study*. Comput Biol Med, 2011. **41**(4): p. 206–10.
33. Olney, J.W., *Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1990. **30**: p. 47–71.
34. Olney, J.W., *Excitotoxicity: an overview*. Can Dis Wkly Rep, 1990. **16 Suppl 1E**: p. 47–57; discussion 57–8.
35. Beal, M.F., *Mechanisms of Excitotoxicity in Neurologic Diseases*. Faseb Journal, 1992. **6**(15): p. 3338–3344.
36. Ferrer, I., *[Cell signaling in the epileptic hippocampus]*. Rev Neurol, 2002. **34**(6): p. 544–50.
37. Wang, L., et al., *Release of endogenous glutamate by AMPA receptors expressed in cultured rat costal chondrocytes*. Biol Pharm Bull, 2005. **28**(6): p. 990–3.
38. Wang, Q., et al., *Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration*. Mol Neurobiol, 2005. **31**(1–3): p. 3–16.
39. Wang, J.J., et al., *Risk factors for arterial ischemic and hemorrhagic stroke in childhood*. Pediatr Neurol, 2009. **40**(4): p. 277–81.

40. Amaral, D.G. and M.P. Witter, *The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data*. Neuroscience, 1989. **31**(3): p. 571–91.
41. Squire, L.R., *Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans*. Psychol Rev, 1992. **99**(2): p. 195–231.
42. Larriva-Sahd, J., *Some contributions of Rafael Lorente de No to neuroscience: A reminiscence*. Brain Research Bulletin, 2002. **59**(1): p. 1–11.
43. Paxinos, G. and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th ed 2007, Amsterdam ; Boston ;: Academic Press/Elsevier.
44. Lewis, F.T., *The significance of the term hippocampus*. Journal of Comparative Neurology, 1923. **35**(3): p. 213–230.
45. Blackstad, T.W., *Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination*. Journal of Comparative Neurology, 1956. **105**(3): p. 417–537.
46. Blackstad, T.W., *On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata; an experimental study in the rat*. Acta Anat (Basel), 1958. **35**(3): p. 202–14.
47. Nafstad, P.H., *An electron microscope study on the termination of the perforant path fibres in the hippocampus and the fascia dentata*. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1967. **76**(4): p. 532–42.
48. Hjorth-Simonsen, A. and B. Jeune, *Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation*. Journal of Comparative Neurology, 1972. **144**(2): p. 215–32.
49. Steward, O., *Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat*. Journal of Comparative Neurology, 1976. **167**(3): p. 285–314.
50. Andersen, P., T.V. Bliss, and K.K. Skrede, *Unit analysis of hippocampal population spikes*. Exp Brain Res, 1971. **13**(2): p. 208–21.
51. Andersen, P., T.V.P. Bliss, and K.K. Skrede, *Lamellar Organization of Hippocampal Excitatory Pathways*. Experimental Brain Research, 1971. **13**(2): p. 222–&.
52. Amaral, D.G., *Emerging principles of intrinsic hippocampal organization*. Curr Opin Neurobiol, 1993. **3**(2): p. 225–9.
53. Swanson, L.W., P.E. Sawchenko, and W.M. Cowan, *Evidence that the commissural, associational and septal projections of the regio inferior of the hippocampus arise from the same neurons*. Brain Res, 1980. **197**(1): p. 207–12.
54. Scoville, W.B. and B. Milner, *Loss of Recent Memory after Bilateral Hippocampal Lesions*. Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry, 1957. **20**(1): p. 11–21.
55. Mitchell, H.M., D.M. White, and R.P. Kraig, *Strategies for study of neuroprotection from cold-preconditioning*. J Vis Exp, 2010(43).
56. Wisden, W. and P.H. Seeburg, *A Complex Mosaic of High-Affinity Kainate Receptors in Rat-Brain*. Journal of Neuroscience, 1993. **13**(8): p. 3582–3598.
57. Vincent, P. and C. Mulle, *Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity*. Neuroscience, 2009. **158**(1): p. 309–23.
58. Collins, R.C., M. McLean, and J. Olney, *Cerebral metabolic response to systemic kainic acid: 14-C-deoxyglucose studies*. Life Sci, 1980. **27**(10): p. 855–62.
59. Ben-Ari, Y. and R. Cossart, *Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress*. Trends Neurosci, 2000. **23**(11): p. 580–7.
60. Tomita, S., et al., *AMPA receptors and stargazin-like transmembrane AMPA receptor-regulatory proteins mediate hippocampal kainate neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(47): p. 18784–8.

61. Carter, C.S., M. Altemus, and G.P. Chrousos, *Neuroendocrine and emotional changes in the post-partum period*. Prog Brain Res, 2001. **133**: p. 241–9.
62. Taya, K. and G.S. Greenwald, *In vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in the pregnant rat*. Biol Reprod, 1981. **25**(4): p. 683–91.
63. Rosenblatt, J.S., *Outline of the evolution of behavioral and nonbehavioral patterns of parental care among the vertebrates: Critical characteristics of mammalian and avian parental behavior*. Scandinavian Journal of Psychology, 2003. **44**(3): p. 265–271.
64. Rothchil.I, et al., *Persistence of Progesterone Secretion in Pregnant Rats after Hypophysectomy and Hysterectomy – Comparison with Pseudopregnant, Deciduomata-Bearing Pseudopregnant, and Lactating Rats*. Journal of Endocrinology, 1973. **57**(1): p. 63–74.
65. Ochiai, K., et al., *The Importance of a Luteolytic Effect of the Pituitary in Understanding the Placental Control of the Rat Corpus-Luteum*. Endocrinology, 1983. **112**(5): p. 1687–1695.
66. Orpen, B.G., et al., *Hormonal Influences on the Duration of Postpartum Maternal Responsiveness in the Rat*. Physiology & Behavior, 1987. **40**(3): p. 307–315.
67. Neville, M.C., T.B. McFadden, and I. Forsyth, *Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002. **7**(1): p. 49–66.
68. Lambert, T.J., S.M. Fernandez, and K.M. Frick, *Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice*. Neurobiol Learn Mem, 2005. **83**(3): p. 206–16.
69. Wartella, J., et al., *Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat*. Physiol Behav, 2003. **79**(3): p. 373–81.
70. Mellon, S.H. and L.D. Griffin, *Neurosteroids: biochemistry and clinical significance*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(1): p. 35–43.
71. Gonzalez-Burgos, I., M. Alejandro-Gomez, and M. Cervantes, *Spine-type densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats*. Neurosci Lett, 2005. **379**(1): p. 52–4.
72. McEwen, B., *Estrogen actions throughout the brain*. Recent Prog Horm Res, 2002. **57**: p. 357–84.
73. Higo, S., et al., *Endogenous synthesis of corticosteroids in the hippocampus*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21631.
74. Ooishi, Y., et al., *Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus by hippocampus-derived estrogen and androgen*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012. **131**(1–2): p. 37–51.
75. McEwen, B.S. and S.E. Alves, *Estrogen actions in the central nervous system*. Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 279–307.
76. McEwen, B.S. and T.A. Milner, *Hippocampal formation: shedding light on the influence of sex and stress on the brain*. Brain Res Rev, 2007. **55**(2): p. 343–55.
77. O'Hara, R., et al., *Hormone replacement therapy and longitudinal cognitive performance in postmenopausal women*. Am J Geriatr Psychiatry, 2005. **13**(12): p. 1107–10.
78. Skibinska, A. and M. Kossut, *[Estrogens and synaptic plasticity]*. Neurol Neurochir Pol, 2003. **37 Suppl 3**: p. 39–50.
79. Vanoye-Carlo, A., et al., *Estrogen receptors increased expression during hippocampal neuroprotection in lactating rats*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **116**(1–2): p. 1–7.

80. Zhao, L., et al., *Continuous versus cyclic progesterone exposure differentially regulates hippocampal gene expression and functional profiles*. PLoS One, 2012. 7(2): p. e31267.
81. McEwen, B.S., *Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms*. J Appl Physiol, 2001. 91(6): p. 2785–801.
82. Heldring, N., et al., *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets*. Physiol Rev, 2007. 87(3): p. 905–31.
83. Kelly, M.J., J. Qiu, and O.K. Ronnekleiv, *Estrogen modulation of G-protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 1007: p. 6–16.
84. Woolley, C.S., *Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus*. Horm Behav, 1998. 34(2): p. 140–8.
85. Keefer, D.A., W.E. Stumpf, and M. Sar, *Estrogen-topographical localization of estrogen-concentrating cells in the rat spinal cord following 3 H-estradiol administration*. Proc Soc Exp Biol Med, 1973. 143(2): p. 414–7.
86. Papka, R.E., et al., *Estrogen receptor-alpha and beta-immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord*. Cell Tissue Res, 2001. 304(2): p. 193–214.
87. Merchenthaler, I., T.L. Dellovade, and P.J. Shughrue, *Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 1007: p. 89–100.
88. Hoffman, G.E., I. Merchenthaler, and S.L. Zup, *Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease*. Endocrine, 2006. 29(2): p. 217–31.
89. Morales, L.B., et al., *Treatment with an estrogen receptor alpha ligand is neuroprotective in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Journal of Neuroscience, 2006. 26(25): p. 6823–33.
90. Amantea, D., et al., *From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens*. Pharmacol Res, 2005. 52(2): p. 119–32.
91. Dubrovsky, B.O., *Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. 29(2): p. 169–92.
92. Luoma, J.I., B.G. Kelley, and P.G. Mermelstein, *Progesterone inhibition of voltage-gated calcium channels is a potential neuroprotective mechanism against excitotoxicity*. Steroids, 2011. 76(9): p. 845–55.
93. Singh, M., *Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex*. Endocrine, 2001. 14(3): p. 407–15.
94. Hoffman, G.E., et al., *Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment*. Exp Neurol, 2003. 182(1): p. 124–34.
95. Woolley, C.S. and B.S. McEwen, *Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat*. Journal of Neuroscience, 1992. 12(7): p. 2549–54.
96. Woolley, C.S. and B.S. McEwen, *Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat*. J Comp Neurol, 1993. 336(2): p. 293–306.
97. Gould, E., et al., *Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood*. Journal of Neuroscience, 1990. 10(4): p. 1286–91.
98. Hering, H. and M. Sheng, *Dendritic spines: structure, dynamics and regulation*. Nat Rev Neurosci, 2001. 2(12): p. 880–8.

99. Leuner, B., J. Falduto, and T.J. Shors, *Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus*. *Journal of Neuroscience*, 2003. **23**(2): p. 659–65.
100. Leuner, B. and T.J. Shors, *New spines, new memories*. *Mol Neurobiol*, 2004. **29**(2): p. 117–30.
101. Gazzaley, A., S. Kay, and D.L. Benson, *Dendritic spine plasticity in hippocampus*. *Neuroscience*, 2002. **111**(4): p. 853–62.
102. Nimchinsky, E.A., B.L. Sabatini, and K. Svoboda, *Structure and function of dendritic spines*. *Annu Rev Physiol*, 2002. **64**: p. 313–53.
103. Yuste, R. and T. Bonhoeffer, *Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity*. *Annu Rev Neurosci*, 2001. **24**: p. 1071–89.
104. Nilsen, J. and R.D. Brinton, *Impact of progestins on estradiol potentiation of the glutamate calcium response*. *Neuroreport*, 2002. **13**(6): p. 825–30.
105. Cervantes, M., et al., *Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus*. *Arch Med Res*, 2002. **33**(1): p. 6–14.
106. Singh, M., *Mechanisms of progesterone-induced neuroprotection*. *Future of Hormone Therapy: What Basic Science and Clinical Studies Teach Us*, 2005. **1052**: p. 145–151.
107. Luoma, J.I., C.M. Stern, and P.G. Mermelstein, *Progesterone inhibition of neuronal calcium signaling underlies aspects of progesterone-mediated neuroprotection*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012. **131**(1–2): p. 30–6.
108. Pfaff, D.W., *Patterns of steroid hormone effects on electrical and molecular events in hypothalamic neurons*. *Mol Neurobiol*, 1989. **3**(3): p. 135–54.
109. Joels, M., et al., *Steroids and electrical activity in the brain*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994. **49**(4–6): p. 391–8.
110. McEwen, B.S., et al., *Steroid hormones as mediators of neural plasticity*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1991. **39**(2): p. 223–32.
111. Jarrard, L.E., *Use of excitotoxins to lesion the hippocampus: update*. *Hippocampus*, 2002. **12**(3): p. 405–14.