



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**“CAMBIOS EN EL CONTENIDO Y DISTRIBUCIÓN DE LA
HORMONA DE CRECIMIENTO EN EL SNC POR LACTANCIA
Y POR DAÑO EXCITOTÓXICO.”**

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

BIÓL. ELIZABETH CANDY RAMÍREZ MARTÍNEZ

Directoras de Tesis
Dra. Maricela Luna Muñoz
Dra. María Teresa Morales Guzmán

Comité tutor:
Dra. Luz M. Torner Aguilar
Dr. Lenin D. Ochoa de la Paz

Campus Juriquilla, Querétaro 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por: Elizabeth Candy Ramírez Martínez cuyo título es: “Cambios en el contenido y distribución de la hormona de crecimiento en el SNC por lactancia y por daño excitotóxico.” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario (Tutor)

Dra. Maricela Luna Muñoz

Vocal

Dra. María de la Luz Navarro Angulo

Suplente

Dra. Luz Torner Aguilar

Suplente

Dra. Carmen Clapp Jiménez

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Teresa Morales G.
Coordinador del Programa

RESUMEN

Una estrategia endógena de neuroprotección del sistema nervioso central (SNC) es la producción de factores neurotróficos en respuesta a un daño o lesión. Además de sus efectos endocrinos y sobre el desarrollo, la hormona de crecimiento (GH) se considera un factor neurotrófico ya que puede inhibir la muerte neuronal durante daño neuronal producido por hipoxia/isquemia, teniendo un efecto neuroprotector en diferentes regiones del SNC. Por otra parte, la lactancia *per se* tiene efectos neuroprotectores disminuyendo la susceptibilidad a la degeneración celular en gran parte del hipocampo de la madre en respuesta a daño excitotóxico por ácido kaínico (KA). Sin embargo, se desconoce si las concentraciones de GH pueden ser modificadas en el hipocampo e hipotálamo de la rata madre lactante y así jugar un papel neuroprotector participando en prevenir la muerte o degeneración neuronal durante la lactancia.

Ratas Wistar nulíparas y lactantes (19-21 días postparto) recibieron una sola dosis de 7.5 mg/Kg pc de KA o vehículo y fueron sacrificadas 24h después de esta inyección. La concentración de GH determinada por ELISA, fue similar en el hipotálamo, la hipófisis y el hipocampo de ratas nulíparas y lactantes. Se observó un incremento de los niveles de GH inducido por KA en el plasma y el hipocampo de ratas lactantes en comparación con las nulíparas. Mediante SDS-PAGE/western blot se determinó la presencia de variantes de peso molecular de GH de 7, 14, 26, 32 y 72 kDa en el hipotálamo, mientras que en el hipocampo las isoformas de GH fueron de 7, 14, 22, 26, 46, 57, 62 y 88 kDa tanto en ratas nulíparas como lactantes con y sin daño excitotóxico. En el hipotálamo se detectó inmunoreactividad de GH principalmente en las regiones del núcleo arcuato y periventricular sin observarse diferencias significativas entre grupos; por otra parte, la GH inmunoreactiva en el hipocampo se observó en mayor proporción en el área CA1, aunque en giro dentado (GD) y CA4 se vieron modificados la inmunoreactividad de GH (aumento y decremento respectivamente) en condiciones basales, mientras que al inducir daño excitotóxico no existen diferencias entre ratas nulíparas y lactantes. Mediante los métodos de NISSL, Fluor Jade-C y TUNEL que son indicadores de daño neuronal morfológico, necrótico y apoptótico respectivamente, se encontró que morfológicamente no hay diferencia en las distintas condiciones en hipocampo e

hipotálamo, sin embargo al observar el daño celular por los otros dos métodos (Fluor Jade-C y TUNEL) se corroboró que en la lactancia se disminuye el daño celular inducido por el tratamiento con KA en comparación con las ratas nulíparas en hipocampo, además de que nosotros también lo observamos en hipotálamo al contar menos marca fluorescente positiva a daño neuronal y apoptosis en ratas lactantes.

SUMMARY

An endogenous neuroprotector strategy of the central nervous system (CNS) is the neurotrophic factors production in response of damage or lesion. Besides its endocrine and developmental effects, growth hormone (GH) is considered as a neurotrophic factor due its capability to inhibit cell death during neuronal damage produced by hypoxia/ischemia, having a neuroprotector effect in different regions of the CNS. In the other hand, lactancy *per se* has neuroprotective effects decreasing cell degeneration susceptibility in most of the mother's hippocampus in response to the excitotoxic damage with kainic acid (KA). Nevertheless, it is unknown whether the GH concentration is being modified in the hippocampus and/or hypothalamus of the lactating mother rat, and therefore having a role in preventing neuronal cell death or degeneration during lactation.

Nulliparous and lactating (19-21 post-birth days) Wistar rats, were given a single dose of 7.5 mg/Kg from its total corporal weight of KA or vehicle and sacrificed 24h after injection. GH concentrations, determined through an ELISA, were similar in the hypothalamus, hypophysis and hippocampus from nulliparous and lactating rats. KA induced the increase of GH levels in the plasma and in the hippocampus of lactating rats in comparison with nulliparous rats.

GH isoforms determined by SDS-PAGE/Western blot, corresponded to proteins with apparent molecular weights of 7, 14, 26, 32 and 72 kDa in the hypothalamus and of 7, 14, 22, 26, 46, 57, 62 and 88 kDa in the hippocampus. No differences were found between the nulliparous and lactating rats treated or not with KA.

Hypothalamic GH immunoreactivity was mainly detected in the arcuate and periventricular nuclei. Also, GH immunoreactivity was found in the CA1 region of the hippocampus and in the dentate gyrus (DG) and CA4 of hippocampus. No differences in GH distribution and reactivity were observed among the various experimental groups.

NISSL, Fluor Jade-C and TUNEL methods, which are morphological markers of neuronal damage, apoptotic and necrotic damage respectively, respectively showed no difference between the analyzed conditions in the hypothalamus and hippocampus,

Notably, flurojade-C and TUNEL confirmed that the cellular damage-induced by KA in the hippocampus is less prominent during lactation; and showed for the first time a KA-induced damage in the hypothalamus that is also less in the lactating animals.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi comité tutorial que durante la maestría se preocuparon por mi formación académica y profesional aportando ideas en cada uno de mis tutorales y mis escritos:

Dra. Maricela Luna Muñoz

Dra. Teresa Morales Guzmán

Dr. Lenin Ochoa de la Paz

Dra. Luz Torner Aguilar

También a cada uno de mi jurado de examen que corrigió mi tesis mejorando la forma, estilo e ideas que contiene esta tesis.

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora

Dra. Maricela Luna Muñoz

Dra. María de la Luz Navarro Angulo

Dra. Luz Torner Aguilar

Reconozco el apoyo técnico a M.C. Martha Carranza y Biól. M. Eugenia Ramos A. que como base importante del laboratorio me enseñaron técnicas que hicieron posible la realización de la tesis además de ayudarme a la estandarización de técnicas para el caso particular de mis muestras, así mismo a estudiantes del laboratorio que con su experiencia hicieron parte de los resultados de la tesis al involucrarse con el proyecto aquí realizado como la cuantificación computacional de los tejidos para Inmunohistoquímica, TUNEL y Fluorojade-C al M.C. José Luis Luna Acosta., por la ayuda en la elaboración y estandarización de muestras para Inmunohistoquímica y western blot al Biól. Michael F. Girgis (programa MIRTH). Por la revisión y aportación de ideas en mi tesis al M.C. Carlos Martínez Moreno y por el apoyo técnico de Gerardo Courtois Torres.

Este trabajo fue realizado con financiamiento de los proyectos de *PAPITT 210209 y 204709* y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (*CONACYT*) *60296 y 51044* que además me otorgó el apoyo como becario en el periodo 2009-2010 (*Becario/CVU: 225281/220983*)

También agradezco la ayuda y atención de la unidad de posgrado en especial la atención de la M.C Leonor Casanova Rico, Sra. Yolanda Orduña Cruz; en la biblioteca a Román Pacheco Barrita y al personal del bioterio a cargo del MVZ Martín García Servín.

Además agradezco a la Dra. Rosa Uribe que me dio las bases para trabajar en el laboratorio y que siempre estuvo conmigo dando ideas y consejos que me ayudaron a terminar mi proyecto y la maestría.

Por último a las personas que más me han apoyado en mis escritos, tutorales y exámenes, fueron todas unas maestras para mí:

M.C. Irma Angélica González Luna

M.C. Ximena Castillo Tovar

M.C. Angélica Hernández Valdés

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

Le doy las gracias a mi familia sobre todo a mis papás: José y Heri que han tenido paciencia en mis sueños y metas, que me apoyan en cual locura se me ocurre y que aún así se sienten orgullosos de mí.

A mis hermanos Pedro y Denisse que tratan de hacerme entrar en razón y aun así sé que me quieren.

A la toda la familia Ramírez/Martínez que siempre creen en mi y en mi capacidad.

A Germán que ha sido fundamental en todo este proceso de acondicionamiento y culminación en la maestría, gracias por cuidarme y estar conmigo.

A mi familia en Querétaro: Irma, Ximena, Angélica y Germán, que al ser roomies - aunque sea virtuales- lograron ser parte de mi familia y de mi vida, ya que con ustedes reí, llore, reí y reí; sin ustedes de verdad no lo hubiera logrado, creo que de ustedes son de los que aprendí más en esta maestría .

A mis amigos lejanos: Karly, Ivan, Sandra y Claudia que aunque lejos sé que están ahí para cuando los necesito.

Al lab: José Luis, Carlos, Clarita, Maricelita, Pepe, Cinthya y Nela que siempre estuvieron para ayudarme en cualquier cosa que necesitara.

A mis compañeros de la maestría que me hicieron reír: Ximena, Irma, Angélica, Caro, David, Adán, Lenin, Pepe, etc.

A las jefas: A la Dra. Maricela Luna y a la Dra. Teresa Morales por darme un lugar en su laboratorio y otorgarme la oportunidad de estar en un proyecto de colaboración con ustedes.

*“En el fondo, los científicos somos gente con suerte:
podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida”
Lee Smolin*

*“...y tu mente como una colmena en secreta actividad...”
E. Bunbury*

ÍNDICE

Resumen en español.....	i
Resumen en inglés (Summary).....	ii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
3. Justificación	18
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	19
6. Animales y métodos	20
7. Resultados.....	27
8. Discusión.....	54
9. Conclusiones	62
10. Referencias	63
11. Lista de figuras.....	77

12.Anexo.....	79
---------------	----

1. INTRODUCCIÓN

La plasticidad cerebral puede definirse como una propiedad intrínseca del sistema nervioso central (SNC) que implica una serie de cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren en el cerebro en respuesta a modificaciones en la señal aferente o en la respuesta motora (eferente). Dicha plasticidad puede ser vista por cambios entre relaciones funcionales en diferentes tipos celulares neuronales como astrocitos y oligodendrocitos. El establecimiento de nuevas conexiones por crecimiento dendrítico y arborización puede seguir a cambios rápidos y dinámicos, y constituir así un mecanismo de desarrollo, crecimiento y aprendizaje (Pascual-Leone et al., 2005).

Una estrategia endógena de neuroprotección del sistema nervioso central (SNC) es la producción de factores neurotróficos en respuesta a un daño o lesión. La hormona de crecimiento (GH) por su parte afecta funciones celulares en el SNC, ya que está involucrada en la regulación del crecimiento neuronal, desarrollo y mielinización (Sheepens et al., 1999; Sheepens et al., 2000). Además se ha demostrado que el tratamiento con esta hormona después de diversos tipos de daño en el SNC como hipoxia, isquemia, o excitotoxicidad con glutamato monosódico (*in vitro* ó *in vivo*) incrementa la proliferación de nuevas neuronas, oligodendrocitos y vasos capilares en el giro dentado del hipocampo, mientras que en otras regiones del SNC como la corteza cerebral contribuye a la oligodendrogénesis, disminuye el contenido de factores apoptóticos como Bax y Bad y aumenta factores de sobrevivencia neuronal como Bcl2 y Akt fosforilada (Sheepens et al., 2001; Frago et al., 2002; Shin et al., 2004; Delgado-Rubín et al., 2006). Muchos de estos resultados han sido atribuidos en parte a la GH circulante, mientras otros parecen ser generados por la GH sintetizada localmente en el cerebro al tener una acción local, ya que se ha demostrado que después del daño neuronal inducido por hipoxia se incrementa el contenido del receptor de GH y su proteína de unión (GHR/BP) en varias regiones del SNC con respecto a ratas que no fueron sometidos al daño neuronal (Sheepens et al., 1999; Aberg et al., 2006; Isgaard et al., 2007)

Durante la reproducción el hipocampo e hipotálamo de la rata hembra sufre varias adaptaciones morfológicas y funcionales (Kinsley y Lambert, 2008; Pawluski et al.,

2009). En este sentido, la lactancia representa una fase en la cual las señales internas generan una reorganización del sistema que es mantenido por la información aferente y resulta en respuestas adaptativas eferentes, que puede ser demostrable a niveles de análisis anatómicos, fisiológicos y conductuales. Recientemente se ha documentado que la lactancia protege a las neuronas del hipocampo dorsal (CA1, CA3, y el hilus del giro dentado) contra daño excitotóxico causado por la administración sistémica de ácido kaínico (KA, análogo cíclico del glutamato) en comparación con ratas vírgenes en la fase de diestro del ciclo estral (Vanoye-Carlo et al., 2008). También, se ha determinado que esta protección del hipocampo contra la excitotoxicidad dada por la lactancia se mantiene aún a tiempos prolongados de exposición al KA (72 h) y que ésta se mantiene aún con la inyección intracerebroventricular (icv) de este análogo glutamatérgico (Vanoye-Carlo et al., 2008; Cabrera et al., 2009).

Wehrenberg et al. (1989) demostraron que durante la lactancia (8-9 días postparto) existe un incremento en el contenido de GH en suero en las madres lactantes con respecto a las ratas nulíparas y que es dependiente del estímulo de la succión. Por otra parte existen evidencias de que la GH, la prolactina (PRL) y el IGF-I están relacionados con procesos metabólicos en las células epiteliales mamarias durante la lactancia en los murinos (Hadsell et al., 2005; Hadsell et al., 2008). Además de que la GH y el IGF-I estimulan la producción de leche en la lactancia del ratón y otras especies de mamíferos. Sin embargo, se sabe poco sobre acciones de la GH sobre SNC durante la lactancia.

Dado que se producen factores neurotróficos como una estrategia endógena de neuroprotección en respuesta a un daño neuronal, pudiera ser que la expresión de GH en el hipocampo e hipotálamo de la rata lactante se modifique y que esta hormona participe localmente en la menor muerte o degeneración neuronal que caracteriza a esta etapa reproductiva.

Así planteamos la hipótesis de que la mayor neuroprotección característica de la lactancia se asocia con cambios en los niveles neuronales y/o circulantes de la GH. En este estudio determinamos si el contenido de GH cambia en hipocampo, hipotálamo y la circulación durante la lactancia y después del daño excitotóxico producido por KA.

2. ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH).

La hipófisis es una glándula endócrina conformada por dos secciones: (i) la *adenohipófisis* y (ii) la *neurohipófisis*. En la adenohipófisis se sintetizan y secretan la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la tirotropina (TSH), la adenocorticotropina (ACTH), la hormona estimulante de melanocitos (MSH), la hormona luteinizante (LH) y la foliculoestimulante (FSH); mientras que en la neurohipófisis se secretan la vasopresina (ADH) y la oxitocina (OT). La síntesis y liberación de las distintas hormonas está dada por poblaciones celulares específicas (Schneider et al., 2003); además en la mayoría de los mamíferos la MSH se sintetiza en una región denominada hipófisis intermedia.

La GH es una hormona proteica hipofisaria y su función principal es promover el crecimiento y desarrollo del tejido blando y hueso, además de regular el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Su forma más común, corresponde a una proteína de 191 aminoácidos que se sintetiza en los somatotropos de la hipófisis y es liberada a la circulación para alcanzar diferentes órganos blanco. Su secreción es controlada por péptidos hipotalámicos como la hormona liberadora de GH (GHRH por sus siglas en inglés), factores como la ghrelina la cual tiene un efecto estimulatorio y por la somatostatina (SS), que tiene un efecto inhibitorio y que además funciona como mecanismo de retroalimentación negativa. Por otra parte, en mamíferos se ha descrito que también los glucocorticoides, hormonas tiroideas y esteroides sexuales inducen la liberación de la GH (Nyberg et al., 2000; Scheneider et al., 2003).

La GH también se sintetiza en sitios extrahipofisiarios como el sistema inmune, reproductor, digestivo y nervioso (Yoshizato et al., 1998; Harvey et al., 2001). En el sistema nervioso central (SNC) la GH funciona promoviendo el desarrollo de las motoneuronas de la médula espinal, en la mielinización y en el desarrollo de oligodendrocitos, por lo que se ha sugerido que la producción local de GH podría estar regulada por mecanismos independientes a los adenohipofisarios respondiendo a las necesidades del tejido (Weigent et al., 1991). Esta hipótesis ha sido apoyada a través

de mostrar que la hipofisectomía, no modifica la presencia y concentración de la GH en diferentes regiones cerebrales y órganos periféricos (Ramesh et al., 2001)

La GH exhibe una heterogeneidad en el cuerpo derivada de procesamiento postranscripcional y postraduccion. Muchas hormonas consideradas en este proceso producen varias isoformas y fragmentos pueden ser encontrados bioquímicamente en formas de precursores (pre-pro-hormonas), activas (hormonas) y catabólicas (fragmentos de hormonas). Algunas moléculas de GH o fragmentos son generados y secretados directamente de la glándula hipófisis mientras otras moléculas o fragmentos son sometidos a modificaciones post-sintéticas (De Palo et al., 2006). La GH es una hormona multifactorial responsable de acciones complejas afectando el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas. La multifuncionalidad de la GH puede ser relacionada a varias isoformas, pero numerosas investigaciones han demostrado que la forma de 22kDa es la responsable de varios efectos biológicos, sin embargo no es la única con forma activa (De Palo et al 2006).

2.2 RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO Y VÍAS DE TRANSDUCCIÓN.

El receptor de la hormona de crecimiento (GHR) pertenece a la superfamilia de receptores a la eritropoyetina/ PRL, interferon e interleucinas, entre otros. Este receptor; se caracteriza por tener un dominio extracelular, un dominio membranal y uno intracelular (Carter-Su et al., 1989). Los GHRs muestran una alta heterogeneidad molecular (como glicosilación o ubiquitinación) que contribuye a la alta diversidad funcional de la GH (Nyberg, 2006).

La GH se une secuencialmente a dos moléculas de su receptor causando la dimerización del mismo y cambios estructurales importantes (Goffin et al., 1997). Estos cambios generan la unión del GHR a tirosina cinasa de la familia de Janus (JAK2) que promueve la fosforilación de los dos GHR, esto lo que produce la asociación y activación de una cascada de proteínas que incluyen a las proteínas SHC, Grb2, posiblemente Sos, Ras, Raf y las proteínas cinasas asociadas a microtúbulos, las proteínas activadoras de la mitosis o reguladas por una señal extracelular (cinasas MAP/ERK) (Scanes et al., 1994). La GH también induce la expresión de genes que

codifican para factores de transcripción involucrados en la proliferación celular como por ejemplo C-myc (Jeay et al., 2002) o bien induce la fosforilación de factores que promueven la proliferación celular como AKT-p (Frago et al., 2002).

La regulación de eventos metabólicos por la GH se refleja mediante la expresión de genes específicos para cada tipo celular. En los adipocitos la GH participa en la expresión de enzimas lipogénicas y lipoproteínas, e interfiere en la expresión de transportadores de glucosa como GLUT1. El hígado es el sitio principal de la síntesis de IGF-1, el principal mediador de los efectos de la GH (Carter-Su et al., 1996).

Se sugiere que a través de una vía directa y dependiendo del tipo celular en la que participa la vía de JAK2, la GH activa proteínas de la familia Stat que son transductores y activadores de la transcripción; promoviendo la unión de estas proteínas formando homo y heterodímeros que se translocan al núcleo y se unen con el DNA activando la transcripción de sus genes blanco (Carter-Su et al., 1996).

En una tercera vía de transducción la GH, a través de un efecto tipo insulina, aumenta el transporte intracelular de glucosa mediante el reclutamiento de GLUT1 y 4 en la membrana. En esta vía, la GH y la insulina comparten moléculas señal como las llamadas “sustrato principal del receptor de insulina” (IRS por sus siglas en inglés) que en respuesta a GH se fosforilan IRS-1 e IRS-2 a través de JAK2; en consecuencia se activa la cascada de fosfatidil inositol aumentando el transporte de glucosa, la síntesis de DNA y la actividad de p70, una enzima implicada en el ciclo celular. También se conoce que esta cinasa interviene en la síntesis de lípidos dependientes de GH y en la lipólisis inducida por noradrenalina (Carter–Su et al., 1996).

En la señalización de respuesta a GH, se ha reconocido una cuarta vía en la que se activa una proteína cinasa C (PKC) que también se requiere en efectos lipogénicos, expresión de genes de expresión temprana como c-fos, unión de proteínas nucleares a oligonucleótidos, incremento de Ca^{2+} intracelular y la activación de otras cinasas. La activación de PKC ocurre mediante la unión del GHR a una proteína G, en la que se une una fosfolipasa C y en consecuencia se produce diacilglicerol (DAG) (Sjöholm et al 2000).

2.3 HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) Y SU RECEPTOR (GHR) EN EL SNC

Se desconoce aún si en los mecanismos que median acciones del sistema somatotrópico en el SNC participa el IGF-1 o la GHRH. En apoyo a la acción directa de la GH sobre el SNC, estudios de ontogenia postnatal demuestran una generalizada pero discreta expresión del ARNm del GHR y de la proteína (inmunoreactividad) en muchas regiones del cerebro de rata y conejo; las regiones con alta expresión son la corteza cerebral, el tálamo, hipotálamo y cerebelo, células neuronales del tallo cerebral y células de los ganglios retinales (Lobie et al., 1993). Por otra parte, la expresión de la GH ha sido asociada con células gliales, astrocitos y estructuras no neuronales incluyendo células endoteliales, el epéndima de los plexos coroideos, la pared ventricular y la piamadre (Lobie et al., 1993; Sheepens et al., 1999).

En diferentes estudios inmunológicos de murinos y humanos de varias edades, han identificado GH inmunoreactiva en todo el SNC incluyendo el telencéfalo (hemisferios cerebrales), diencefalo (tálamo e hipotálamo), cerebro medio, mesencéfalo (protuberancia y cerebelo) y médula espinal (Kyle et al., 1981; Lechan et al., 1981; Hojvat et al., 1982; Lechan et al., 1983; Harvey et al., 2003). En estudios en roedores y primates se ha observado un contenido significativo de GH inmunoreactiva en amígdala, hipocampo e hipotálamo, y su contenido fue menor del 1% que en la hipófisis anterior (Hojvat et al., 1982) (ver Figura 1).

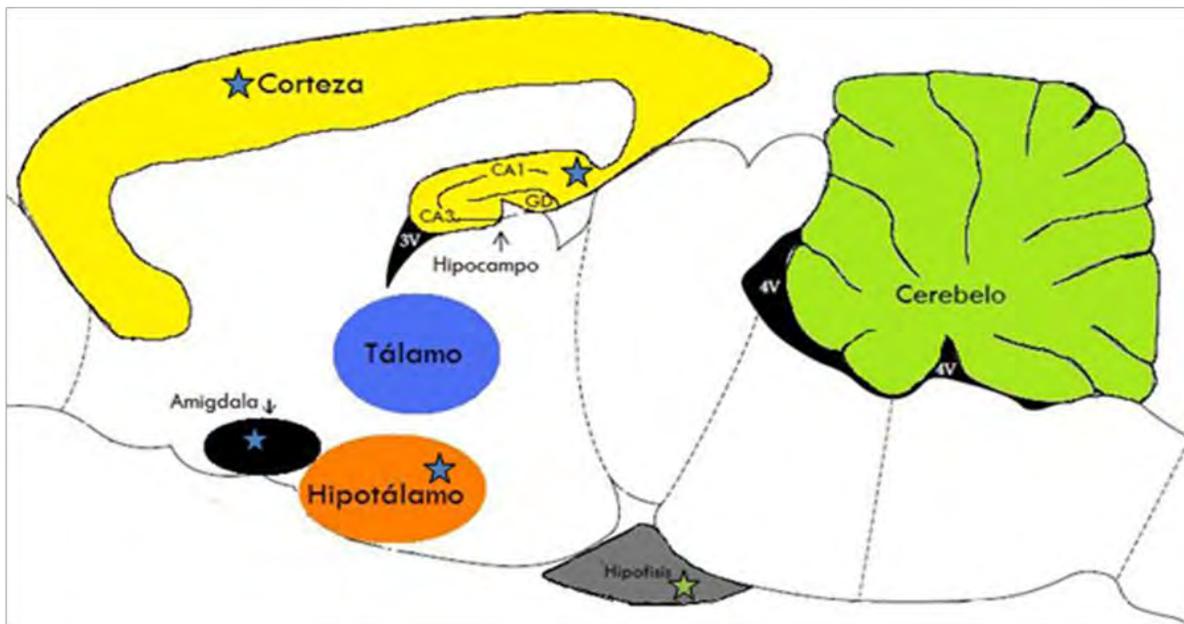


Figura 1. Distribución de GH en el SNC. Corte sagital de rata en el que se señala con colores las regiones donde se presenta la GH; las estrellas representan las regiones donde existe en mayor cantidad

La presencia a largo plazo de GH inmunoreactiva en el cerebro después de la hipofisectomía apoya la síntesis de GH por el cerebro. Además, se ha observado la liberación basal de GH inmunoreactiva de células dispersas del SNC en cultivos celulares. Notablemente, esta liberación de GH en el medio de cultivo puede ser suprimida por la adición de somatostatina (Hojvat et al., 1982). Por otra parte, usando hibridación in situ, la presencia del ARN, de GH ha sido reportada en el caudado, estriado, tálamo ventral, la formación reticular, hipocampo y corteza basal (Aberg et al 2006).

De la misma forma, el receptor de GH (GHR) se ha localizado en varias partes del SNC, su presencia más abundante es en los plexos coroideos y el hipocampo, en coincidencia con la presencia del receptor de IGF-1 (Schneider et al., 2003). La presencia del GHR en el cerebro sugiere sitios blancos para la acción de GH hipofisaria. Estudios recientes de los sitios de acción de la GH y su receptor en el cerebro de aves ha sido descrito por Harvey et al. (2002) donde localizaron sitios de acción de la GH a partir de la expresión de genes responsivos a su receptor el cual es abundantemente expresado en el cerebro de pollos normales, sugiriendo que la GH puede actuar de forma autócrina y parácrina en el sistema nervioso central (Harvey et al., 2002).

2.4 BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO.

En el humano se ha determinado la existencia de dos genes que codifican para la hormona de crecimiento y se sabe que sus productos presentan un 92% de homología (con una diferencia de 13 aa): (i) la *hGH-N* que se codifica en la hipófisis y su variable (ii) *hGH-V* que se expresa en una región placentaria (sinciotrofoblasto) y en el testículo (Frankenne et al., 1987; Liebhaber et al., 1986). La *hGH-N* es sintetizada como una pre-hormona con un total de 225 aa, la cual es modificada postraduccionalmente por glicosilación, fosforilación, acetilación, proteólisis y desaminación (Arámburo et al., 1990; Houston et al., 1988) para producir una proteína madura de 191 aminoácidos de un peso molecular de 22kDa; en su estado activo se sabe que además de unirse a sus propios receptores puede unirse a receptores de PRL (Ray et al., 1990; Scanes et al., 1994; Baumann et al., 1997; Arámburo et al., 2000).

Por otra parte, en la rata se ha determinado la presencia de la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) en los plexos coroideos, el hipocampo, el putamen, el tálamo y el hipotálamo; mientras que el ARNm de la GHRH se encuentra en la corteza basal, el hipocampo, el cuerpo caudado y el putamen. Asimismo, se ha detectado a la proteína activa de GHRH en la amígdala, el hipotálamo, el cerebelo, el estriado, la glándula pineal y el hipocampo (Lechan et al., 1981; Lechan et al., 1983; Noteborn et al., 1993; Mustafa et al., 1995; Render et al., 1995; Ramesh et al., 2000; Harvey et al., 2001) lo que permitiría un posible control de la síntesis de GH en estas regiones.

2.4.1 Regulación de la síntesis de GH por factores de transcripción y mecanismos epigenéticos.

La expresión del gen de GH en la hipófisis es controlada por la coordinación de un gran número de factores de transcripción en el cual Pit-1 es probablemente el factor de transcripción más importante para la expresión hipófisis-específica de la GH (Bodner y Karin, 1987). El promotor proximal al gen de GH en humano y rata contiene dos sitios de unión a Pit-1 (Catanzaro et al., 1987; Nelson et al., 1995); la expresión de Pit-1 aumenta significativamente la actividad del promotor de GH incluso en células donde la actividad del promotor es extremadamente baja. Estudios realizados por Sharp et al. (1995) demostraron que Pit-1 es requerido durante el ensamblaje del complejo en la pre iniciación de la transcripción génica. Del mismo modo al igual que la GH la expresión de Pit-1 se encuentra presente en diferentes tejidos extrahipofisiarios, como por ejemplo en la placenta donde se cree que también regula la expresión de otros miembros de la familia de GH como IGF-1 (Bamberger et al., 1995).

Algunos factores de transcripción cooperan con Pit-1 para mediar la efectiva transcripción de GH en la hipófisis; uno de esos factores es la proteína relacionada con ETS: Sp1. Los sitios para Sp1 en el promotor de GH de rata parcialmente se sobrepone con elementos de respuesta a Pit-1, aunque Sp1 y Pit-1 tienen elementos de unión mutuamente exclusivos, Sp1 ayuda a la lectura de Pit-1 a su sitio de unión (Schaufele et al., 1990). También, un nuevo miembro de la superfamilia de dedos de Zinc: Zn15, coopera con Pit-1 para la transcripción de GH en líneas celulares donde el promotor de GH también responde mínimamente (Lipkin et al., 1993).

Otros factores de transcripción han sido involucrados en la regulación de la expresión de GH, los elementos de respuesta a la proteína de unión al AMPc (CREB) incrementan la expresión de GH (al igual que Pit-1) en respuesta a la activación de vías de señalización del AMPc en somatotropos normales y tumorales (Gaiddon et al., 1996); por otra parte la proteína activadora AP2 también se une a dos regiones del promotor de GH en humano, sin embargo el mecanismo por el cual AP2 media la transcripción de GH aún no se conoce. De forma similar, el factor estimulador río abajo USF (upstream stimulatory factor) es capaz de unirse al promotor de GH en humanos en la posición -276 a -257, sin embargo aún no se sabe el papel en la inducción de la transcripción de GH que podría tener este factor (Lemaigre et al., 1989). Por otra parte, se sabe que un elemento regulador negativo (silenciador 1) que está en la posición -325 a -280 del promotor de GH de rata reprime la transcripción de GH por la unión de una proteína de 45 kDa identificada en extractos aislados de células que no expresan GH (Roy et al., 1990).

La transcripción de GH también es regulada por mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA. Este mecanismo se asocia generalmente con la inactivación génica ya que la expresión génica del gen de GH metilado en adenomas de humano es baja en comparación con la hipófisis de humanos normales (Huttner et al., 1994) lo que sugiere que la presencia del grupo metilo unido a una citocina desplaza los factores de transcripción que se unen a ésta disminuyendo su síntesis (Kim et al., 2003). Durante el embarazo y la lactancia se ha observado un patrón alterado de metilación de residuos específicos de citosina que codifican para la región del gen de GH en hipófisis de rata (Kumar y Biswas, 1988). Otros estudios indican que la metilación del sitio *Tha I* localizado a 144 bp río arriba del sitio de iniciación de la transcripción de GH de rata es esencial para la producción de la proteína de GH, sin embargo en tejidos extrahipofisarios se ha visto que este sitio no está metilado (Strobl et al., 1986).

La regulación de la expresión y liberación de la GH es un proceso multifactorial y dinámico que difiere entre las distintas especies, los diferentes tejidos y se modifica de acuerdo al estado fisiológico del organismo.

Como se mencionó anteriormente, los glucocorticoides intervienen en el control de la transcripción del gen de la GH con un efecto estimulatorio dependiente de las hormonas

tiroideas (HT). Por otra parte, las HT tienen un efecto estimulador sobre la expresión del gen del receptor de GHRH incrementando su ARNm, además de disminuir la expresión del ARNm del receptor de somatostatina (SS); mientras que la exposición prolongada a glucocorticoides tiene un efecto inverso en la expresión de los receptores de GHRH y SS (Devesa et al., 1992).

2.5 GH Y NEUROPROTECCIÓN

La sobrevivencia de ciertos tipos de neuronas puede ser promovida por la activación de vías de señalización que incluyen a la proteína acarreadora de las guanosin trifosfato, Ras y una serie de proteínas cinasas que activan a las MAPK (de las siglas en inglés *Mitogen-activated protein kinases*) (Borasio et al., 1989), además de una vía que incluye a la cinasa lipídica PI3K/Akt, que es fundamental para la sobrevivencia celular y los factores de crecimiento que por su parte ejercen su efecto de protección a través de la activación de esta vía. Estudios realizados mediante la administración intravenosa de GH en ratas mostraron un aumento en la fosforilación de Akt en diferentes regiones del SNC como hipotálamo, hipocampo y cerebelo, este mismo efecto se observó mediante la estimulación de la síntesis de GH en los somatotropos en cultivo (GHRH-6), sugiriendo que por este mecanismo la GH está involucrada en los mecanismos intracelulares de sobrevivencia celular (Frago et al., 2002). Así mismo, se observó en diferentes regiones del SNC (hipocampo y cerebelo) un aumento en la fosforilación y activación de Bad (factor antiapoptótico) lo que pudiera indicar otro mecanismo para prevenir la muerte celular (Frago et al., 2002; Delgado-Rubín et al., 2006).

Otra familia de proteínas que participan en los procesos de la muerte celular es la familia Bcl, se ha identificado que un aumento en la expresión de Bcl2 puede ser un evento crítico por medio del cual los factores de crecimiento promueven la sobrevivencia celular (Tamatani et al., 1998; Baker et al., 1999). Bcl2 se expresa en las neuronas de muchas regiones cerebrales participando en la prevención de la muerte neuronal natural e inducida; promueve también el crecimiento y la regeneración de los axones sugiriendo también su posible participación en la reparación cerebral y la plasticidad neuronal. La administración a la periferia de GH (intraperitoneal) y un análogo sintético de GHRH GHRH-6, aumenta los niveles de Bcl2 en hipotálamo,

hipocampo y el cerebelo lo que sugiere que la GH podría estar teniendo un efecto neuroprotector (Frago et al., 2002).

El papel neurotrófico de la GH se ha señalado en diferentes estudios en los que se observa una correlación entre diferentes retrasos en el desarrollo cerebral y ocurre en estados de deficiencia de la GH (Noguchi et al., 1982); además estos efectos son revertidos por tratamientos con GH inyectada periféricamente (Noguchi et al., 1982). También, se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (cultivos cerebrales) que la administración de GH puede inhibir la muerte neuronal durante la isquemia, hipoxia y excitotoxicidad (Stevens y Alexander, 1986; Gustafson et al., 1999) disminuyendo el número de células positivas para necrosis y apoptosis (Delgado-Rubín et al., 2006).

Se sabe que muchas acciones de la GH son mediadas a través de la estimulación de la síntesis de IGF-1, incluyendo la promoción de la sobrevivencia y la proliferación celular de muchos tejidos; Frago et al. (2002) reportaron un aumento en la expresión del ARNm de IGF-1 en extractos de hipocampo, hipotálamo y cerebelo de ratas en las que se administró GH intravenosa o un secretagogo de GH.

2.6 NEUROPROTECCION.

La neuroprotección comprende un conjunto de mecanismos fisiológicos y bioquímicos que funcionan en las neuronas y que traen como consecuencia un aumento de su sobrevivencia. Los agentes neuroprotectores incluyen una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos que modulan algunos de los mecanismos involucrados en la muerte y sobrevivencia neuronal. A lo largo de los últimos 20 años se ha publicado gran cantidad de trabajos científicos que exploran potenciales agentes neuroprotectores y sus posibles mecanismos de acción (Fizman, 2003).

2.6.1 LA LACTANCIA COMO MODELO DE NEUROPROTECCIÓN

El trabajo pionero en el campo de la plasticidad del cerebro materno se ha centrado en cambios que ocurren en el sistema neuroendocrino hipotalámico asociado con la fisiología de la lactancia y con la respuesta neuroendocrina al estrés. Sin embargo, se le ha dado menor atención a áreas en el sistema límbico con excepción de aspectos relativos a la conducta materna incluyendo las alteraciones morfológicas inducidas por

la maternidad como la remodelación de la estructura celular en núcleos del hipotálamo y otras áreas cerebrales.

2.6.1.1 Lactancia en la rata. Durante el embarazo y la lactancia surgen cambios fisiológicos importantes en los niveles circulantes de hormonas esteroides como el estradiol, progesterona y corticosterona, así como péptidos como la oxitocina y la prolactina (Neville et al., 2002). Además, la madre está sujeta a múltiples estímulos somatosensoriales que inducen cambios en el cerebro de la madre. Esto ha sido comprobado por varios estudios en los que se han reportado alteraciones en la morfología de los astrocitos y las conexiones neurales en núcleos hipotalámicos (en la región magnocelular del núcleo paraventricular y el núcleo supraóptico) (Modney y Hatton, 1994; Theodosis y Poulain, 2001; Hatton y Yang, 2002), que facilitan la activación de neuronas oxitocinérgicas para la evacuación de leche. También se han observado cambios estructurales en el área preóptica medial (Keyser-Marcus et al., 2001), el incremento de la densidad de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo (Kinsley et al., 2006; Pawluski y Galea, 2006) y una reorganización morfológica en varias áreas hipocampales que se han propuesto que mejoran el aprendizaje espacial y la memoria de la madre (Tomizawa et al., 2003; Pawluski y Galea, 2006). Por todas esas evidencias se ha planteado que el cerebro de ratas lactantes es un modelo de plasticidad morfológica, neuroquímica y funcional del SNC.

2.6.1.2 Excitotoxicidad. Como mencioné anteriormente el principal ligando excitador neuronal en el SNC es el glutamato y se encuentra presente en las terminales sinápticas de neuronas en concentraciones milimolares. La acumulación de glutamato en el espacio sináptico puede ser neurotóxica produciendo daño neuronal por el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la alteración de la organización del citoesqueleto, la disfunción mitocondrial y la activación de señales que conducen a la muerte celular por necrosis o apoptosis. Las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica se han relacionado con el daño neuronal observado después de episodios de isquemia, hipoxia e hipoglucemia, así como en la etiología de una serie de condiciones neuropatológicas en las que se encuentra la epilepsia, la

enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Hynd et al., 2004; Petrovic et al., 2005).

El glutamato es un aminoácido no esencial que tiene la capacidad de pasar la barrera hematoencefálica debido a su polaridad; este aminoácido es sintetizado en el SNC a través de diversas reacciones metabólicas y su síntesis y transducción de señales dependen de la activación de los dos canales catiónicos activados por ligando denominados ionotrópico (AMPA, Kainato y NMDA) y de uno metabotrópico asociados a proteínas G (receptor metabotrópico de glutamato) y de las interacciones entre terminales nerviosas y las células gliales (astrocitos).

La liberación del glutamato es dependiente de Ca^{2+} y su inactivación depende principalmente de la captura por co-transportadores con Na^+ , de tal forma que el glutamato liberado se transporta hacia el astrocito donde se transforma a glutamina que puede difundir a través de la membrana y de esta forma pasar a la neurona postsináptica para después ser transformada a glutamato por la enzima glutaminasa. Se sabe que si neurotransmisores excitatorios como el glutamato o algún agonista están en exceso en el espacio intersináptico la neurona es sobreexcitada o sobre-activada y desencadena mecanismos de muerte celular; a esto se le ha denominado excitotoxicidad y que además se sabe esta mediada por los receptores ácido-amino-3-hidroxi-5-metilsozazolepropionico (AMPA) y kainato (Wang et al., 2005); que inducen la prolongada activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) los cuales son altamente permeables a Ca^{2+} y Na^+ permitiendo la entrada masiva de estos iones; estos iones además de tener una cinética lenta y una amplia permeabilidad tienen inhibición dependiente del voltaje por un ion de Mg^{2+} , co-activación por glicina, activación de poliaminas, inhibición por Zn^{2+} y una gran conductancia de los canales. Todo esto contribuye en gran medida a la despolarización membranal y por ende al incremento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} al interior de la neurona desencadenando la síntesis de proteasas y fosfolipasas dependientes de Ca^{2+} y en consecuencia la producción de radicales libres tóxicos para la célula que a su vez inducen disfunción mitocondrial y posterior muerte neuronal (Wang et al., 2005).

Por otra parte, las neuronas de la neocorteza, el hipocampo, la amígdala y el cerebelo, expresan principalmente receptores AMPA impermeables calcio que presentan la

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

En condiciones fisiológicas, los principales estratos neuronales del hipocampo expresan receptores AMPA impermeables a calcio. Ha sido reportado que los insultos isquémicos inducen la regulación negativa de la expresión de GluR2 y un cambio en la composición de los receptores AMPA, así como un aumento en la permeabilidad al Zn^{2+} y Ca^{2+} y de la sensibilidad a poliaminas (Gorter et al., 1997; Peng et al., 2006). Por otra parte, ha sido reportado que durante las crisis convulsivas se da una regulación negativa de la expresión de la subunidad GluR2 en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo previa a la muerte neuronal (Pellegrini-Giampietro et al., 1997).

Del mismo modo, el ácido kaínico es una neurotoxina inductora de procesos convulsivos y que induce pérdida neuronal. El KA puede unirse a los receptores AMPA, kainato y NMDA despolarizando neuronas en forma pre- y postsináptica causando daños electrofisiológicos conductuales (Vincent y Mulle, 2009). Al igual que el glutamato la administración sistémica de KA en roedores incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno y genera disfunción mitocondrial induciendo muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis en diferentes áreas del cerebro, particularmente en el hipocampo en sus regiones CA1 y CA3 y en el hilus del giro dentado (GD). Por otra parte, los receptores de kainato están conformados por unidades que presentan gran homología con las subunidades de los receptores tipo NMDA y AMPA, éstas pueden ser divididas en subunidades de alta (KA1 y KA2) y baja afinidad (GluR5-GluR7) por ácido kaínico. Actualmente se sabe que en ausencia de receptores AMPA funcionales, el kainato induce una corriente de desactivación lenta y desensibilización rápida en neuronas hipocampales, presumiblemente mediada a través de la activación de receptores de kainato (Braga et al., 2003; Jaskolski et al., 2005). Los receptores a

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

Los receptores AMPA y kainato se encuentran en las dendritas de las neuronas piramidales del hipocampo (CA1, CA3 y GD) con una distribución heterogénea (Dinkel et al., 2003; Ben-Ari y Crossart, 2000; Tomita, 2007). Se sabe que la administración sistémica o intracerebroventricular (icv) de KA a ratas causa la muerte de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 hipocampales de la rata. Se cree que la distribución de los receptores AMPA/kainato y NMDA en el cerebro y su sensibilidad a la permeabilidad de Ca^{2+} son factores importantes en la susceptibilidad selectiva de estas neuronas a la neurodegeneración (Wang et al., 2005).

2.6.1.3 Neuroprotección del hipocampo de la rata lactante contra daño excitotóxico inducido por ácido kaínico.

El efecto de la administración de KA en el SNC ha sido ampliamente estudiado, especialmente en regiones hipocampales, en modelos *in vivo* e *in vitro*, donde se ha visto que las regiones de CA1, CA3 y el giro dentado son sensibles a la excitotoxicidad de KA (Choi, 1992; Ben-Ari y Cossart, 2000; Frerking y Nicoll, 2000; Palomero-Gallagher et al., 2003).

Las hormonas esteroides generan un amplio espectro de respuestas celulares en el SNC ya sea por mecanismos genómicos a través de su interacción con receptores nucleares o por mecanismos no genómicos a través de la interacción directa sobre la transducción (Mellon y Griffin, 2002; Stoffel-Wagner, 2003; Hoffman et al., 2006). La corticosterona está involucrada en la muerte celular de neuronas hipocampales, ya que los glucocorticoides aumentan la muerte neuronal por glutamato (Goodman et al., 1996; Roy y Sapolsky, 2003), y en condiciones crónicas de administración de corticosterona

aumentan la neurotoxicidad inducida por KA en el área CA3 del hipocampo (Dinkel et al., 2003). Durante la lactancia se pierde el ritmo circadiano de secreción de corticoides y hay un tono elevado de secreción de esta hormona por lo que la lactancia se considera un estado de hipercortisolemia. Esta condición aparentemente haría al cerebro materno más vulnerable a daño por excitotoxicidad, sin embargo esto no sucede (Neville et al., 2002; Vanoye-Carlo et al., 2008).

Por otro lado, se ha mostrado que el embarazo disminuye la frecuencia de convulsiones recurrentes espontáneas en ratas con lesiones del hipocampo inducidas por KA, y que reduce la afinidad del agonista por receptores tipo glutamato y kainato (Berzaghi et al., 1987; Standley, 1999). Durante la lactancia en la rata se atenúa la activación de la actividad neuronal inducida por N-metil-D-aspartato en la corteza cerebral y el hipocampo; esto parece ser específico para el receptor a glutamato, ya que la expresión del ARNm de c-Fos inducida por la inyección de KA no se altera en la rata lactante (Abbud et al., 1994); sin embargo, a pesar de que c-Fos es inducido por KA en el cerebro materno, el daño por excitotoxicidad se reduce (Vanoye-Carlo et al., 2008).

Recientemente se ha documentado que la lactancia protege a las neuronas del hipocampo dorsal (CA1, CA3, y el hilus del giro dentado) contra daño excitotóxico causado por la administración sistémica de KA en comparación con ratas vírgenes en la fase de diestro del ciclo estral (Vanoye-Carlo et al., 2008). Las principales estructuras del hipocampo dorsal de animales en diestro afectadas por la administración de KA fueron CA1 y giro dentado, y en menor grado CA3, mientras que áreas del hipocampo de ratas lactantes sólo mostraron pequeñas alteraciones en la región CA3, y sólo con la dosis más alta de KA (7.5mg/kg pc) utilizada en dicho estudio. Este trabajo mostró claramente que durante la lactancia hay una menor susceptibilidad a la degeneración celular por excitotoxicidad por KA. Por otra parte junto con el daño celular, la administración de KA induce manifestaciones conductuales epileptoides y su evaluación mostró que las ratas en diestro tratadas con KA intraperitoneal (7.5 mg/kg pc) llegaron a la fase 4 y 5 de acuerdo con la escala Zhang (Zhang et al., 1997), mientras que las ratas lactantes mostraron sólo los primeros indicios de estas manifestaciones (Vanoye-Carlo et al., 2008). También, se ha determinado que esta protección del hipocampo contra la excitotoxicidad dada por la lactancia se mantiene aún a tiempos prolongados

(72 h) de exposición al KA (Cabrera et al., 2009) y aun con la inyección intracerebroventricular (icv) de KA.

2.7 LACTANCIA Y GH.

Se sabe poco sobre el papel de la GH en el SNC y su variación durante la lactancia. Existen evidencias de que la GH, PRL y el IGF-I están relacionados con procesos metabólicos en las células epiteliales mamarias durante la lactancia en los murinos (Hadsell et al., 2005; Hadsell et al., 2008). Además, la GH y el IGF-I estimulan la producción de leche en la lactancia del ratón y otras especies de mamíferos; el efecto de la GH puede ser además, mediada a través de IGF-1.

Experimentos realizados por Wehrenberg et al. (1989) mostraron que durante la lactancia, el estímulo de la succión causa un incremento de GH en suero de manera rápida y transitoria a 9 y 10 días postparto. Posteriormente, el grupo de Escalada et al. (1997) determinó el contenido de GH sérica durante el embarazo y la lactancia. Ellos observaron que las concentraciones plasmáticas de GH en la rata preñada a al día 20 de embarazo era mayor que en las lactantes y que este era aun menor en las ratas lactantes que no tenían el estímulo de la succión. También, se reportó un aumento en el contenido de somatostatina (SS) en el hipotálamo pero no en el ARNm-SS lo que podría estar teniendo efectos inhibitorios en la síntesis de GH (Escalada et al., 1997).

3. JUSTIFICACIÓN

En respuesta al daño neuronal en el SNC, se producen factores neurotróficos como una estrategia endógena de neuroprotección en respuesta a un daño neuronal. Además de sus efectos endócrinos asociados con el crecimiento y el desarrollo, la GH puede inhibir la muerte neuronal en respuesta al daño producido por hipoxia/isquemia cuando se administra en forma sistémica, teniendo un efecto neuroprotector en diferentes regiones del SNC (Stevens et al., 1996; Scheepens et al., 2001). Además, la administración de GH aumenta la expresión de factores antiapoptóticos (Bax y Bad) en cerebros con daño neuronal (Gustafon et al., 1999; Scheepens et al., 2001), o bien aumenta la fosforilación y activación de factores de sobrevivencia como AKT-P y Bcl2 (Frago et al., 2002). Por otra parte, en la lactancia se manifiestan mecanismos neuroprotectores que disminuyen la susceptibilidad a la degeneración celular hipocampal durante el tratamiento excitotóxico por KA (Vanoye-Carlo et al., 2008; Cabrera et al., 2009). Esta información sugiere la posible participación de la GH en los mecanismos de neuroprotección que se activan durante la lactancia. Sin embargo, se desconoce si la expresión de GH se altera en el hipocampo y el hipotálamo de la rata lactante en asociación con la prevención de la muerte o degeneración neuronal.

4. HIPÓTESIS.

Los niveles de GH en el SNC puede variar en función del status reproductivo de la rata hembra y en respuesta al daño excitotóxico observado en el hipocampo de la rata lactante.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar los cambios en el contenido de GH en el hipocampo e hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes en condiciones basales y con daño excitotóxico.

5.2 Particulares

- I. Determinación del contenido de la GH en el hipocampo, el hipotálamo y circulación por efecto de la lactancia y de la administración de KA.*
- II. Análisis de la distribución de la GH en el hipocampo y el hipotálamo efecto de la lactancia y de la administración de KA.*
- III. Corroboración de que la administración de KA induce daño excitotóxico en el hipocampo y el hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes.*

6. ANIMALES Y MÉTODOS.

6.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas hembra nulíparas de alrededor de 200-250 g y lactantes de un peso entre 290-350 g de la cepa Wistar, se dividieron en 4 grupos experimentales (n=8 c/u) de los cuales 2 grupos eran de ratas nulíparas y 2 de ratas lactantes (de entre 19 y 21 días post-parto) con 8-10 crías por camada las cuales se mantuvieron siempre con las madres. Para investigar la influencia de la GH en la lactancia y la prevención neuroexcitotóxica inducida por KA en este estado reproductivo, a un grupo de ratas nulíparas y a uno de lactantes se les administró una dosis de ácido kaínico intraperitoneal (7.5 mg de ácido kaínico/kg de peso corporal) mientras que a los grupos control se les administró solución salina i.p.; 24 horas después de la inyección ip. se anestesiaron con una sobredosis de uretano al 20 % (v/v) y se sacrificaron por decapitación o bien, fueron perfundidas transcárdialmente con 250ml de solución salina y 250ml de paraformaldehído (PFA) al 4 % (v/v) en buffer fosfatos (pH 9.5, 10 °C) por rata (Figura 2).

Cuatro ratas de cada grupo experimental fueron procesadas para evaluar la concentración de GH por ELISA y Western blot por lo que después de ser sacrificadas se obtuvo el cerebro y la hipófisis que se congelaron y almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento. Las otras 4 ratas de cada grupo experimental fueron perfundidas, su cerebro e hipófisis fueron removidos y post-fijados en paraformaldehído al 4% (p/v) toda la noche. Posteriormente, los tejidos se colocaron en soluciones de sacarosa-PBS al 20% (p/v) y al 30% (p/v) y se hicieron cortes coronales de 30 µm de grosor desde el área preóptica del hipotálamo hasta la porción posterior del hipocampo medio en criostato y se colectaron 5 series; estos cortes fueron almacenados en una solución crioprotectora (0.05M PBS, 40 % etilenglicol v/v, 20 % sacarosa p/v) a -20 °C. (Ver Figura 2)

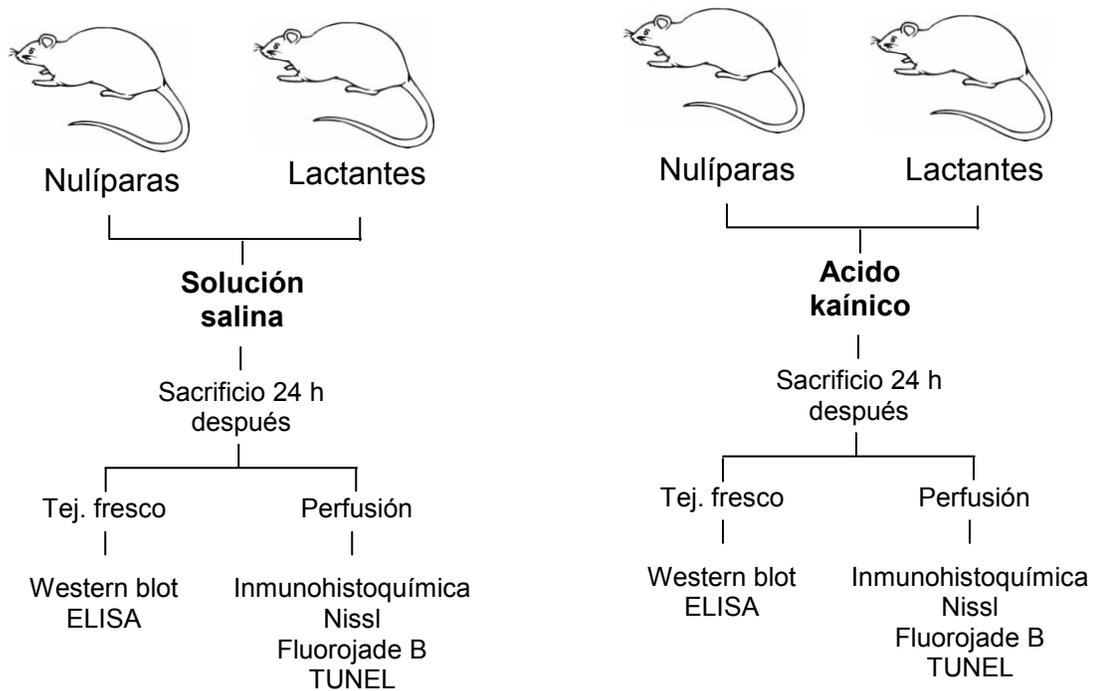


Figura 2. Grupos experimentales y procedimientos utilizados.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Determinación del contenido de rGH en hipocampo e hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes.

Las muestras de hipocampo se homogenizaron en frío con 400 μ l de buffer TRIS-HCl 0.1 M pH 10.3 con inhibidores de proteasas (mini-complete, Roche), hipotálamo e hipófisis en 200 μ l del mismo buffer; se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min y se colectó el sobrenadante. Se cuantificó el contenido de proteína total por el método de Bradford (n=3) (Bradford, 1976).

Para la cuantificación de GH en suero, fue necesario coleccionar la sangre después del sacrificio, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10min a 4°C. El suero se mantuvo en congelación hasta la determinación por ELISA.

6.2.1.1 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Utilizamos un ELISA indirecto por competencia (Luna et al., 2005) desarrollado para evaluar a la GH en el suero como en los tejidos (hipófisis, hipocampo e hipotálamo).

Las placas de ELISA (Immulon 2HB, Chantully, VA) se forraron con 12 ng de GH de rata estándar (rGH); se emplearon dos anticuerpos policlonales: el primario de Ab-rGH a una concentración de 1:60,000ug (Rabbit anti-growth, hormone policlonal antibody, Chemical International)/TPBS 0.01M leche 1%, y el secundario anti-IgG (Goat anti-rabbit. Roche) conjugado con peroxidasa de rábano a una concentración de 1:3000 en TPBS 0.01M leche 1%. Para revelar se emplea el kit 2,2'-amino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfato] (ABTS, Roche Mannheim, Germany) y se preparó a una concentración de 1mg de OPD en pastilla/ml de buffer sustrato.

La proteína total utilizada para el ensayo de ELISA en los grupos experimentales fue de 30 µg para el caso de hipocampo, 50 µg para hipotálamo y 0.3 µg para hipófisis. En el suero, se determinó que 20 µl de suero era la cantidad ideal para ubicar las muestras en la región lineal de la curva estándar y se reporta como µg/ml de suero.

6.2.1.2 SDS-PAGE/ Western blot. Para determinar la presencia de isoformas de peso molecular de la GH en extractos de tejido de hipocampo y de hipotálamo se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida de una dimensión bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las muestras (que contienen 50 µg de proteína total para hipocampo y 110 µg para hipotálamo) fueron analizadas en un gel de 1 mm, 6 cm de largo a una concentración de 12.5% de poliacrilamida. Las muestras fueron procesadas bajo condiciones reductoras (hipocampo e hipotálamo) en presencia de 5 %(p/v) 2-mercaptoetanol y bajo condiciones no reductoras (hipocampo). Después de la electroforesis, los geles fueron equilibrados con buffer de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, y 20 % (v/v) metanol, pH 8.3) por 60 min y transferidas eléctricamente a 200 mA por 60 min a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente las membranas se lavaron con buffer TBS (30 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) por 15 min y se bloquearon por 2 h a temperatura ambiente con leche 5% (w/v) (Bio-Rad) en TBS. Consecutivamente las membranas se lavaron con TTBS (TBS-Tween-20 0.05%) por 15 min por 3 veces y se incubaron con el anti-rGH a una dilución de 1:3000 en TTBS-

leche 1 % (p/v) durante toda la noche. Las membranas se lavaron 3 veces por 15 min con TTBS, 3 veces por 15 min con TBS. Para la detección de la GH se usó anticuerpo contra IgG de conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad), a una dilución de 1:3000 en TTBS-leche 1% por 2 h. Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas por la incubación de las membranas por 5 min con un sustrato quimioluminiscente: ECL (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) y se expuso por 15 s a 1 min con una película Kodak Biomax ML film para después ser revelado.

6.2.1.3 Control de cargado: Actina. Se lavaron las membranas utilizadas en los Western blots con TPBS (1 % (p/v) leche a 0.05% (v/v) Tween-20 y TBS) 1 vez 15 min, posteriormente se les sumergió en buffer de stripping (100 mM 2-Mercaptoetanol, 2 % SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) y se les incubó a baño maría entre 70 y 80 °C por 40 min en agitación suave y continua. Las membranas se lavaron 2 veces por 15 min con TPBS a temperatura ambiente usando grandes cantidades de buffer. Se bloquearon la membrana por inmersión en leche al 5% (p/v) TPBS por 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se lavaron con TPBS 3 veces por 15min y se incubaron con un anticuerpo policlonal contra actina hecho en cabra a una dilución de 1:3000 en TPBS (1 % (p/v) leche, Tween-20 0.05 % (v/v) en TBS). Las membranas se lavaron con TTBS (3 x 15 min), consecutivamente como segundo anticuerpo se utilizó el anticuerpo anti-IgG de cabra hecho en conejo y conjugado con pexidasa de rábano (Bio-Rad), a una dilución de 1:3000 en 1 % (p/v) de TTBS leche 1% por 2 h. Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas por la incubación de las membranas por 5 min en un sustrato quimioluminiscente: ECL (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) posteriormente fueron expuestas de 15 segundos a 1 min a una película Kodak Biomax ML film para después ser revelado.

6.2.1.4 Inmunohistoquímica. La distribución de la GH se localizó usando la técnica de avidina-biotina-inmunoperoxidasa (Sawchenko et al., 1990). Los cortes coronales de cerebros de ratas se lavaron 3 veces por 15 min en PBS, en secciones flotantes tratadas previamente con peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v) por 10 min, se lavaron con PBS y se incubaron con borohidrato de sodio al 1% (p/v) por 6 min para reducir el número de aldehídos libres. El tejido fue incubado con una solución de

bloqueo (BSA 5 % (v/v) /suero de cabra al 2 % (v/v) / tritón 1 % 100x (v/v) en PBS) por 1 h para disminuir el marcaje no específico. Posteriormente se incubó con anticuerpo primario (policlonal para GH 1:500, Chemicon International) a 4 °C por 48 h, después se lavó el anticuerpo primario y se incubó con un segundo anticuerpo biotinilado por el sistema avidina/biotina (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA), por último se adicionaron 2ml de una solución con: DAB al 15% (p/v) / B-D glucosa al 0.8 % (p/v)/cloruro de amonio al 0.16 % (p/v)/ sulfato de amonio y níquel (NAS) al 45 % (p/v)/ glucosa oxidasa al 0.1% (p/v) para revelar las células positivas a rGH. Los cortes fueron observados en el microscopio Olympus BX51 a una magnitud de 40x/0.75 AN.

6.3 Confirmar que la administración de KA induce daño excitotóxico en hipocampo e hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes.

Dado el daño neuronal que ha sido reportado tras la administración de ácido kaínico (Wang et al., 2005) fue necesario ver este efecto excitotóxico en la morfología neuronal (NISSL) y evaluar diferentes marcadores de daño neuronal (TUNEL y Fluorojade-C) Cortes de cerebro de los diferentes grupos experimentales se lavaron 3 veces con PBS posteriormente se montaron en portaobjetos y se dejaron secar de 1 día para los ensayos de NISSL y de TUNEL y una semana para fluorojade-C.

6.3.1 NISSL. Esta técnica tiñe el ARN ribosomal (ARNr) tanto en el retículo endoplásmico rugoso como otras regiones que presenten ARNr –como el citoplasma. Los cortes de cerebro se lavaron con agua destilada por 1 min y se sometieron por un min a deshidratación bajo diferentes concentraciones de alcohol (etanol al 50 %, 70 %, 95 % y 100 %) y xileno al 100 %, posteriormente se rehidrataron a las mismas concentraciones de etanol, se tiñeron en una solución de tionina (0.25% p/v) por 10 min, y se lavaron con agua destilada para deshidratar paulatinamente con etanol a concentraciones en orden creciente y xileno. Las láminas se incluyeron con resina (DPX, Electron Microscopy Sciences-BDH) y se observaron al microscopio.

6.3.2 FLUORO-JADE C. Esta técnica se utilizó para cuantificar neurodegeneración. Los tejidos montados en el portaobjetos, se rehidrataron con NaOH 1 % (p/v) en etanol al 80 % (v/v) por 5 min, etanol al 70 % (v/v) por 2 min y H₂O doble destilada por 2 min. Los cortes se trataron con KMnO₄ 0.06 % (p/v) 10 min en agitación y después agua bidestilada por 2 min. Los tejidos se incubaron en agitación en la solución de Fluoro-Jade al 0.0004% (p/v) en ácido acético 0.1% (v/v) durante 20 min posteriormente se hicieron lavados con agua bidestilada 3 veces por 5 min cada una. Por último los cortes se secaron a 50 °C de 5 min, se trataron con Xilol al 100% por un minuto y se cubrieron con solución DPX. Se observaron en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

6.3.3 TUNEL Se montó el tejido en portaobjetos (Fisher Superfrost) y se dejó por 1 día en desecación. Las muestras recibieron un pre-tratamiento antes de someterlas al reactivo de TUNEL; se agregó PBS por 5 min, posteriormente se agregó la solución de bloqueo por 10 min (solución 9:1 de metanol absoluto-peróxido de hidrógeno), se lavó con PBS 2 veces por 5 minutos y posteriormente se agregó la solución de permeabilización (0.1% Triton, 0.1 citrato de sodio) por 10 min, se lavó con PBS 2 veces 5 min y se trató con 100 ul de proteinasa K concentrada (20 µg/µl) durante 10 min, después se lavó con PBS 2 veces por 5 min.

Para realizar el ensayo de TUNEL se utilizó el estuche para detección de muerte celular POD *in situ* de ROCHE siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor. Brevemente, a cada portaobjetos se le agregaron 50 ul de la mezcla de TUNEL (5 ul de la solución con TdT en 45 ul de la solución con los dUTPs) sobre los tejidos y se cubrieron con parafilm, se incubaron por 1 h a 37 °C en una cámara húmeda, se lavaron 3 veces con PBS. Por último, para realizar la tinción de DAPI (4'-6-Diaminidino-2-phenylindole) se colocaron 200 µl de la solución de DAPI (1 mg/ml DAPI) y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad por 30 min, se lavaron una vez con PBS por 5 min finalmente se les colocó el cubreobjetos usando medio de montaje fluorescente DakoCytomationn.

Los cortes fueron observados en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

6.4 Conteo celular y densitometría.

Los cortes que se utilizaron en la cuantificación fueron delimitados de acuerdo al atlas Paxinos et al. (1985) entre 2.5 y 4.0 Bégma. Las microfotografías fueron tomadas con la cámara del microscopio y las imágenes fueron analizadas usando el software Imaje-J 1.41 (NIH, Bethesda MD. USA). Cada sección tiene una distancia de 180 μ m de separación entre tejidos y se utilizaron 6 secciones por rata. Del hipocampo dorsal se cuantificó las áreas CA1, CA3, CA4 y giro dentado (GD) tomando una sección de la microfotografía de 145x290 μ m (0.42 mm²), mientras que para el hipotálamo se cuantificaron el núcleo arcuato y la región periventricular correspondiente a una área de 220x275x400 μ m (0.30 mm²). El análisis morfométrico fue realizado cuantificando el número de células positivas a GH por inmunohistoquímica el cual se realizó manualmente. También se midió la densidad óptica en pixeles. Para el caso de muestras fluorescentes (Fluorojade-C y TUNEL), se tomaron las secciones de cada una las microfotografías y se convirtieron a escala de grises generando un patrón blanco y negro donde el negro corresponde a las células positivas para Fluorojade-C o TUNEL, posteriormente mediante el software Image-J 1.41 se cuantificó la densidad en pixeles. Los datos son presentados como el promedio de señal a Fluorojade-C o TUNEL según el área indicada (hipocampo: 145x290 μ m, hipotálamo: 220x275x400 μ m).

6.5 Análisis estadístico.

Los datos se analizaron mediante una prueba “t de Student” con valores no pareados para determinar la diferencia entre grupos de ratas nulíparas y lactantes, al igual que los mismos grupos pero con administración de KA. Se utilizó el programa Statview para las pruebas estadísticas y Excel para generar las gráficas.

7. RESULTADOS.

7.1 Determinación del contenido de rGH en hipocampo e hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes.

7.1.1 ELISA: Con la finalidad de cuantificar el contenido de GH en diferentes estructuras del SNC (hipocampo e hipotálamo) de ratas en diferentes condiciones reproductivas (nulíparas y lactantes), se determinó por el método de ELISA la concentración de rGH. No se observaron diferencias significativas entre las dos condiciones en hipocampo, hipotálamo e hipófisis; sin embargo, tuvo lugar un aumento significativo en la concentración de rGH en suero de alrededor de un 30 % en ratas lactantes en comparación con las ratas nulíparas (Figura 3). Por otra parte, el hipocampo mostró niveles menores de GH en ratas lactantes *versus* las ratas nulíparas.

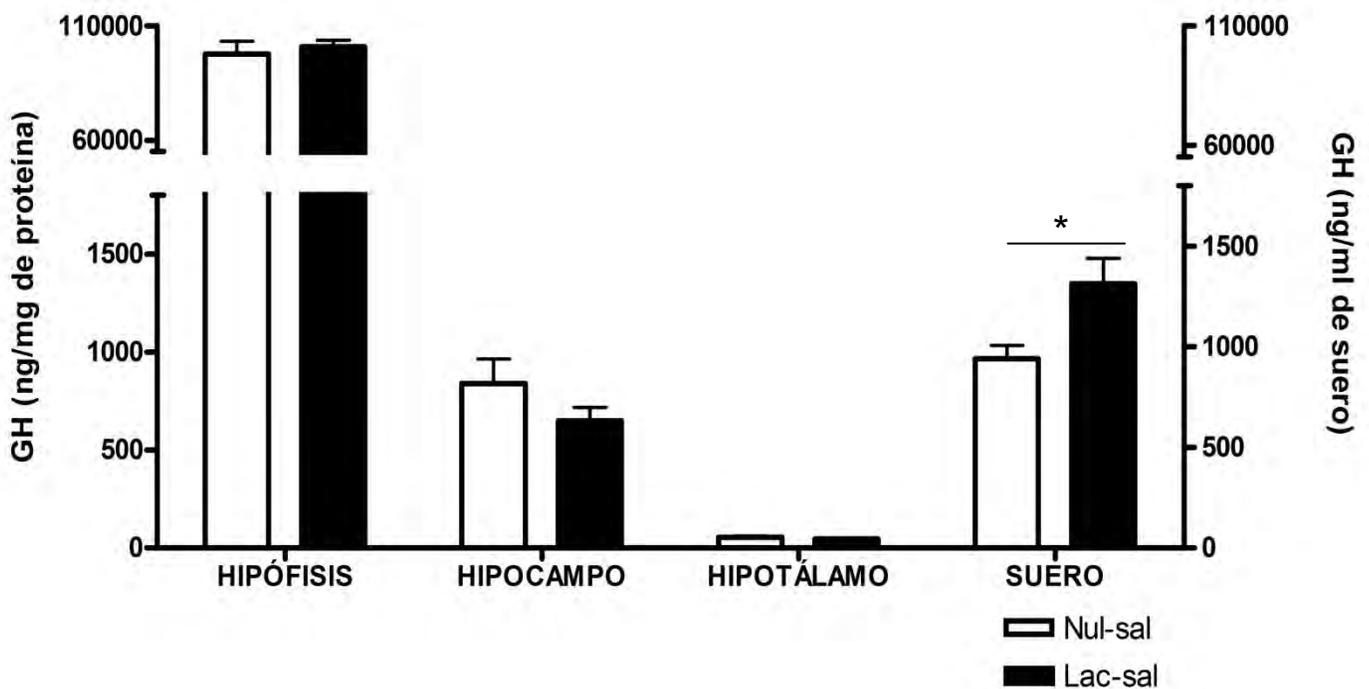
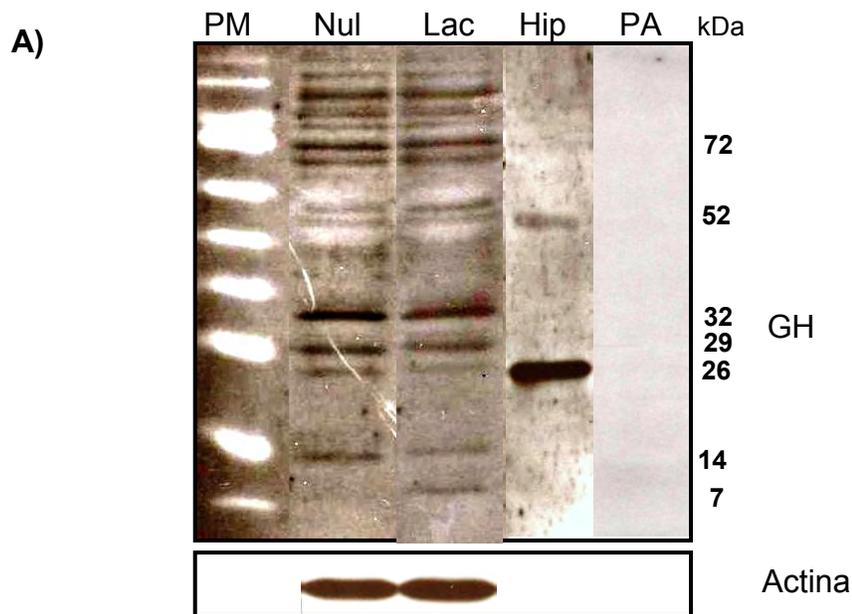


Figura 3. Contenido de GH en hipófisis, hipocampo, hipotálamo y suero de ratas nulíparas y lactantes. En el histograma se observa el contenido de rGH expresada en ng de GH por mg de proteína total en ratas nulíparas y lactantes en hipófisis, hipocampo, e hipotálamo. (*) $p < 0.05$ vs nulíparas. $n = 4$ por grupo para hipocampo, hipotálamo e hipófisis, mientras que en suero la $n = 8$ por grupo. Nul=nulíparas, Lac=Lactantes, sal: tratadas con solución salina

7.1.2 SDS-PAGE/Western blot: Por otra parte se utilizó un SDS-PAGE y Western blot para determinar si alguna variante de peso de la GH se está expresando en mayor o menor concentración en el hipocampo e hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes.

(i) *Hipocampo*. Se observaron diferentes variantes en el hipocampo: 7, 14, 26, 29, 32, 52, 72 kDa entre otras, tanto en ratas nulíparas como lactantes (ver Figura 4A). Se cuantificó y se graficó el área bajo de la curva de rGH sobre actina en cada variante (Figura 4C) y en el total de la suma de todas las variantes (Figura 4B); tanto en la suma total como en las diferentes variantes de peso molecular no se observaron diferencias significativas entre nulíparas y lactantes.



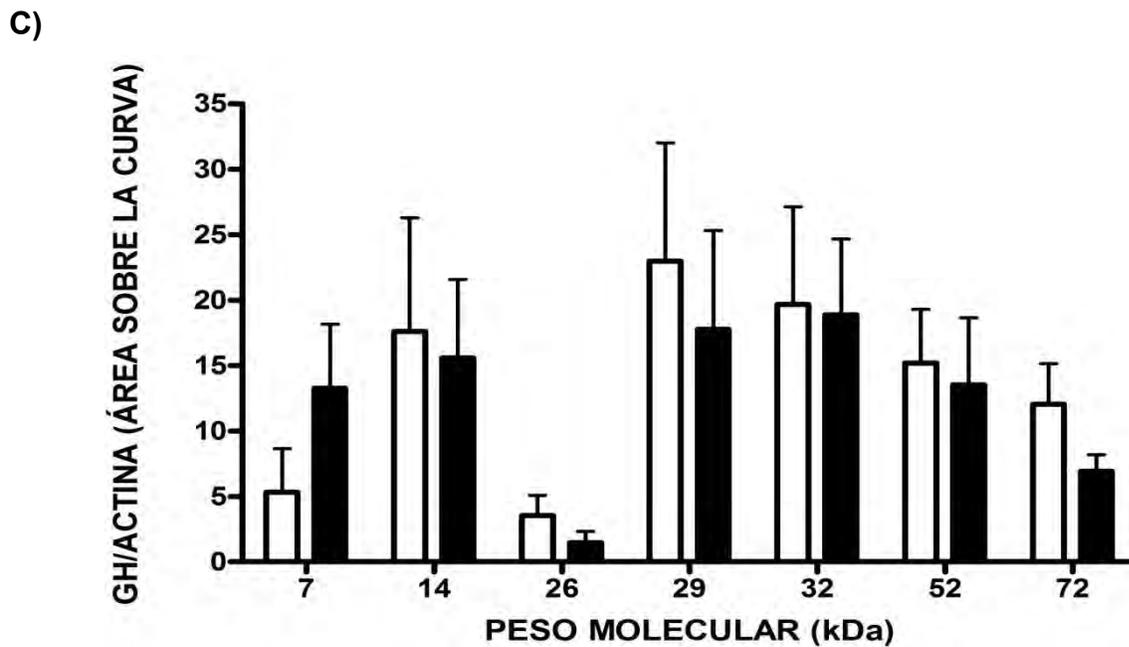
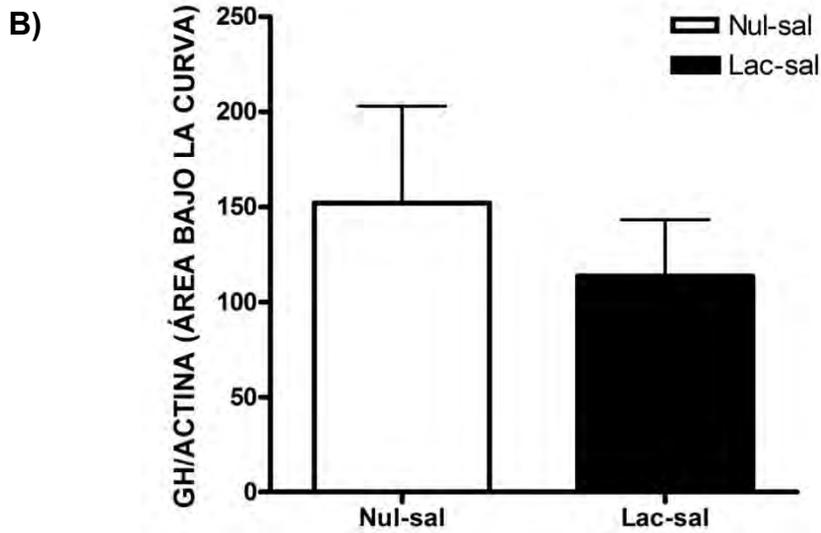
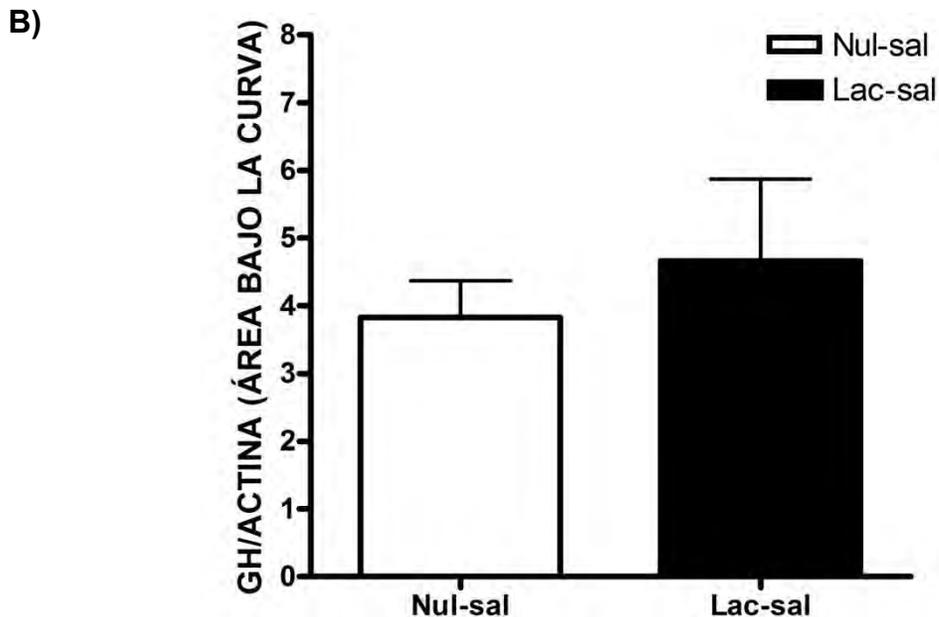
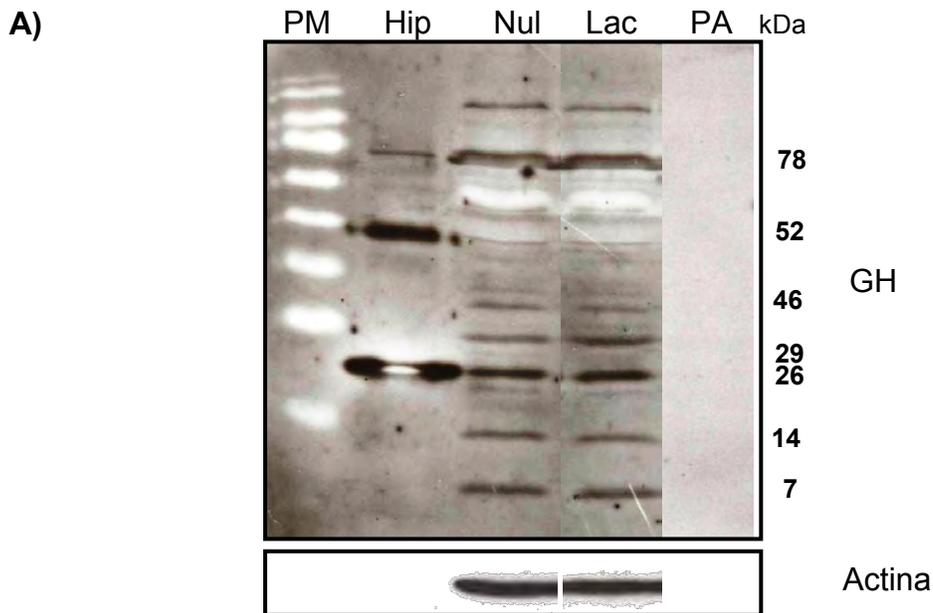


Figura 4. Variantes moleculares de GH en hipocampo. A) Luminograma de rGH de cada grupo experimental en condiciones reductoras, en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, en el carril número 2 y 3 hay muestra de hipocampo de ratas nulíparas (Nul) y lactantes (Lac) respectivamente, en el carril 4 extractos hipofisarios de ratas hembra nulíparas (hip) y en el último carril (5) se muestra el control negativo con anticuerpo pre absorbido con GH recombinante de rata (PA), en el panel inferior de esta misma figura está el control de carga con Ab- α -actina, por último a la izquierda se muestran los pesos moleculares correspondientes para cada banda en kDa. (B) Se muestra el contenido total de GH/ α -actina (área bajo la curva) de todas las bandas. (C) Gráfica que muestra el contenido de rGH entre el contenido de actina (área bajo la curva) de las variantes observadas en condiciones reductoras en extractos de hipocampo en ratas nulíparas y lactantes. n=4 por grupo.

(ii) *Hipotálamo*. Las isoformas principales de GH fueron de 7, 14, 26, 29, 32, 46, 52 y 78 kDa en el hipotálamo tanto en ratas nulíparas como lactantes (Figura 5A). Se cuantificó y se graficó el área bajo de la curva para la densidad óptica que se presentó en cada variante (Figura 5C) y en total para todas las variantes de rGH; estas últimas divididas entre el área de la densidad óptica correspondiente a actina (Figura 5B). En la concentración total de GH/actina no se observaron cambios significativos a pesar de las tendencias observadas entre las de bajo peso molecular que es menor en lactantes esto se revierte con las variantes de alto peso molecular.



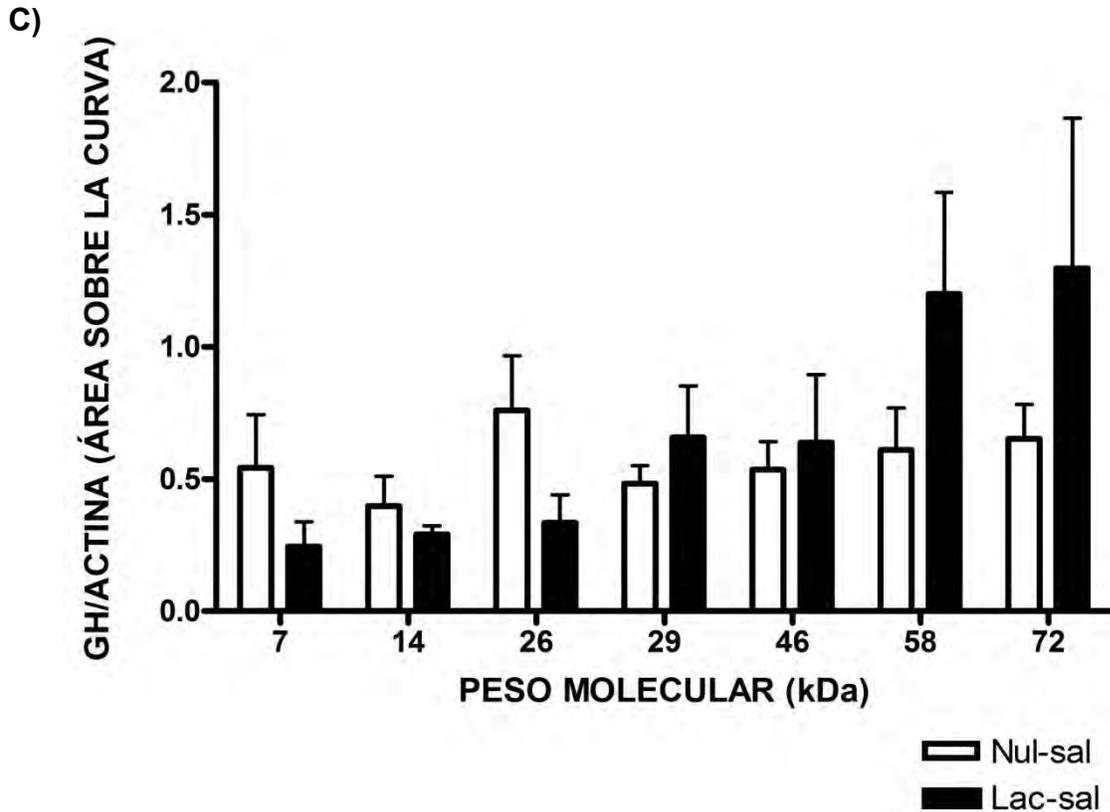


Figura 5. Variantes moleculares de GH en el hipotálamo. A) Se muestra un luminograma representativo para detectar rGH del hipotálamo de cada grupo experimental en condiciones reductoras. En el primer carril se muestran los marcadores de peso molecular, en el carril 2 extractos hipofisarios (hip) de ratas hembra nulíparas, en el carril 3 y 4 hay muestra de hipotálamo de ratas nulíparas (Nul) y lactantes (Lac) respectivamente, y en el carril 5 se muestra el control negativo con Ab-rGH pre absorbido con exceso de GH recombinante de rata (PA), en el panel inferior de esta misma figura está el control de carga con Ab- α -actina. Del lado izquierdo se muestran los pesos moleculares correspondientes para cada banda en kDa, (B). Gráfica correspondiente al contenido de GH entre el contenido de α -actina de la suma de todas las bandas. (C) La gráfica muestra la proporción relativa de GH/ α -actina de cada una de las variantes observadas en condiciones reductoras en extractos hipotalámicos de ratas nulíparas y lactantes. n= \sim 6 por grupo. Nul=nulíparas, Lac=lactantes.

7.1.3 Inmunohistoquímica. Se realizó el ensayo inmunohistoquímica para cada grupo (núlparas y lactantes con inyección de solución salina) y se obtuvieron microfotografías con el objetivo de 10x para hipocampo e hipotálamo, además se cuantificó la inmunoreactividad al anticuerpo de rGH por el área de la microfotografía.

- i) *Hipocampo.* Se tomaron microfotografías de las diferentes regiones del hipocampo: CA1, CA3, CA4 y giro dentado (GD). Se observó tanto en las ratas núlparas como en las lactantes que la mayor inmunoreactividad a la GH se localizaba en CA3 (Figuras 6 y 7) y la menor en el GD. En CA3 hay una tendencia a una mayor inmunoreactividad en las ratas lactantes *versus* las núlparas. Sin embargo, sólo existen diferencias significativas en la región de GD (Figuras 6 y 7).

- ii) *Hipotálamo.* Se observó una mayor número de células positivas para GH en la región del núcleo arcuato y región periventricular del hipotálamo por lo que se tomaron microfotografías de estas regiones. No se observaron diferencias significativas entre los grupos, no obstante se detectó una tendencia a una menor inmunoreactividad en ratas lactantes *versus* las núlparas (Figura 8).

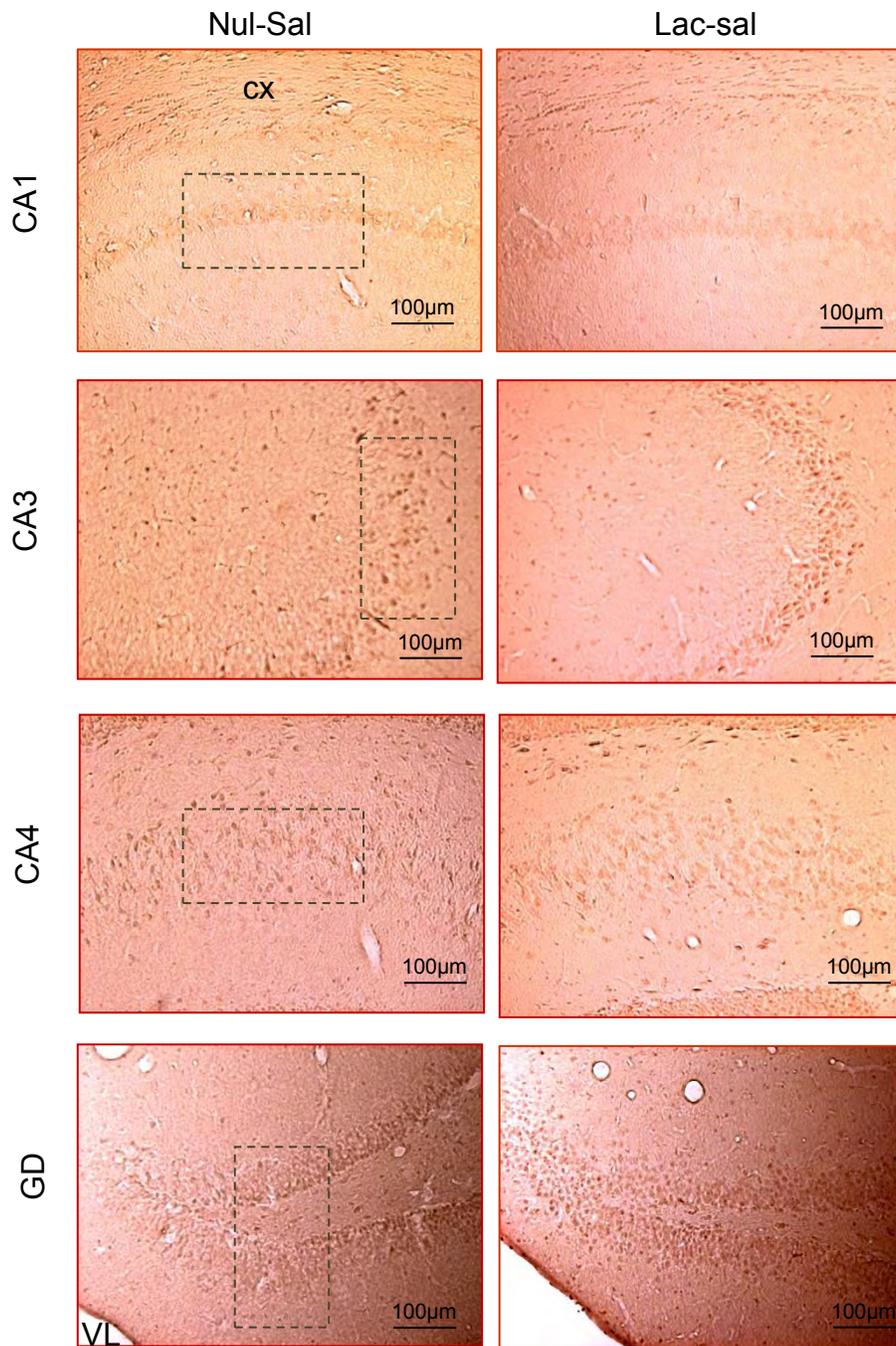


Figura 6. Inmunohistoquímica para rGH en el hipocampo de ratas nulíparas y lactantes. Se muestran microfotografías de las regiones CA1, CA3, CA4 y GD del hipocampo de ratas nulíparas (izquierda) y lactantes (centro) inyectadas con solución salina ip. n=4 por grupo. La cuantificación se realizó en el área punteada. Cx: corteza, VL: ventrículo lateral

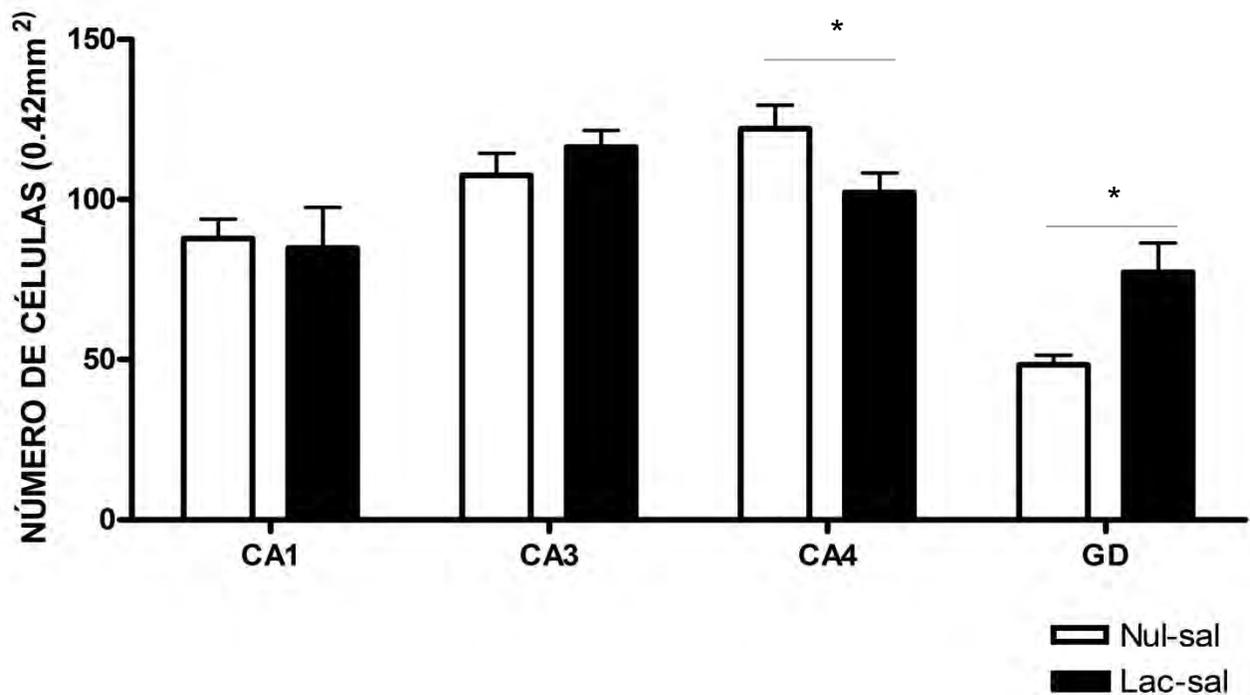


Figura 7. Inmunohistoquímica para rGH de ratas nulíparas y lactantes en hipocampo. Número de células inmunoreactivas para rGH en un área de $145 \times 290 \mu\text{m}$ para cada microfotografía (CA1, CA3, CA4 y GD) de ambos grupos. $n=4$ por grupo. Solo se observan diferencias en las áreas CA4 y GD de ratas nulíparas y lactantes (*) Diferencia significativa con una $p < 0.05$. NUL=nulíparas, LAC =lactantes

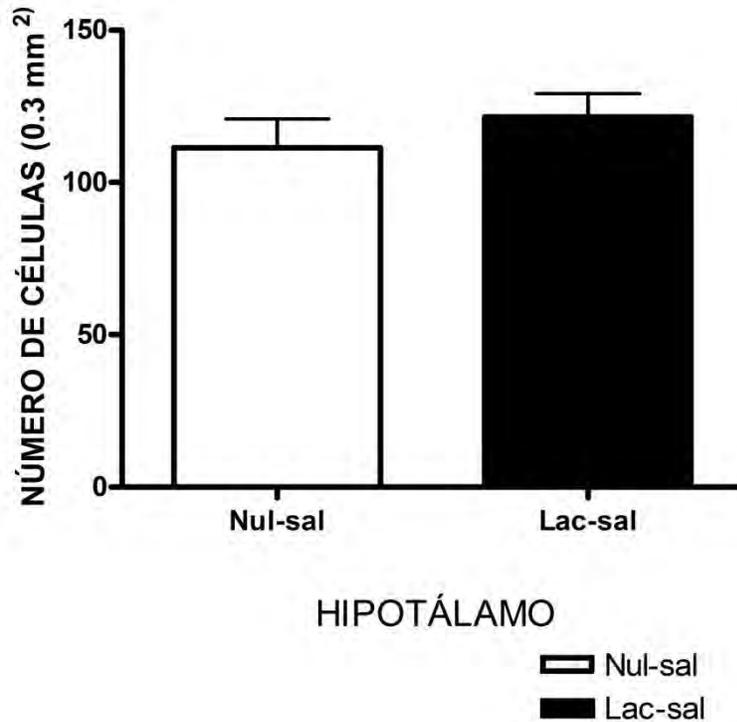
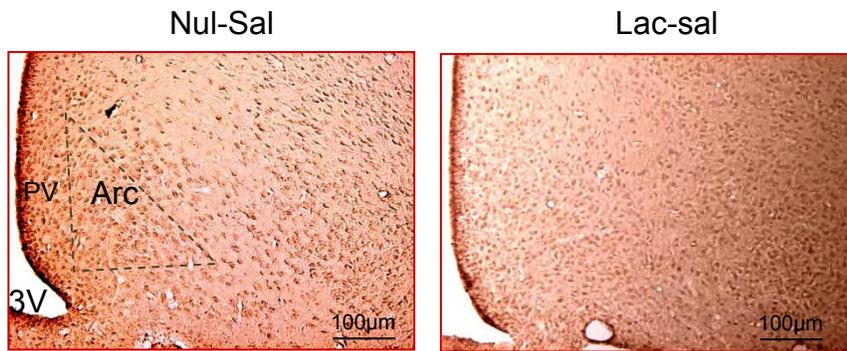


Figura 8. Inmunohistoquímica para rGH en el hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes. Microfotografías de las regiones del núcleo arcuato y región periventricular del hipotálamo de ratas nulíparas (izq.) y lactantes (der.) inyectadas con solución salina ip. Abajo se muestra el número de células inmunoreactivas para rGH de cada grupo en un área de 220x275x400 µm (0.03mm²).n=4 por grupo. NUL=nulíparas, LAC=lactantes. La zona punteada señala el área cuantificada. PV: region periventricular, 3V: tercer ventrículo. Arc. Núcleo arcuato hipotalámico

7.2 Determinación del contenido y distribución de GH en respuesta a la administración de KA en ratas nulíparas o lactantes.

7.2.1 ELISA. Se cuantificó el contenido de GH por ELISA en suero, extractos de hipocampo, hipotálamo e hipófisis de ratas nulíparas y lactantes tratadas con ácido kaínico (7.5mg/Kg.pc) y sacrificadas 24 h después. Se observó mayor contenido de GH en el hipocampo y en el suero de ratas lactantes con respecto a ratas nulíparas que también fueron tratadas con este agonista glutamatérgico, mientras que al igual que en condiciones basales en la hipófisis y en hipotálamo no se encuentran diferencias significativas entre las diferentes condiciones (Figura 9).

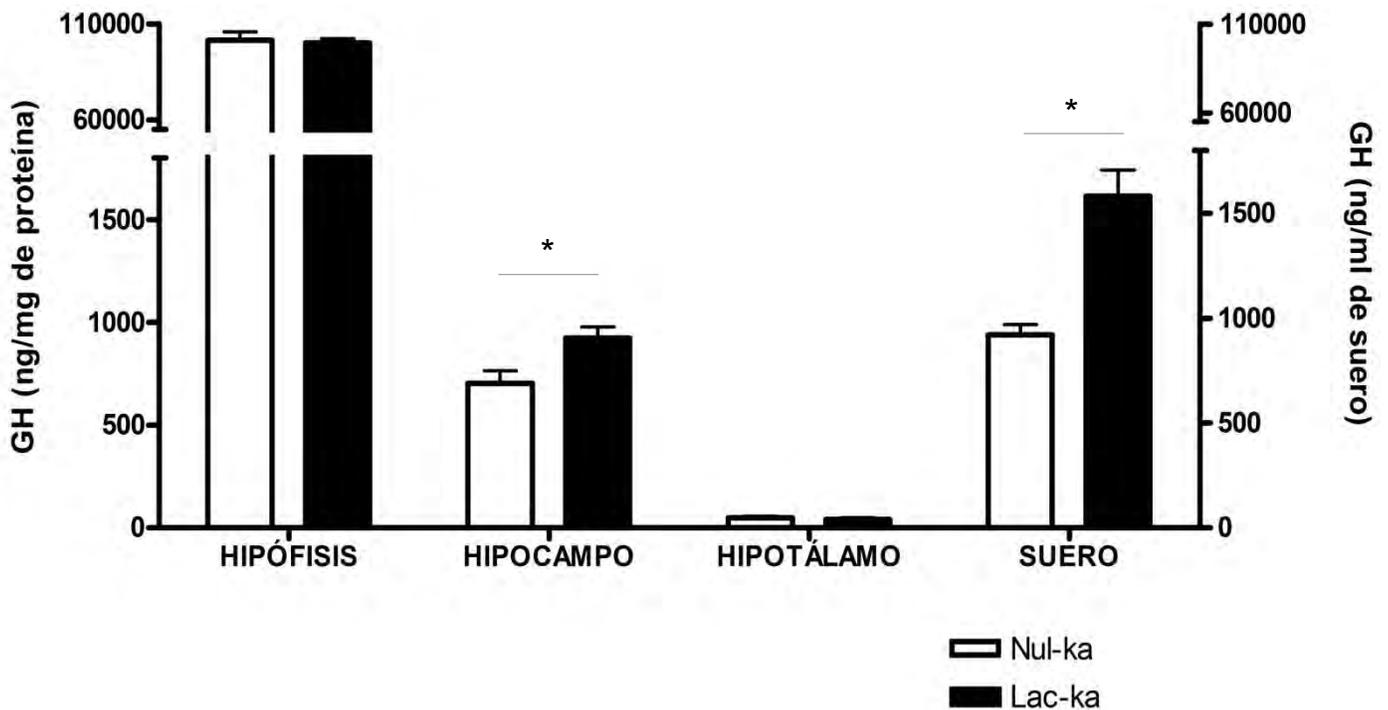
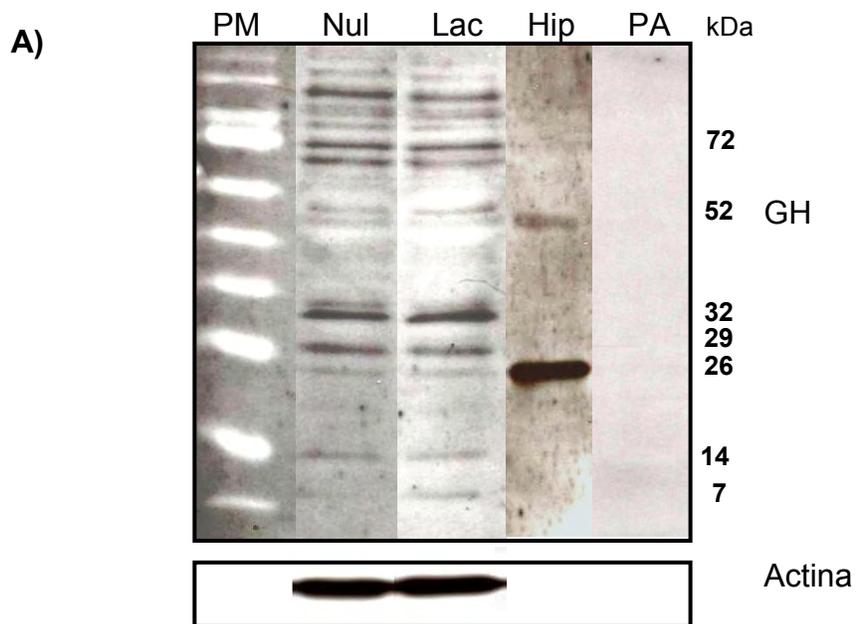


Figura 9. Contenido de rGH en hipófisis, hipocampo, hipotálamo y suero en ratas nulíparas y lactantes con administración i.p. de KA y sacrificadas 24 h después. En el histograma se observa el contenido de rGH expresada en ng por mg de proteína total en ratas nulíparas y lactantes con administración de KA (7.5 mg/Kgpc) para hipocampo, hipotálamo e hipófisis. (*) $p < 0.05$ vs nulíparas. $n=4$ por grupo para hipocampo, hipotálamo e hipófisis, mientras que en suero la $n=8$ por grupo. Nul= nulíparas, Lac=lactantes, ka=tratadas con ácido kaínico.

7.2.2 SDS-PAGE/ Western blot. También se realizó el ensayo de Western Blot para hipocampo e hipotálamo para saber si alguna variante de peso de la GH se modifica bajo estas condiciones experimentales en ratas nulíparas y lactantes, y si las variantes presentan el mismo efecto observado en el ensayo de ELISA.

- i) *Hipocampo.* Como se observa en la Figura 10A en el luminograma no se observaron cambios en el patrón de variantes de peso molecular en el hipocampo (ver figura 10A). Tampoco existe diferencia significativa en el contenido total de GH inmunoreactiva. Por último al calcular los valores densitométricos de cada variante no se observan diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figuras 10B y 10C).



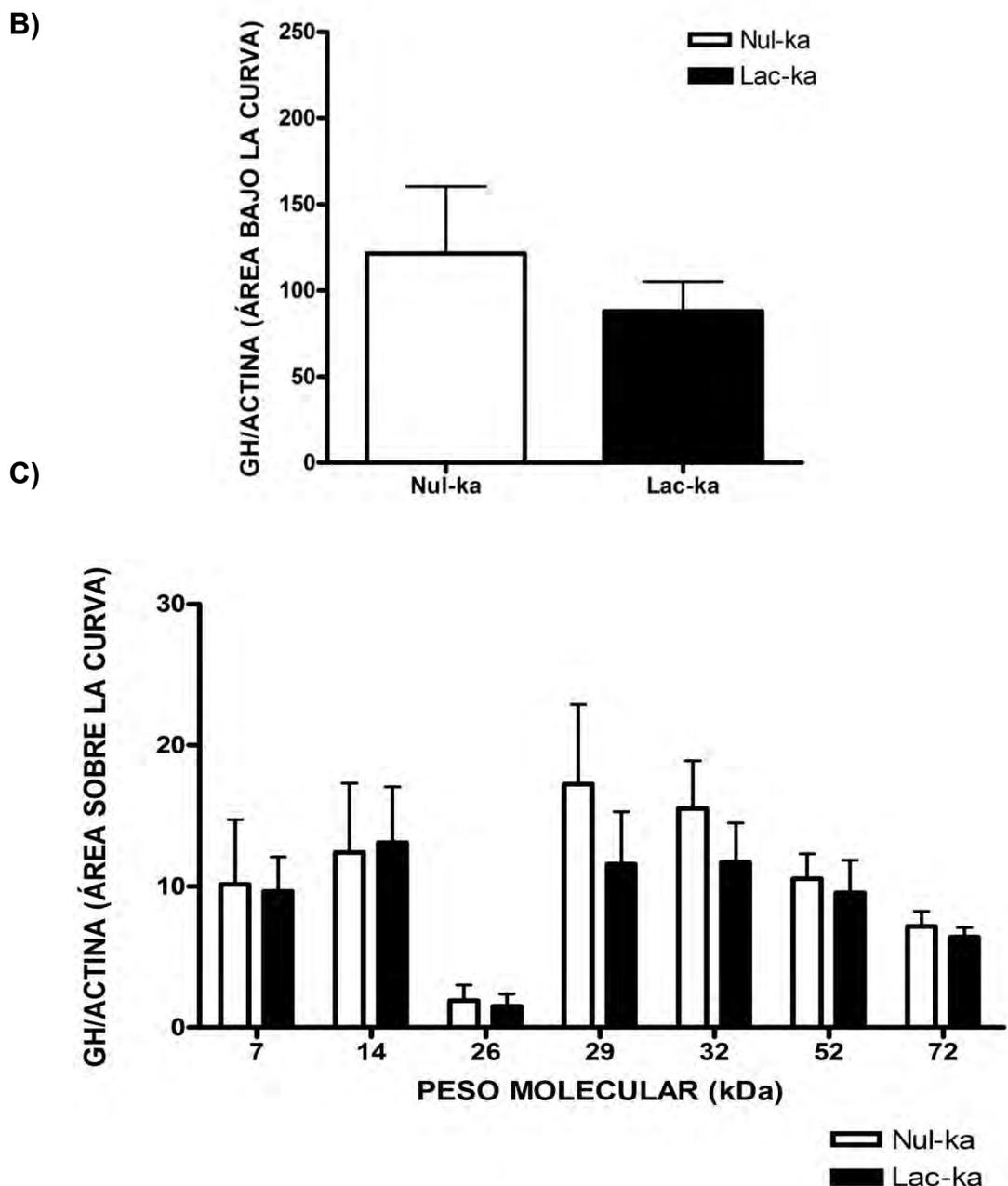
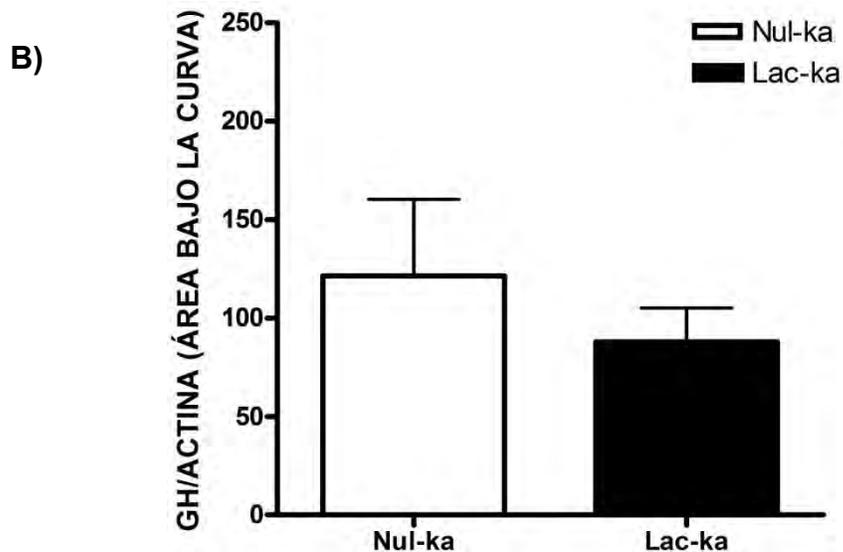
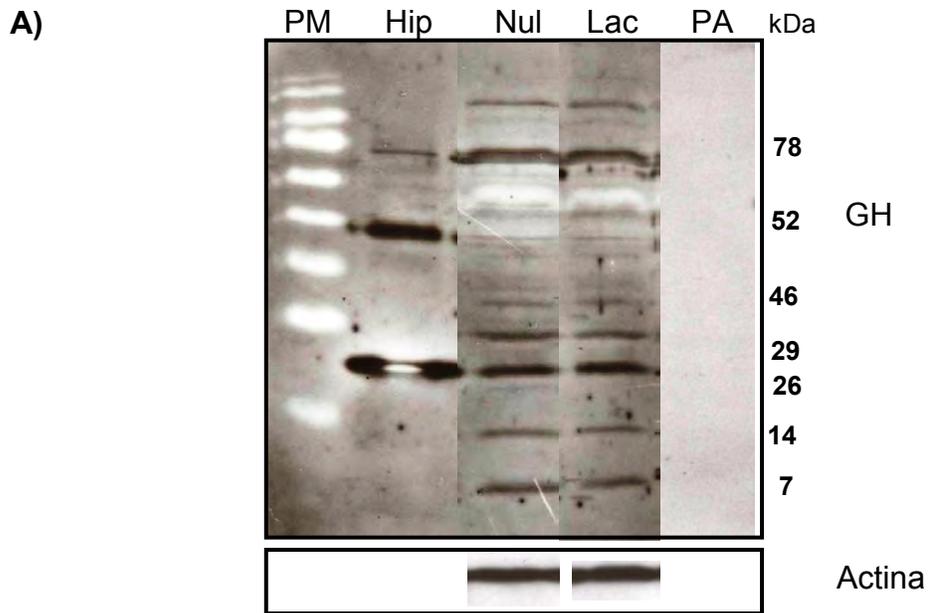


Figura 10. Variantes moleculares de GH en el hipocampo de ratas tratadas con KA. A) Se muestra la imagen de un luminograma representativo para detectar rGH en el hipocampo de cada grupo experimental en condiciones reductoras, del lado derecho se muestran los pesos moleculares correspondientes para cada banda. (B) Gráfica correspondiente al contenido de GH sobre el contenido de actina de todas las bandas (área bajo la curva). (C) Gráfica del contenido de rGH sobre actina (área bajo la curva) de cada una de las variantes observadas en condiciones reductoras en extractos de hipocampo en ratas nulíparas y lactantes tratadas con KA (7.5mg/Kg pc). (*) Diferencias significativas con $p < 0.05$. $n = 4$ por grupo. Nul=nulíparas, Lac=lactantes, KA= con administración de KA.

ii) *Hipotálamo*. Al igual que en condiciones basales, es decir, sin daño excitotóxico producido por KA, las isoformas de GH observadas fueron de 7, 26, 32, 58 y 78 kDa tanto en ratas nulíparas como lactantes tratadas con KA (Figura 11A). Se cuantificó y se graficó el área bajo de la curva obtenida por densitometría para cada variante (Figura 11C) y en total para todas las variantes de rGH dividida entre el área para α -actina (Figura 11B). No se observaron cambios significativos en el contenido total ni en las diferentes variantes entre los extractos hipotalámicos de ratas nulíparas y lactantes con daño producido por KA.



c)

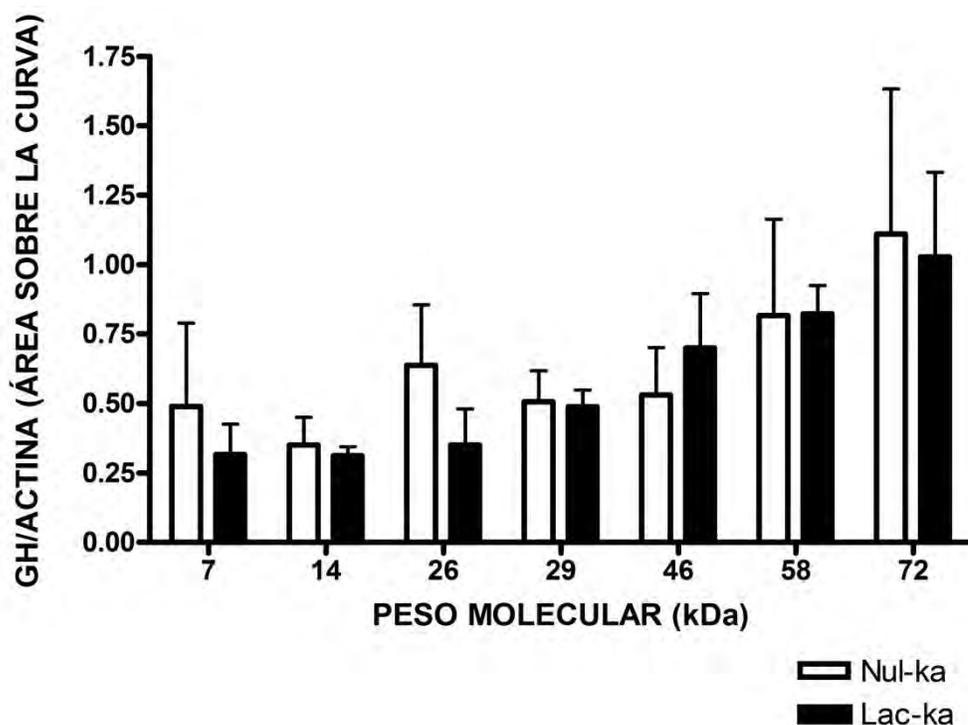


Figura 11. Variantes moleculares de GH en el hipocampo de ratas tratadas con KA. A) Se muestra la imagen de un luminograma representativo para detectar rGH en el hipocampo de cada grupo experimental en condiciones reductoras, del lado derecho se muestran los pesos moleculares correspondientes para cada banda (B) Gráfica correspondiente al contenido al área bajo la curva de GH entre el contenido de actina de todas las bandas. (C) Gráfica del contenido de rGH sobre actina (área bajo la curva) de cada una de las variantes observadas en condiciones reductoras en extractos hipocampales de ratas nulíparas y lactantes tratadas con KA (7.5 mg/kg pc). n=4 por grupo. Nul=nulíparas, Lac=lactantes, KA=tratadas con KA.

7.2.3 INMUNOHISTOQUIMICA. Se cuantificaron las células inmunoreactivas al anticuerpo de GH en un área delimitada del hipocampo y del hipotálamo para los dos grupos experimentales (núlparas y lactantes con inyección de KA a 7.5 mg/kg pc) y se obtuvieron microfotografías (10x).

- i) *Hipocampo.* Se tomaron microfotografías de CA1, CA3, CA4 y giro dentado (GD) del hipocampo y se cuantificaron las células inmunoreactivas observándose también en ambos grupos mayor inmunoreactividad en CA1 (Figuras 11 y 12). No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con KA (Figuras 12 y 13).

- ii) *Hipotálamo.* Al igual que en condiciones basales los grupos tratados con KA una mayor inmunoreactividad en la región del núcleo arcuato y región periventricular del hipotálamo por lo que se tomaron microfotografías de estas regiones. No se observaron diferencias significativas por efecto del KA (Figura 14).

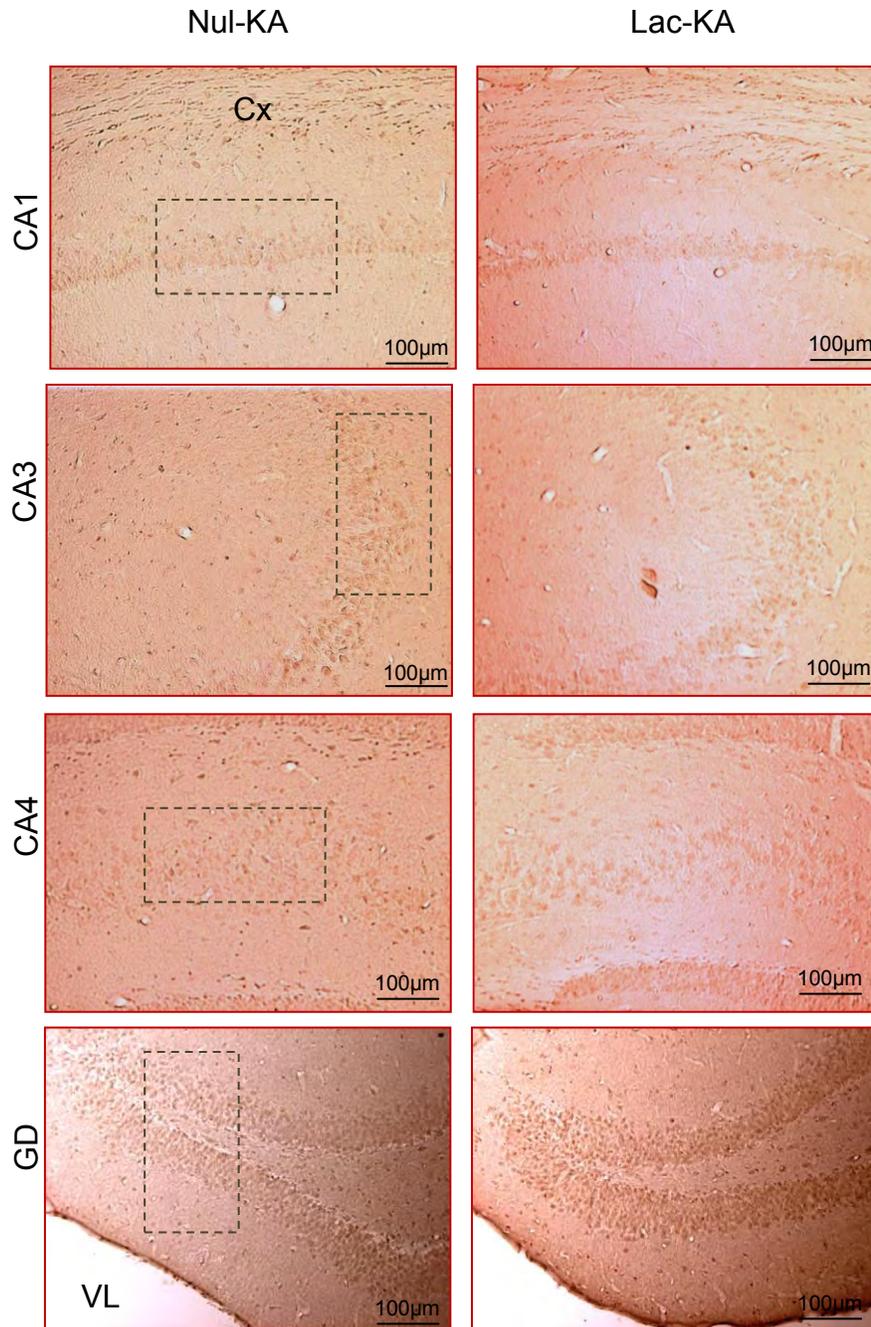


Figura 12. Inmunohistoquímica para rGH en el hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA. Microfotografías de hipocampo de ratas nulíparas (izquierda) y lactantes (centro) con inyección de KA (7.5 mg/Kgkg pc) en las regiones CA1, CA3, CA4 y GD. n=4 por grupo. Nul=nulíparas, Lac=lactantes, KA=tratadas con KA. La cuantificación se realizó en el área punteada. Cx: corteza, VL: ventrículo lateral

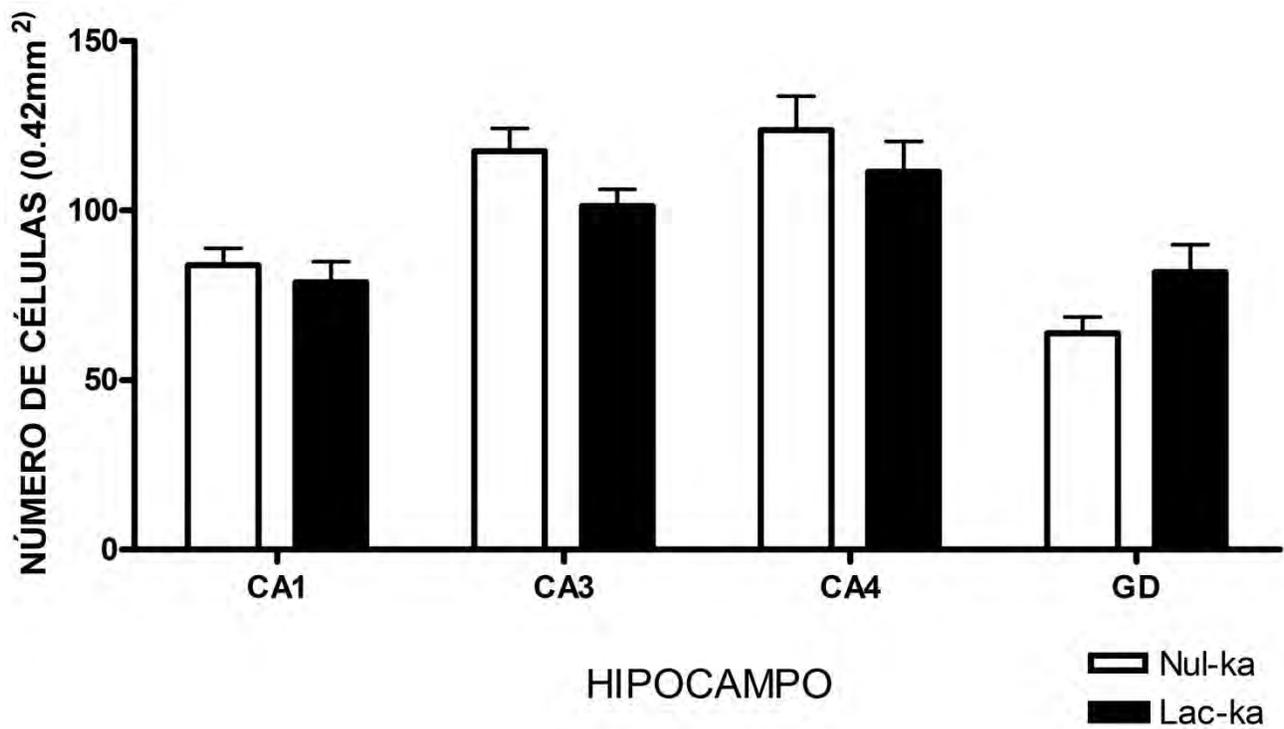


Figura 13. Inmunohistoquímica de hipocampo para GH de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA y sacrificadas 24 h después. Se muestra el histograma del número de células inmunoreactiva para rGH en un área de 145x290 μm (0.42 mm²) para cada microfotografía (CA1, CA3, CA4 y GD) de ambos grupos. n=4 por grupo. (*) Diferencia significativa con una $p < 0.05$. nul=nulíparas, lac=lactantes

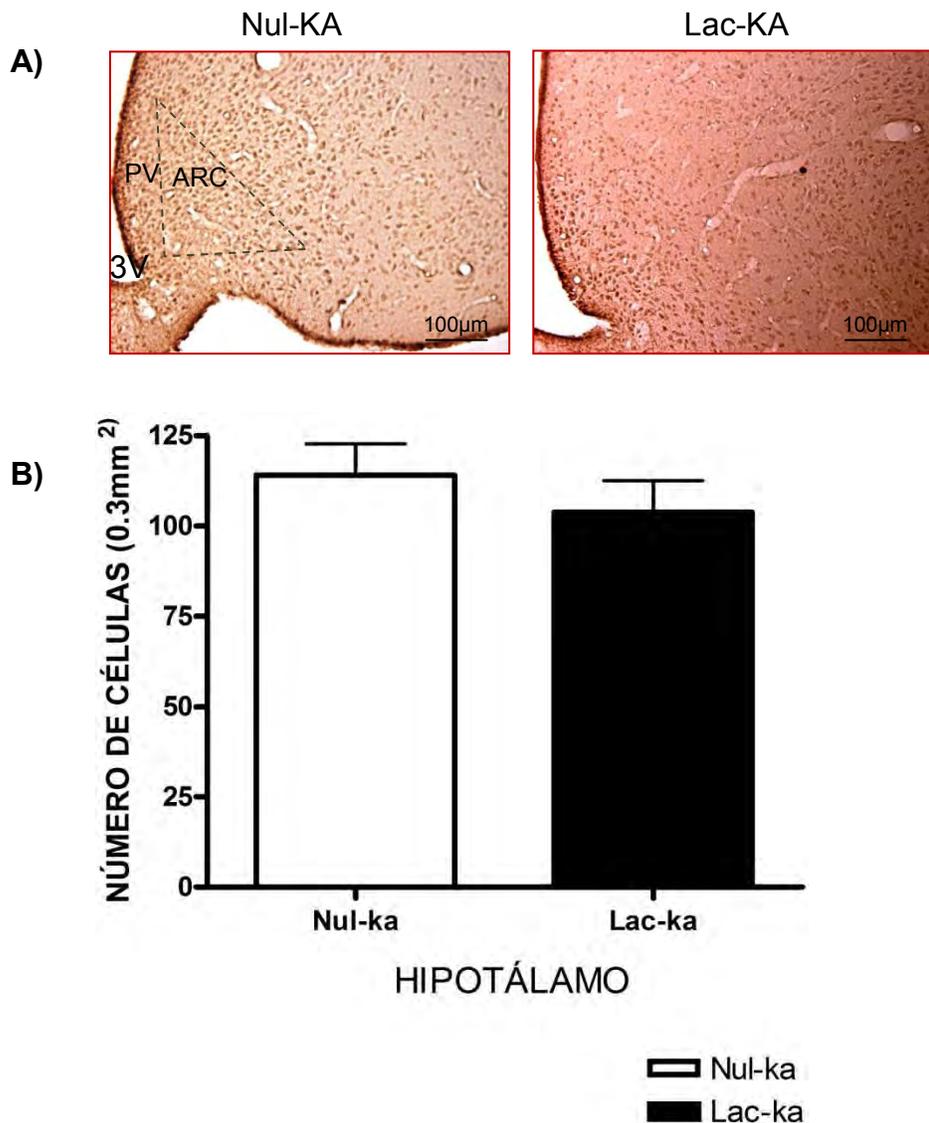


Figura 14. Inmunohistoquímica para rGH en el hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA y sacrificadas 24 h después. A) Microfotografías de hipotálamo de ratas nulíparas (izq.) y lactantes (der.) con inyección de KA 7.5mg/Kgpc en las regiones en el núcleo arcuato y región periventricular del hipotálamo. B) Se muestra el número de células inmunoreactivas a rGH de cada grupo en un área de 220x275x400 μm (0.03mm²). n=4 por grupo. nul=nulíparas, lac=lactantes. La zona punteada denota el área cuantificada. PV: región periventricular, 3V: tercer ventrículo. Arc. Núcleo arcuato hipotalámico.

7.3 Confirmación de que la administración de KA induce daño un mayor daño excitotóxico en hipocampo e hipotálamo de las ratas nulíparas vs. las lactantes.

7.3.1 NISSL. Se realizó la tinción de Nissl en cortes de cerebro de ratas nulíparas y lactantes a las que se les administró solución salina ó KA, la finalidad de esta técnica es observar cambios gruesos en la morfología neuronal después de la administración de KA (Figura 15). En todas las condiciones se observaron cuerpos contraídos y células hinchadas correspondientes a la muerte celular por lo que no se ven diferencias entre los grupos experimentales.

7.3.2 FLUOROJADE-C. Se realizó el ensayo de fluorojade C para los grupos en ratas nulíparas y lactantes a las que se les administró solución salina ó KA.

- i) *Hipocampo.* Se obtuvieron microfotografías del hipocampo (CA1, CA3, CA4 y GD) en las que se observó una mayor marca de fluorojade C en las ratas a las que se les administró KA. En comparación, las ratas lactantes presentaron menos marca que las nulíparas (Figura 16).
- ii) *Hipotálamo.* Se obtuvieron microfotografías del hipotálamo en las que se observó una mayor marca de fluorojade C en las ratas a las que se les administró KA. En comparación, las ratas lactantes presentaron menos marca que las nulíparas (Figura 15) ($p < 0.05$). La cuantificación del porcentaje del área total que presentó la marca a fluorojade en el núcleo arcuato y la región periventricular mostró mayor marca positiva en ratas nulíparas a las que se les administró KA mientras que en los otros grupos no se observaron diferencias (Figura 17).

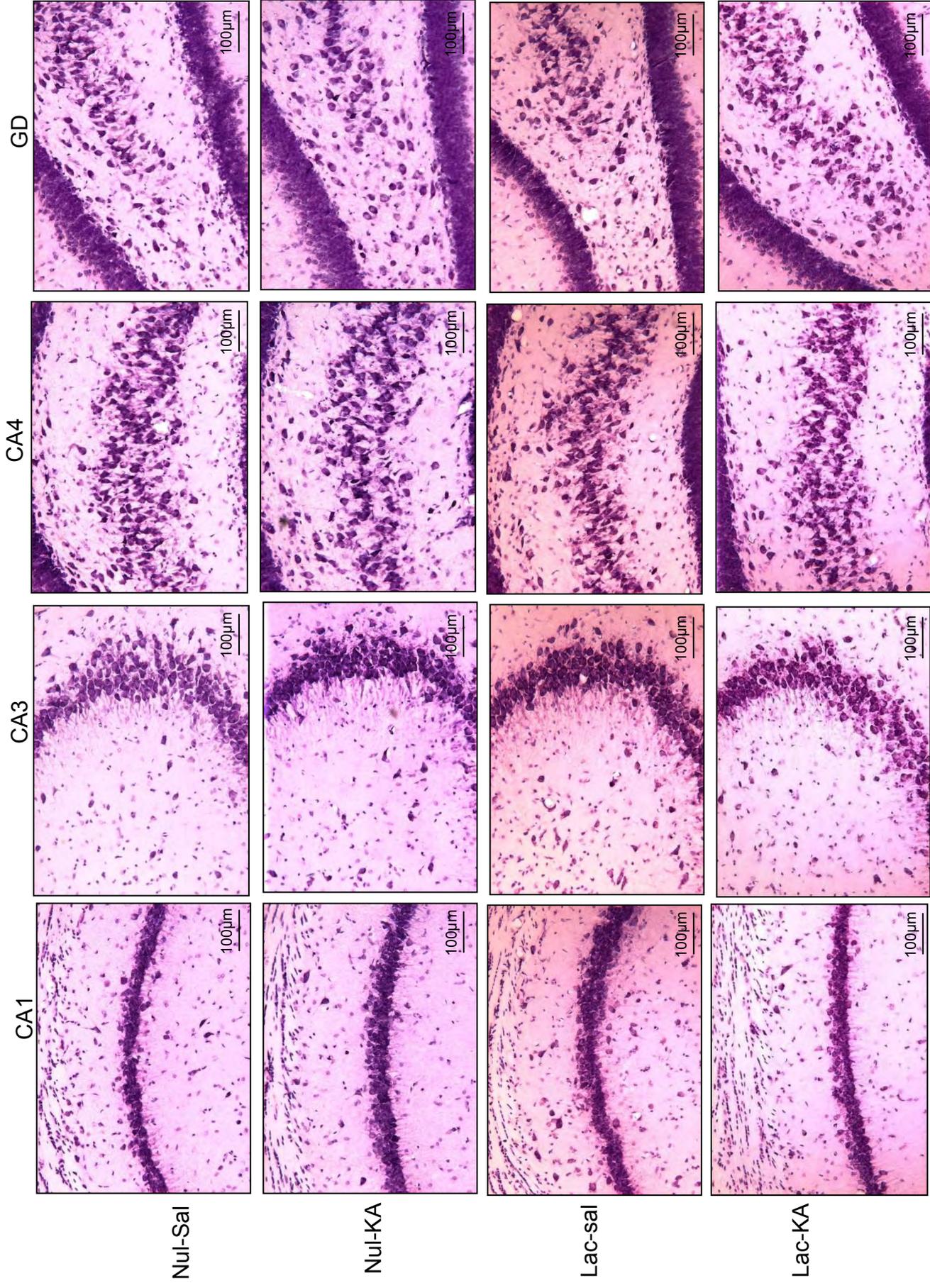


Figura 15. Tinción de Nissl en hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA o vehículo y sacrificadas 24 h después. Microfotografías de hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con inyección de KA 7.5 mg/Kg pc y solución salina i.p. nul=nulíparas, lac=lactantes, ka: ácido kainico, sal=administración de solución salina

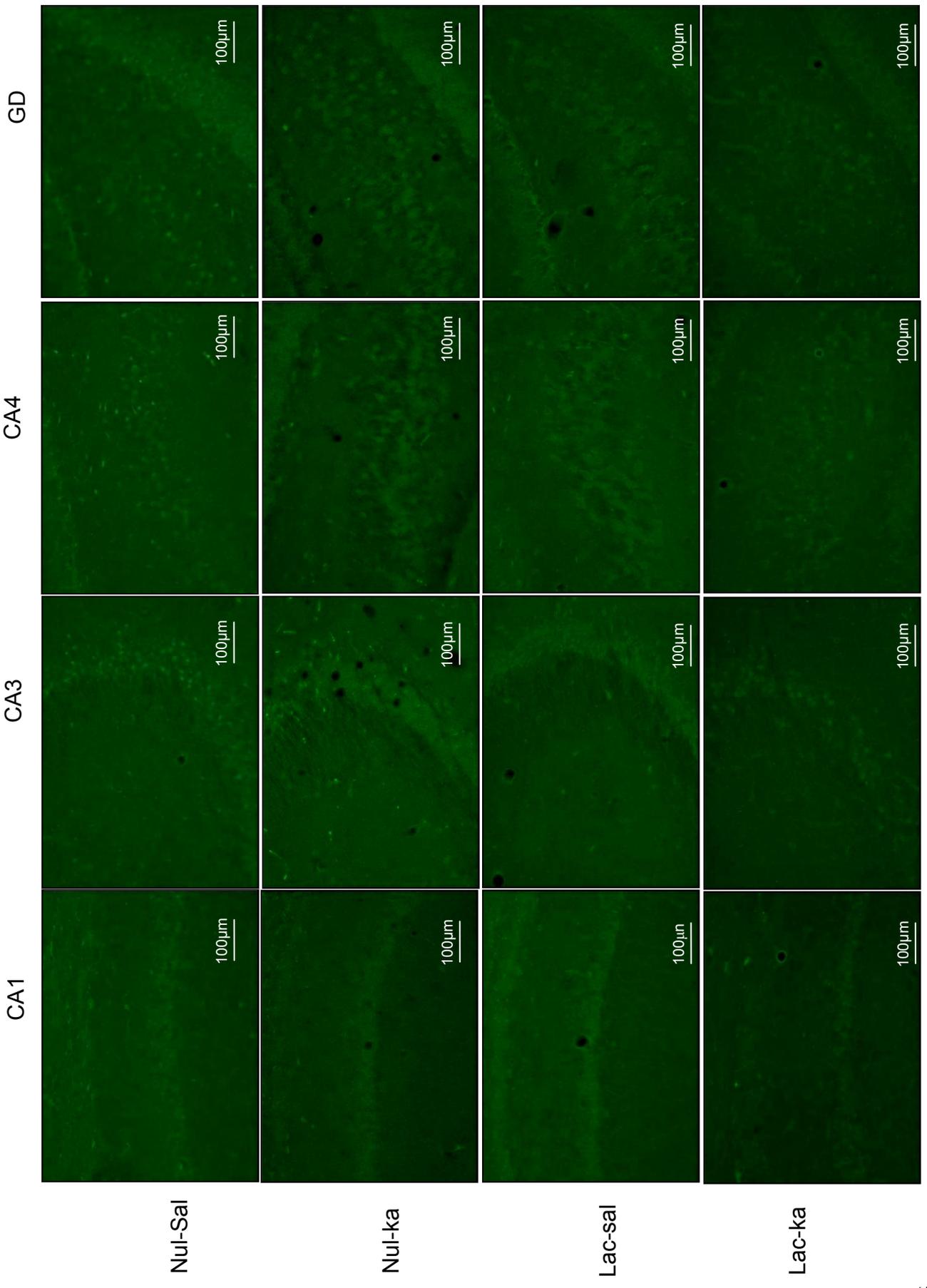


Figura 16. Daño celular (indicado por la marca de Fluorojade-C) en el hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA o vehículo y sacrificadas 24 h después. Se muestran microfotografías de hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con inyección de KA 7.5mg/Kgpc ó solución salina ip. nul=nulíparas, lac=lactantes, ka: ácido kaínico, sal= solución salina

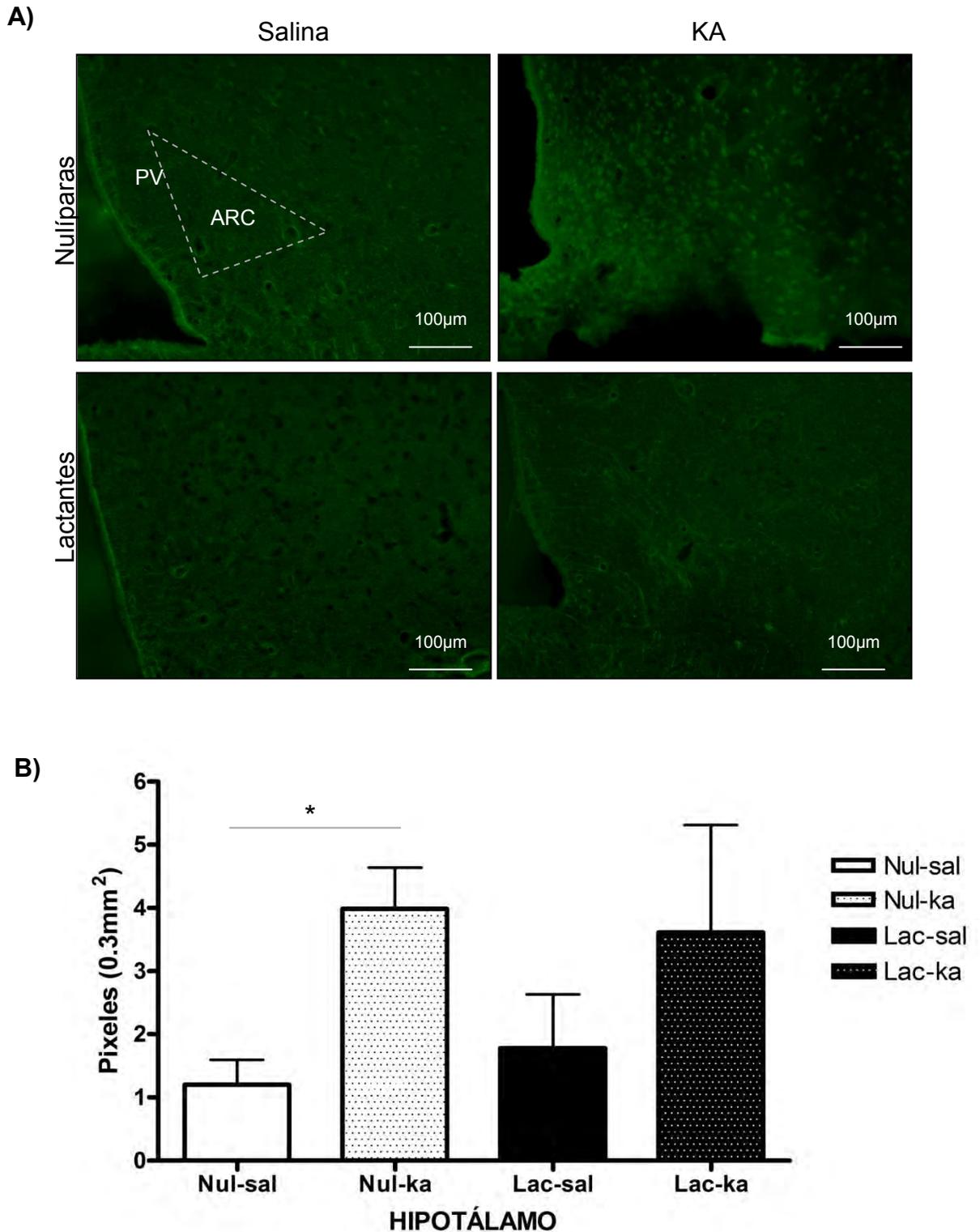
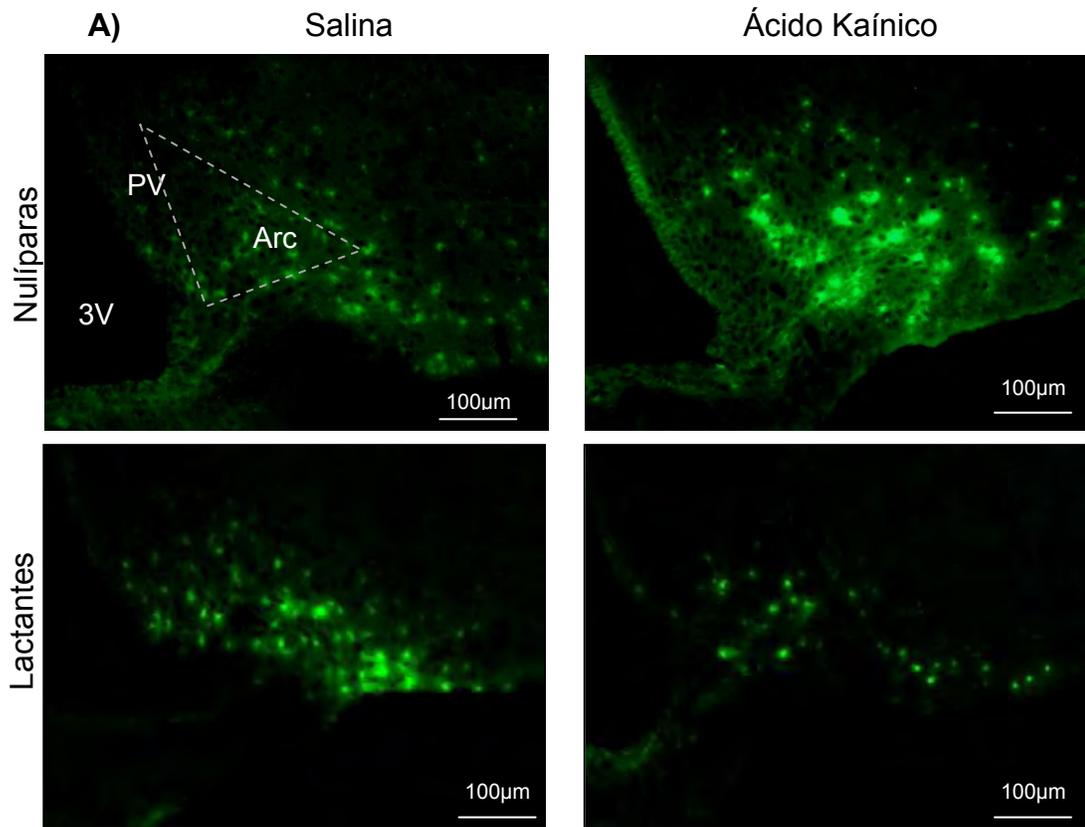


Figura 17. Mediante la técnica de Fluor Jade-C se determinó la proporción de neurodegeneración en el hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA o vehículo y sacrificadas 24 h después. A) Microfotografías de hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes con inyección de KA 7.5 mg/Kg pc ó solución salina ip. B) Histograma del porcentaje de pixeles de fluorescencia del Fluor Jade-C entre el área total. Nul=nulíparas, lac=lactantes, ka: administración ácido kaínico, sal=administración de solución salina. PV: Área periaventricular. 3V: Tercer ventrículo, Arc: Núcleo arcuato (*)=Diferencia significativa $P < 0.05$. La zona punteada indica la región cuantificada (0.03mm^2).

Figura 18. Células apoptóticas (reactivas a TUNEL) en hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA o vehículo y sacrificadas 24 h después. Se muestran microfotografías de hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con inyección de KA 7.5mg/Kgpc ó solución salina ip. nul=nulíparas, lac=lactantes, ka: ácido kaínico, sal=a solución salina.

7.3.3 TUNEL. El método de TUNEL se empleó como indicador de apoptosis en tejido cerebral de ratas nulíparas y lactantes a las que se les administró solución salina ó KA.

- i) *Hipocampo.* Se obtuvieron microfotografías del hipocampo (CA1, CA3, CA4 y GD) en las que se observó una mayor proporción fluoresceína incorporada observada por TUNEL en las ratas a las que se les administró KA; sin embargo no se observan diferencias significativas en el efecto del KA entre ratas nulíparas vs las ratas lactantes (Figura 18).
- ii) *Hipotálamo.* Se obtuvieron microfotografías del hipotálamo y se observó una mayor proporción de marca a fluoresceína (TUNEL) en las ratas a las que recibieron KA, y al comparar las ratas nulíparas con las lactantes estas últimas presentan menos marca a fluoresceína. Además se cuantificó el porcentaje del área que presentó la marca a TUNEL en el núcleo arcuato y la región y se observó un aumento significativo en células positivas a TUNEL en las ratas nulíparas tratadas con KA con respecto a su control, mientras que las ratas lactantes que fueron tratadas con KA no presentan diferencias significativas con su control (Figura 19).



B)

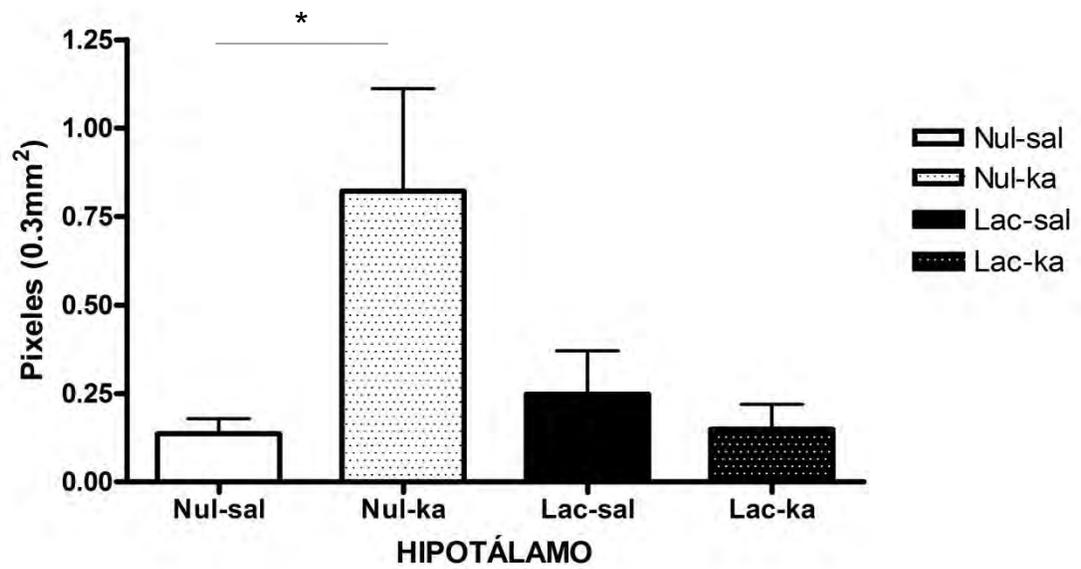


Figura 19. Células apoptóticas (TUNEL) en hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA ó vehículo y sacrificadas 24h después. A) Microfotografías de hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes con inyección de KA 7.5mg/Kgpc ó solución salina ip. B) Histograma del porcentaje de pixeles positivos a la fluorescencia de TUNEL entre el área total. nul=nulíparas, lac=lactantes, ka: administración ácido kaínico, sal=administración de solución salina. PV. Área periaventricular. 3V. Tercer ventrículo, Arc: Núcleo arcuato (*)=Diferencia significativa $p < 0.01$. La zona punteada indica la región que se evaluó (0.03mm^2). PV. Región periventricular. Arc. Núcleo arcuato hipotalámico.

8. DISCUSIÓN.

La plasticidad en el SNC puede ser vista por cambios entre relaciones funcionales en diferentes tipos celulares neuronales y gliales (astrocitos y oligodendrocitos). La GH de manera directa o por medio de IGF-1 afecta al tejido nervioso en aspectos que incluyen la regulación de la proliferación neuronal, el desarrollo y la mielinización; además se le ha atribuido un papel importante en la neuroprotección (Frago et al., 2002). Este efecto se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que la administración de GH disminuye la proporción de células apoptóticas y necróticas en el cerebro (Frago et al., 2002; Delgado-Rubín et al., 2006). Además, se ha demostrado que la GH disminuye el contenido de factores apoptóticos como Bax y Bad aumentando factores de sobrevivencia neuronal como Bcl2 y Akt fosforilada en modelos de daño por isquemia, hipoxia y excitotoxicidad (Frago et al., 2002). Por otra parte, se ha documentado que durante la lactancia se protegen las neuronas del hipocampo dorsal (CA1, CA3, y el hilus del giro dentado) después de inducir daño neuronal por excitotoxicidad debido a la administración sistémica de KA en comparación con ratas nulíparas; mostrándose claramente que durante la lactancia hay una menor susceptibilidad a la degeneración celular por excitotoxicidad inducida por KA (Vanoye-Carlo et al., 2008). Así, se plantea que la neuroprotección producida en la rata lactante podría estar relacionada por los cambios en la GH durante esta etapa, por lo que se estudió si el contenido de GH cambia en hipocampo e hipotálamo debido a la lactancia y al daño excitotóxico producido por KA.

El primer objetivo que se exploró fue el contenido de GH en hipocampo, hipotálamo, suero e hipófisis entre ratas nulíparas y lactantes en condiciones basales por el ensayo de ELISA, mientras que solo para hipocampo e hipotálamo se realizó Western blot e inmunohistoquímica para investigar las variantes de peso molecular y la localización de la GH. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en el contenido de GH de hipotálamo, hipocampo e hipófisis de nulíparas y lactantes; únicamente se observó un aumento del 30% en el contenido de GH en suero de ratas lactantes *versus* las nulíparas, esto es similar a lo reportado por Wehrenberg et al. (1989) quienes observaron que durante la lactancia, el estímulo de succión produce un incremento en

suero de GH de manera rápida y transitoria entre los 9 y 10 días postparto (30 ± 60 min post-succión). En nuestro procedimiento experimental se utilizaron ratas de 19 a 21 días postparto con succión *ad libitum* y se observó que la elevación de la concentración en suero de GH persiste hasta el final de la lactancia como fue el caso de nuestro procedimiento experimental. Es interesante destacar que aún cuando el nivel de GH en el suero de las ratas lactantes está alterado, no lo está en la hipófisis. Escalada et al. (1997) mostró que en ratas lactantes a los 3 y 8 días de lactancia no hay diferencia en el contenido de GH y del ARNm de GH en hipófisis comparado con el de ratas nulíparas; mientras que Grosvenor et al. (1968) reportaron que el estímulo de succión induce una disminución en la concentración de GH de la hipófisis en la rata lactante y que consecuentemente induce un rápido y transitorio incremento de los niveles plasmáticos de GH. Esto sugiere que durante la lactancia se incrementa la tasa de síntesis y liberación de la GH por la adenohipófisis lo que explica sus altos niveles en suero y la falta de diferencia en su concentración en la hipófisis. Sin embargo, aun hacen falta más estudios sobre la regulación de estos procesos durante la lactancia.

Por otra parte, con respecto a la heterogeneidad de la GH en la rata se han reportado múltiples variantes en hipófisis, sangre y orina que han sido resultado de procesamiento alternativo del ARNm, de cortes proteolíticos, de glicosilación, fosforilación y agregación (Farrington y Hymer, 1990). Hasta la fecha no se han explorado las variantes de peso molecular de GH en hipocampo e hipotálamo de rata; este es el primer estudio que detecta dichas isoformas; en hipocampo, se detectaron variantes de 7, 14, 26, 29, 32, 52, 78 kDa entre otras en ambos grupos (nulíparas y lactantes), mientras que para el hipotálamo se obtuvieron variantes de 7, 14, 26, 29, 32, 52, 78 kDa en mayor proporción en ambos grupos sin observar diferencias significativas entre nulíparas y lactantes. En el hipocampo parece haber más de la de 70 y de 7 kDa. Las variantes de 7 y 14 kDa pudieran provenir de cortes proteolíticos de la forma monomérica clásica (26 kDa) y corresponderían al fragmento amino- y carboxilo-terminal de la molécula respectivamente (Farrington y Hymer, 1990; De Palo et al., 2006). En la circulación del se han descrito GHs de 5 kDa y de 17 kDa que corresponden a los fragmentos 1- 43 y del 44-191 respectivamente (De Palo et al., 2006). Por otra parte, bajo condiciones reductores la isoforma de 26kDa corresponde a

la GH de 191 aminoácidos, es la variante monomérica clásica de la GH que es la más abundante en la circulación y en la hipófisis (más del 90% del total de GH). A pesar de ser la isoforma mayoritaria en la hipófisis, en el hipocampo y en las variantes prominentes fueron las de 58 y 72 kDa. Estas variantes de 52 y 78 kDa corresponden posiblemente a dímeros o trímeros de la forma monomérica de 26 kDa resistentes a las condiciones reductoras que han sido reportado con anterioridad en la GH y en el lactógeno placentario (Silverlight et al., 1985). También encontramos una variante de 29 kDa que podría ser la isoforma glucosilada previamente descrita en hipófisis del humano, la rata, el ratón, el pollo, el cerdo y el búfalo y que se sabe tiene bajos niveles en la hipófisis de hembras lactantes con respecto a la de las nulíparas (Sinha y Jacobsen, 1987). Todas estas variantes estuvieron presentes en el hipocampo y el hipotálamo de ratas lactantes y nulíparas y su concentración no mostró diferencias entre ambos grupos. Estos resultados abren a la posibilidad de que ninguna de las isoformas de GH se modifique en la lactancia al compararla con ratas nulíparas y que estas además no se modifiquen por la presencia de un daño excitotóxico.

Por último, debido a que las determinaciones realizadas por ELISA y *Western blot* se incluyeron a todo el hipocampo o el hipotálamo evaluamos por inmunohistoquímica la distribución de las células positivas para GH en ambas regiones del cerebro. En el hipocampo, se observó una disminución de células positivas en CA4 de alrededor del 20 % ($P < 0.05$) y un aumento de células positivas para GH del 65 % en giro dentado ($P < 0.01$) de las ratas lactantes con respecto a las ratas nulíparas; es posible que estas diferencias compensen el contenido total de GH hipocampal por lo que no se observan diferencias por otros métodos empleados (*Western blot* y ELISA); CA1 y CA3 no presentaron diferencias significativas (Figura 6).

Por otra parte en el hipotálamo, el núcleo arcuato y la región periventricular son las regiones que presentaron mayor inmunoreactividad al Ab- α rGH que otras regiones hipotalámicas; al cuantificar el número de células inmunoreactivas al Ab- α rGH en ratas nulíparas y lactantes al igual que por ELISA y *Western blot* no se observan cambios significativos entre los grupos en esta región. Uno de los sitios más comunes donde la GH actúa son sus receptores específicos localizados en las neuronas de somatostatina en el núcleo periventricular para incrementar la secreción de

somatostatina en el sistema porta-hipofisiario e indirectamente suprimir la secreción de GHRH del núcleo arcuato y su misma secreción (Bluet-Pajot et al., 1998; Veldhuis et al., 2001); los receptores a PRL donde se sabe que también se puede unir la GH están localizados principalmente en las neuronas dopaminérgicas (D2) del núcleo arcuato regulando la secreción de D2 al sistema porta-hipofisiario (Freeman et al., 2000). Dado que encontramos inmunoreactividad del Ab- α GH específicamente en la zona periventricular del hipotálamo y núcleo arcuato creemos que posiblemente se está uniendo a los receptores en grandes cantidades para controlar la liberación de GH y PRL en las ratas lactantes.

El siguiente objetivo de este trabajo fue determinar el contenido y localización hipocámpica e hipotalámica de la GH en ratas nulíparas y madres lactantes tratadas con KA. Como se mencionó anteriormente el KA es un agonista glutamatérgico que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno, altera la función mitocondrial e induce muerte neuronal por apoptosis y necrosis (Wang et al., 2005). Al cuantificar el contenido de GH en hipotálamo, hipocampo, suero e hipófisis después de 24 h de la inyección única de KA (7.5 mg/Kg pc) observamos al igual que en condiciones basales un incremento de GH plasmática en ratas lactantes versus las nulíparas a las que se les trató con KA, este aumento fue más evidente (del 58% de lactantes en comparación con las nulíparas) que el observado para las ratas que no recibieron daño excitotóxico; lo que hace posible que se esté liberando más GH sistémica para compensar el daño solo en las ratas lactantes; si bien no se observa un aumento en el contenido de GH hipofisaria en las ratas lactantes es posible que sintetice en mayor cantidad y que además aumente la tasa de liberación a partir del daño excitotóxico por lo que no observamos diferencias significativas en el contenido de GH en hipófisis de ratas nulíparas con respecto a ratas lactantes (anexo).

Conjuntamente observamos un aumento significativo en el contenido de GH en hipocampo de ratas lactantes con respecto a las nulíparas a las que se les administró KA. Uno de los trabajos publicados por Sheepens et al. (1999) mostró que tres días después del daño neuronal inducido por hipoxia, se incrementa el contenido de GHR/BP en varias regiones del SNC incluyendo el hipocampo con respecto a ratas que no fueron sometidos al daño. Esto sugiere que no sólo en condiciones de falta de

oxígeno y nutrientes como es la hipoxia se presenta este incremento en el contenido de GH si no que también en nuestra condición de daño por excitotoxicidad durante la lactancia. Como se puede observar en nuestros datos la GH sólo responde aumentando su contenido en ratas lactantes que recibieron el daño y no en las ratas vírgenes lo que sugiere la posibilidad de que sea dependiente al estado reproductivo y que a su vez restaura o protege el SNC de esta forma sistémica después de un daño neurológico (Sheepens, 1999). Existe una gran controversia de si la GH cruza la barrera hematoencefálica (BBB) debido a su gran tamaño; estudios pioneros en este ámbito mostraron que el tratamiento de hGH en adultos deficientes de esta hormona incrementa la concentración de GH en el líquido cefalorraquídeo (Johansson et al., 1996) lo cual sugiere que la GH está pasando la BBB en presencia de grandes cantidades de GH circulante, en este trabajo también observamos una concentración de GH plasmática alta en las madres lactantes (con o sin daño excitotóxico) lo que sugiere la posibilidad de que la GH este cruzando la BBB. Se ha documentado el cruce de la GH a través de la BBB marcando radioactivamente a la GH, se observó un flujo mínimo pero considerable ($0.44 \mu\text{l} / \text{g} / \text{min}$) (Pan et al., 2005); por otra parte existe la teoría de que la alta concentración de receptores en los plexos coroides (Lai et al., 1991) podrían sugerir que la GH esté pasando por la barrera hematoencefálica y tener a estos receptores como transportadores hacia el cerebro. Trabajos más recientes han demostrado que además del paso de la GH por la BBB también se carece de un efecto modulador al exceso de GH periférica sugiriendo que la penetración de GH a través de la BBB no involucra transporte selectivo aunque no ha sido demostrado por completo este hecho (Pan et al., 2005). No obstante del paso de la GH circulante propuesto por Johansson et al. (1996), se ha propuesto el aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica después de un daño excitotóxico en el hipocampo y en el hipotálamo probablemente debido a acciones sobre los astrocitos y las células endoteliales que receptores a glutamato (Chen et al., 1999; Wang et al., 2005) lo que permitiría el ingreso de la GH circulante al cerebro.

Al cuantificar las células inmunoreactivas al Ab- α rGH del hipocampo en grupo de ratas nulíparas y lactantes no se observó lo mismo que encontramos en la cuantificación por

ELISA, ya que no se observaron diferencias significativas entre grupos, si bien, existe la misma disminución en el GD los datos no son significativos; es posible que esta técnica no nos permita ver las diferencias entre los grupos.

Como mencioné con anterioridad trabajos realizados por Lai et al. (1991) en humanos mostraron que las regiones cerebrales con una densidad de unión mayor a GH fueron hipocampo, hipotálamo e hipófisis de hembras y machos, trabajos posteriores de este mismo grupo mostraron que las hembras presentaron relativamente mayor unión de hGH y esto se debió principalmente a la unión de esta hormona al receptor de PRL cerebral por lo cual ellos atribuyen esto al aumento de unión de GH en el cerebro de hembras (Lai et al., 1991). Esta evidencia plantea la posibilidad de que la GH no solo este actuando a nivel de sus receptores en estas regiones si no que también a través de los receptores a PRL (PRLR no en roedores). Se ha demostrado que GH exógena mimetiza la acción de la PRL en el comportamiento materno y que puede estar dado por la reactividad cruzada con los PRLR (Bridges y Millard, 1988); además se ha publicado recientemente que la PRL tiene un efecto neuroprotector después de inyecciones por 4 días de PRL a dosis farmacológicas minimizando el daño celular inducido por KA en el hipocampo de ratas hembras ovariectomizadas (OVX) (Tejadilla et al., 2010),

Por otra parte, dado que encontramos inmunoreactividad del Ab- α GH en la zona periventricular del hipotálamo y núcleo arcuato creemos que posiblemente se está uniendo a los receptores para controlar la liberación de GH y PRL en las ratas lactantes y nulíparas, por lo que no observamos diferencias significativas al inducir la excitotoxicidad por KA.

La última parte del proyecto consistió en observar el daño neuronal en los tejidos morfológicamente por la técnica de NISSL, daño neuronal por Fluorojade C y apoptosis por la técnica de TUNEL. A pesar de que ya ha sido bien establecido el daño excitotóxico producido durante la inyección de ip. KA a una concentración de 7.5 mg/Kg pc y la neuroprotección que ocurre en el hipocampo de la madre lactante (Vayone-Carlo et al., 2008; Cabrera et al., 2009) fue necesario determinar el daño excitotóxico producido por el KA en nuestros tejidos y principalmente en el hipotálamo el cual no había sido determinado con anterioridad.

Los datos presentados en esta tesis muestran que durante la lactancia el hipocampo dorsal y la región periventricular y el núcleo arcuato hipotalámico de la madre lactante son protegidas del daño celular causado por la administración sistémica de KA comparadas con ratas vírgenes evaluadas. Se ha reportado que los diferentes métodos de administración de KA pueden inducir diferentes patrones de excitación neuronal, por ejemplo, se sabe que en la inyección ip. de KA a ratas causa una vulnerabilidad selectiva hipocampal, es decir, que las neuronas piramidales de CA3, hilus del giro dentado y CA1 son más sensibles al daño por KA, (Grooms et al., 2000; Vayone-Carlo et al., 2008) mientras que en el GD las células granulares muestran resistencia a este daño excitotóxico (Grooms et al., 2000); las bases moleculares para esta susceptibilidad diferencial aun no ha sido bien definidas, sin embargo un factor importante puede ser resultado de los altos niveles de receptores a kainato en esta región (Malva et al., 1998).

El daño neuronal fue evaluado morfológicamente con la tinción de NISSL en la cual no observamos diferencias claras entre los grupos experimentales con base a sus características morfológicas de las células piramidales, ni cambios en la organización estructural neuronal después del tratamiento, es posible que el daño presentado por la inyección de KA no esté teniendo efectos morfológicos inmediatos visibles en la ventana de tiempo en que se sacrificaron los animales (24 h después de la inyección) o bien en la dosis que se aplicó de KA (7.5mg/Kg pc), ya que se han reportado cambios morfológicos después de 3 días de tratamiento con KA (Wang et al., 2005).

Posteriormente se realizó la técnica de Fluor Jade-C y TUNEL dado que se ha observado necrosis y apoptosis en el hipocampo después de 1 a 3 días de inyección intraperitoneal de KA (Nishiyama et al., 1996). Basada en su naturaleza polianiónica Fluor Jade-C puede unirse a moléculas con múltiples cargas positivas tales como las poliaminas, preferencialmente a espermidina, putrescina y cadaverina lo que le proporciona una alta sensibilidad y especificidad de unión para neuronas degeneradas (Schmued y Hopkins, 2000). El daño neuronal (Fluor Jade-C) en hipocampo de las ratas nullíparas fue mayor que en las ratas lactantes al igual que lo reportado por Vanoye-Carlo et al. (2008) por lo que no se cuantificaron las células positivas a la fluoresceína de Fluor Jade-C en esta región; para el caso del hipotálamo si se cuantificó

dado que no se ha reportado con anterioridad y se observó el mismo efecto, las ratas nulíparas con administración de KA que presentaron una mayor marca positiva a fluoresceína para daño celular (Fluor Jade-C) que las ratas lactantes a las que se les administró KA.

Para observar la muerte por apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL, la cual identifica células apoptóticas por el marcaje de DNA fragmentado que es típico de la apoptosis. En el hipocampo no se observó una marca abundante a apoptosis tanto en ratas nulíparas como en lactantes al inducir el daño excitotóxico; con anterioridad Vanoye-Carlo et al. (2008) publicaron que existen pocas células positivas a apoptosis en hipocampo frente a un daño excitotóxico por KA, por lo que es posible que en nuestras microfotografías no fue posible visualizarlas.

Por último, en el hipotálamo se observó un aumento significativo de células apoptóticas principalmente en el núcleo arcuato y parte de la región periventricular en ratas nulíparas con daño, mientras que las ratas lactantes presentaron una resistencia al daño. Trabajos realizados por Delgado-Rubín et al. (2006) muestran que mediante inyecciones periféricas de glutamato monosódico (MGM) para inducir daño excitotóxico al igual que el KA se produce daño importante en el tejido neuronal de hipotálamo observado por TUNEL y Fluor Jade-B y que administraciones periféricas de hGH recombinante tienen un efecto neuroprotector disminuyendo la apoptosis, si bien durante la lactancia y al inducir un daño excitotóxico por KA a ratas lactantes la GH periférica y no la local está en concentraciones más altas que en condiciones basales es posible que esta GH periférica pueda tener efecto sobre el hipotálamo disminuyendo la apoptosis observada en estos tejidos.

9. CONCLUSIONES

- (i) La GH se encuentra presente en hipocampo e hipotálamo tanto en ratas nulíparas como en lactantes.
- (ii) La GH en hipocampo e hipotálamo muestra un patrón de heterogeneidad molecular donde las variantes mayoritarias son de 52 y 72 kDa.
- (iii) Los niveles de GH en hipófisis e hipotálamo no se modifican, sin embargo la plasmática aumenta durante la lactancia y fue mayor después del daño con KA.
- (iv) En condiciones de lactancia con daño excitotóxico el contenido de GH aumenta con respecto a las nulíparas que también fueron tratadas con KA.

10. REFERENCIAS

Abbud R, Hoffman GE, Smith MS. 1994. Lactation-induced deficits in NMDA receptor-mediated cortical and hippocampal activation: changes in NMDA receptor gene expression and brainstem activation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 25: 323-332.

Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J. 2006. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal.* 6: 53-80.

Aramburo C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S, Sanchez R. 1990. Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): different bioactivities of cGH charge variants. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80: 59-67.

Aramburo C, Luna M, Carranza M, Reyes M, Martinez-Coria H, Scanes CG. 2000. Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 67-74.

Baker NL, Carlo R, V, Bernard O, D'Ercole AJ, Werther GA. 1999. Interactions between bcl-2 and the IGF system control apoptosis in the developing mouse brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 118: 109-118.

Bamberger AM, Bamberger CM, Pu LP, Puy LA, Loh YP, Asa SL. 1995. Expression of pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 80: 2021-2026.

Baumann G, Maheshwari H. 1997. The Dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *Acta Paediatr. Suppl* 423: 33-38.

Ben-Ari Y, 2008. Epilepsies and neuronal plasticity: for better or for worse? *Dialogues. Clin. Neurosci.* 10: 17-27.

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

Berzaghi MP, Amado D, Cavalheiro EA. 1987. Pregnancy decreases the frequency of spontaneous recurrent seizures in rats with kainic acid lesions of the hippocampus. *Epilepsy Res.* 1: 142-144.

Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Gourdji D, Hammond C, Kordon C. 1998. Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cell Mol. Neurobiol.* 18: 101-123.

Bodner M, Karin M. 1987. A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell* 50: 267-275.

Borasio GD, John J, Wittinghofer A, Barde YA, Sendtner M, Heumann R. 1989. ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons. *Neuron* 2: 1087-1096.

Braga MF, Aroniadou-Anderjaska V, Xie J, Li H. 2003. Bidirectional modulation of GABA release by presynaptic glutamate receptor 5 kainate receptors in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 23: 442-452.

Bridges RS, Millard WJ. 1988. Growth hormone is secreted by ectopic pituitary grafts and stimulates maternal behavior in rats. *Horm. Behav.* 22: 194-206.

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

Carter-Su C, Stubbart JR, Wang XY, Stred SE, Argetsinger LS, Shafer JA. 1989. Phosphorylation of highly purified growth hormone receptors by a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 264: 18654-18661.

Carter-Su C, King AP, Argetsinger LS, Smit LS, Vanderkuur J, Campbell GS. 1996. Signalling pathway of GH. *Endocr. J.* 43 Suppl: S65-S70.

Catanzaro DF, West BL, Baxter JD, Reudelhuber TL. 1987. A pituitary-specific factor interacts with an upstream promotor element in the rat growth hormone gene. *Mol. Endocrinol.* 1: 90-96.

Chen ZL, Indyk JA, Bugge TH, Kombrinck KW, Degen JL, Strickland S. 1999. Neuronal death and blood-brain barrier breakdown after excitotoxic injury are independent processes. *J. Neurosci.* 19: 9813-9820.

Choi DW. 1992. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23: 1261-1276.

De Palo EF, De F, V, Gatti R, Spinella P. 2006. Growth hormone isoforms and segments/fragments: molecular structure and laboratory measurement. *Clin. Chim. Acta* 364: 67-76.

Delgado-Rubin de CA, Chowen JA, Argente J, Frago LM. 2006. Growth hormone releasing peptide-6 acts as a survival factor in glutamate-induced excitotoxicity. *J. Neurochem.* 99: 839-849.

Devesa J, Lima L, Tresguerres JA. 1992. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol. Metab* 3: 175-183.

Dinkel K, MacPherson A, Sapolsky RM. 2003. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J. Neurochem.* 84: 705-716.

Escalada J, Sanchez-Franco F, Velasco B, Cacicedo L. 1997. Regulation of growth hormone (GH) gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of insulin-like growth factor-I, somatostatin, and GH-releasing hormone. *Endocrinology* 138: 3435-3443.

Farrington M, Hymer WC. 1990. Growth hormone aggregates in the rat adenohypophysis. *Endocrinology* 126: 1630-1638.

Fizman Mónica L. Neuroprotección y factores neurotróficos. Revista Neurológica Argentina 2003; 28: 6-10

Frago LM, Paneda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente J, Chowen JA. 2002. Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. Endocrinology 143: 4113-4122.

Frankenne F, Rentier-Delrue F, Scippo ML, Martial J, Hennen G. 1987. Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. J. Clin. Endocrinol. Metab 64: 635-637.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol Rev. 80: 1523-1631.

Frerking M, Nicoll RA. 2000. Synaptic kainate receptors. Curr. Opin. Neurobiol. 10: 342-351.

Gaiddon C, Tian J, Loeffler JP, Bancroft C. 1996. Constitutively active G(S) α -subunits stimulate Pit-1 promoter activity via a protein kinase A-mediated pathway acting through deoxyribonucleic acid binding sites both for Pit-1 and for adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein. Endocrinology 137: 1286-1291.

Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H. 1995. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca^{2+} permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. Neuron 15: 193-204.

Goffin V, Kelly PA. 1997. The prolactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. 2: 7-17.

Goldin M, Epsztein J, Jorquera I, Represa A, Ben-Ari Y, Crepel V, Cossart R. 2007. Synaptic kainate receptors tune oriens-lacunosum moleculare interneurons to operate at theta frequency. J. Neurosci. 27: 9560-9572.

Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. 1996. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid β -peptide toxicity in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 66: 1836-1844.

Gorter JA, Petrozzino JJ, Aronica EM, Rosenbaum DM, Opitz T, Bennett MV, Connor JA, Zukin RS. 1997. Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca^{2+} influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J. Neurosci.* 17: 6179-6188.

Grooms SY, Opitz T, Bennett MV, Zukin RS. 2000. Status epilepticus decreases glutamate receptor 2 mRNA and protein expression in hippocampal pyramidal cells before neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97: 3631-3636.

Grosvenor CE, Krulich L, McCann SM. 1968. Depletion of pituitary concentration of growth hormone as a result of suckling in the lactating rat. *Endocrinology* 82: 617-619.

Gustafson K, Hagberg H, Bengtsson BA, Brantsing C, Isgaard J. 1999. Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr. Res.* 45: 318-323.

Hadsell DL, Torres DT, Lawrence NA, George J, Parlow AF, Lee AV, Fiorotto ML, 2005. Overexpression of des(1-3) insulin-like growth factor 1 in the mammary glands of transgenic mice delays the loss of milk production with prolonged lactation. *Biol. Reprod.* 73: 1116-1125.

Hadsell DL, Parlow AF, Torres D, George J, Olea W. 2008. Enhancement of maternal lactation performance during prolonged lactation in the mouse by mouse GH and long-R3-IGF-I is linked to changes in mammary signaling and gene expression. *J. Endocrinol.* 198: 61-70.

Harvey S, Lavelin I, Pines M. 2001. Growth hormone (GH) action in early embryogenesis: expression of a GH-response gene in sites of GH production and action. *Anat. Embryol. (Berl)* 204: 503-510.

Harvey S, Lavelin I, Pines M. 2002. Growth hormone (GH) action in the brain: neural expression of a GH-response gene. *J. Mol. Neurosci.* 18: 89-95.

Harvey S, Kakebeeke M, Murphy AE, Sanders EJ. 2003. Growth hormone in the nervous system: autocrine or paracrine roles in retinal function? *Can. J. Physiol Pharmacol.* 81: 371-384.

Hatton GI, Zhao YQ. 2002. Peripartum interneuronal coupling in the supraoptic nucleus. *Brain Res.* 932: 120-123.

Hoffman GE, Merchenthaler I, Zup SL. 2006. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine.* 29: 217-231.

Hojvat S, Baker G, Kirsteins L, Lawrence AM. 1982. Growth hormone (GH) immunoreactivity in the rodent and primate CNS: distribution, characterization and presence posthypophysectomy. *Brain Res.* 239: 543-557.

Houston B, Goddard C, 1988. Molecular forms of growth hormone in the chicken pituitary gland. *J. Endocrinol.* 116: 35-41.

Huttner A, Adams EF, Buchfelder M, Fahlbusch R. 1994. Growth hormone gene structure in human pituitary somatotrophinomas: promoter region sequence and methylation studies. *J. Mol. Endocrinol.* 12: 167-172.

Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. 2004. Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 90: 913-919.

Isgaard J, Aberg D, Nilsson M. 2007. Protective and regenerative effects of the GH/IGF-I axis on the brain. *Minerva Endocrinol.* 32: 103-113.

Jaskolski F, Normand E, Mulle C, Coussen F. 2005. Differential trafficking of GluR7 kainate receptor subunit splice variants. *J. Biol. Chem.* 280: 22968-22976.

Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC, Kelly PA, Baixeras E. 2002. Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188: 1-7.

Johansson JO, Oscarsson J, Bjarnason R, Bengtsson BA. 1996. Two weeks of daily injections and continuous infusion of recombinant human growth hormone (GH) in GH-deficient adults: I. Effects on insulin-like growth factor-I (IGF-I), GH and IGF binding proteins, and glucose homeostasis. *Metabolism* 45: 362-369.

Keyser-Marcus L, Stafisso-Sandoz G, Gerecke K, Jasnow A, Nightingale L, Lambert KG, Gatewood J, Kinsley CH. 2001. Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. *Brain Res. Bull.* 55: 737-745.

Kim K, Sanno N, Arai K, Takano K, Yasufuku-Takano J, Teramoto A, Shibasaki T. 2003. Ghrelin mRNA and GH secretagogue receptor mRNA in human GH-producing pituitary adenomas is affected by mutations in the α subunit of G protein. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 59: 630-636.

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

Kinsley CH, Trainer R, Stafisso-Sandoz G, Quadros P, Marcus LK, Hearon C, Meyer EA, Hester N, Morgan M, Kozub FJ, Lambert KG. 2006. Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm. Behav.* 49: 131-142

Kumar V, Biswas DK. 1988. Dynamic state of site-specific DNA methylation concurrent to altered prolactin and growth hormone gene expression in the pituitary gland of pregnant and lactating rats. *J. Biol. Chem.* 263: 12645-12652.

Kyle CV, Evans MC, Odell WD. 1981. Growth hormone-like material in normal human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 53: 1138-1144.

Lai ZN, Emtner M, Roos P, Nyberg F. 1991. Characterization of putative growth hormone receptors in human choroid plexus. *Brain Res.* 546: 222-226.

Lechan RM, Nestler JL, Molitch ME. 1981. Immunohistochemical identification of a novel substance with human growth hormone-like immunoreactivity in rat brain. *Endocrinology* 109: 1950-1962.

Lechan RM, Molitch ME, Jackson IM. 1983. Distribution of immunoreactive human growth hormone-like material and thyrotropin-releasing hormone in the rat central nervous system: evidence for their coexistence in the same neurons. *Endocrinology* 112: 877-884.

Lemaigre FP, Courtois SJ, Durviaux SM, Egan CJ, LaFontaine DA, Rousseau GG. 1989. Analysis of cis- and trans-acting elements in the hormone-sensitive human somatotropin gene promoter. *J. Steroid Biochem.* 34: 79-83.

Liebhaber SA, Ray J, Cooke NE. 1986. Synthesis of growth hormone-prolactin chimeric proteins and processing mutants by the exchange and deletion of genomic exons. *J. Biol. Chem.* 261: 14301-14306.

Lipkin SM, Naar AM, Kalla KA, Sack RA, Rosenfeld MG. 1993. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. *Genes Dev.* 7: 1674-1687.

Lobie PE, Garcia-Aragon J, Lincoln DT, Barnard R, Wilcox JN, Waters MJ. 1993. Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 74: 225-233.

Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, Aramburo C. 2005. Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp Endocrinol.* 144: 28-37.

Mahanty NK, Sah P. 1998. Calcium-permeable AMPA receptors mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. *Nature* 394: 683-687.

Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM. 1998. Kainate receptors in hippocampal CA3 subregion: evidence for a role in regulating neurotransmitter release. *Neurochem. Int.* 32: 1-6.

Mellon SH, Griffin LD. 2002. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol. Metab* 13: 35-43.

Modney BK, Hatton GI. 1994. Maternal behaviors: evidence that they feed back to alter brain morphology and function. *Acta Paediatr. Suppl* 397: 29-32.

Mustafa A, Bogdanovic N, Nyberg F, Suliman I, Islam A, Roos P, Winblad B, Adem A. 1995. Effects of long-term ovariectomy and ovarian steroids on somatogenic binding sites in rat brain and liver. *Neurosci. Lett.* 194: 193-196.

Nelson JT, Rosenzweig N, Nilsen-Hamilton M. 1995. Characterization of the mitogen-regulated protein (proliferin) receptor. *Endocrinology* 136: 283-288.

Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 7: 49-66.

Nishiyama K, Kwak S, Takekoshi S, Watanabe K, Kanazawa I. 1996. In situ nick end-labeling detects necrosis of hippocampal pyramidal cells induced by kainic acid. *Neurosci. Lett.* 212: 139-142.

Noguchi T, Sugisaki T, Watanabe M, Kohsaka S, Tsukada Y. 1982. Effects of bovine growth hormone on the retarded cerebral development induced by neonatal hydrocortisone intoxication. *J. Neurochem.* 38: 246-256.

Noteborn HP, van Balen PP, van der Gugten AA, Hart IC, Ebels I, Salemink CA. 1993. Presence of immunoreactive growth hormone and prolactin in the ovine pineal gland. *J. Pineal Res.* 14: 11-22.

Nyberg F. 2000. Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. *Front Neuroendocrinol.* 21: 330-348.

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

Pan W, Yu Y, Cain CM, Nyberg F, Couraud PO, Kastin AJ. 2005. Permeation of growth hormone across the blood-brain barrier. *Endocrinology* 146: 4898-4904.

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

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

Pawluski JL, Lieblich SE, Galea LA. 2009. Offspring-exposure reduces depressive-like behaviour in the parturient female rat. *Behav. Brain Res.* 197: 55-61.

Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A. 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J. Neurosci. Methods* 13: 139-143.

Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS. 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* 20: 464-470.

Peng PL, Zhong X, Tu W, Soundarapandian MM, Molner P, Zhu D, Lau L, Liu S, Liu F, Lu Y. 2006. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron* 49: 719-733.

Petrovic M, Horak M, Sedlacek M, Vyklicky L, Jr. 2005. Physiology and pathology of NMDA receptors. *Prague. Med. Rep.* 106: 113-136.

Ramesh R, Kuenzel WJ, Proudman JA. 2001. Increased proliferative activity and programmed cellular death in the turkey hen pituitary gland following interruption of incubation behavior. *Biol. Reprod.* 64: 611-618.

Ray J, Okamura H, Kelly PA, Liebhaber SA, Cooke NE. 1990. Alteration in the receptor binding specificity of human growth hormone by genomic exon exchange. *Mol. Endocrinol.* 4: 101-107.

Render CL, Hull KL, Harvey S. 1995. Neural expression of the pituitary GH gene. *J. Endocrinol.* 147: 413-422.

Roy M, Sapolsky RM. 2003. The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. *Neuroendocrinology* 77: 24-31.

Roy B, Fujimoto N, Ito A. 1990. Growth-promoting effect of retinoic acid in transplantable pituitary tumor of rat. *Jpn. J. Cancer Res.* 81: 878-883.

Sawchenko PE, Arias C, Bittencourt JC. 1990. Inhibin beta, somatostatin, and enkephalin immunoreactivities coexist in caudal medullary neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Comp Neurol.* 291: 269-280.

Scanes CG, Peterla TA, Campbell RM. 1994. Influence of adenosine or adrenergic agonists on growth hormone stimulated lipolysis by chicken adipose tissue in vitro. *Comp Biochem. Physiol Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 107: 243-248.

Schaufele F, West BL, Reudelhuber TL. 1990. Overlapping Pit-1 and Sp1 binding sites are both essential to full rat growth hormone gene promoter activity despite mutually exclusive Pit-1 and Sp1 binding. *J. Biol. Chem.* 265: 17189-17196.

Scheepens A, Williams CE, Breier BH, Guan J, Gluckman PD. 2000. A role for the somatotrophic axis in neural development, injury and disease. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab* 13 Suppl 6: 1483-1491.

Scheepens A, Sirimanne E, Beilharz E, Breier BH, Waters MJ, Gluckman PD, Williams CE. 1999. Alterations in the neural growth hormone axis following hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 68: 88-100.

Schmued LC, Hopkins KJ. 2000. Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. *Toxicol. Pathol.* 28: 91-99.

Schneider HJ, Pagotto U, Stalla GK. 2003. Central effects of the somatotrophic system. *Eur. J. Endocrinol.* 149: 377-392.

Sharp ZD. 1995. Rat Pit-1 stimulates transcription in vitro by influencing pre-initiation complex assembly. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 40-45.

Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, Jee YH, Kim J, Bae SR, Chang YP. 2004. Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci. Lett.* 354: 64-68.

Silverlight JJ, Pryor-Jones RA, Jenkins JS. 1985. Growth hormone in normal female rat plasma appears on gel filtration as a large molecular weight form. *Life Sci.* 36: 1927-1932.

Sinha YN, Jacobsen BP. 1987. Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 1368-1375.

Sjöholm A, Zhang Q, Welsh N, Hansson A, Larsson O, Tally M, Berggren PO. 2000. Rapid Ca²⁺ influx and diacylglycerol synthesis in growth hormone-mediated islet beta-cell mitogenesis. *J Biol Chem.* Jul 14;275(28):21033-40.

Standley CA. 1999. N-methyl-D-aspartate receptor binding is altered and seizure potential reduced in pregnant rats. *Brain Res.* 844: 10-19.

Stevens D, Alexander G. 1986. Lipid deposition after hypophysectomy and growth hormone treatment in the sheep fetus. *J. Dev. Physiol* 8: 139-145.

Stoffel-Wagner B. 2003. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007: 64-78.

Strobl JS, Dannies PS, Thompson EB, 1986. Rat growth hormone gene expression is correlated with an unmethylated CGCG sequence near the transcription initiation site. *Biochemistry* 25: 3640-3648.

Tamatani M, Ogawa S, Nuñez G, Tohyama M, 1998. Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide. *Cell Death Differ.* 5: 911-919.

Tejadilla D, Cerbon M, Morales T. 2010. Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience* 169: 1178-1185.

Theodosios DT, Poulain DA. 2001. Maternity leads to morphological synaptic plasticity in the oxytocin system. *Prog. Brain Res.* 133: 49-58.

Tomita S, Byrd RK, Rouach N, Bellone C, Venegas A, O'Brien JL, Kim KS, Olsen O, Nicoll RA, Brecht DS. 2007. AMPA receptors and stargazin-like transmembrane AMPA receptor-regulatory proteins mediate hippocampal kainate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104: 18784-18788.

Tomizawa K, Iga N, Lu YF, Moriwaki A, Matsushita M, Li ST, Miyamoto O, Itano T, Matsui H. 2003. Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. *Nat. Neurosci.* 6: 384-390.

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

Vincent P, Mulle C. 2009. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158: 309-323.

Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY. 2005. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 31: 3-16.

Wehrenberg WB, Gaillard RC. 1989. Neuroendocrine mechanisms regulating growth hormone and prolactin secretion during lactation. *Endocrinology* 124: 464-467.

Weigent DA, Blalock JE. 1991. The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell Immunol.* 135: 55-65.

Yoshizato H, Fujikawa T, Soya H, Tanaka M, Nakashima K. 1998. The growth hormone (GH) gene is expressed in the lateral hypothalamus: enhancement by GH-releasing hormone and repression by restraint stress. *Endocrinology* 139: 2545-2551.

Zhang X, Le Gal La SG, Ridoux V, Yu PH, Ju G. 1997. Prevention of kainic acid-induced limbic seizures and Fos expression by the GABA-A receptor agonist muscimol. *Eur. J. Neurosci.* 9: 29-40.

11. LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Distribución de GH en el SNC	6
Figura 2. Grupos experimentales y procedimientos utilizados	20
Figura 3. Contenido de rGH en hipocampo, hipotálamo, suero e hipófisis de ratas nulíparas y lactantes.....	26
Figura 4. Variantes moleculares de GH en hipocampo.....	28
Figura 5. Variantes moleculares de GH en el hipotálamo.....	30
Figura 6. Inmunohistoquímica para rGH en el hipocampo de ratas nulíparas y lactantes.....	32
Figura 7. Inmunohistoquímica para rGH de ratas nulíparas y lactantes en hipocampo.....	33
Figura 8. Inmunohistoquímica para rGH en el hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes.....	34
Figura 9. Contenido de rGH en hipocampo, hipotálamo, hipófisis y suero en ratas nulíparas y lactantes con administración i.p. de KA y sacrificadas 24 h después.....	35
Figura 10. Variantes moleculares de GH en el hipocampo de ratas tratadas con KA.....	37
Figura 11. Variantes moleculares de GH en el hipocampo de ratas tratadas con KA.....	39
Figura 12. Inmunohistoquímica para rGH en el hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA.....	41
Figura 13. Inmunohistoquímica de hipocampo para rGH de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA y sacrificadas 24 h después.....	42
Figura 14. Inmunohistoquímica para rGH en el hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA y sacrificadas 24 h después.....	43
Figura 15. Tinción de Nissl en hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA o vehículo y sacrificadas 24 h después.....	45

Figura 16. Daño celular (indicado por la marca de Fluor Jade-C) en el hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA o vehículo y sacrificadas 24 h después.....	46
Figura 17. Mediante la técnica de Fluor Jade-C se determinó la proporción de neurodegeneración en el hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA o vehículo y sacrificadas 24 h después.....	47
Figura 18. Células apoptóticas (reactivas a TUNEL) en hipocampo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA o vehículo y sacrificadas 24 h después.....	50
Figura 19. Células apoptóticas (TUNEL) en hipotálamo de ratas nulíparas y lactantes con tratamiento de KA ó vehículo y sacrificadas 24 h después.....	51

12. ANEXO

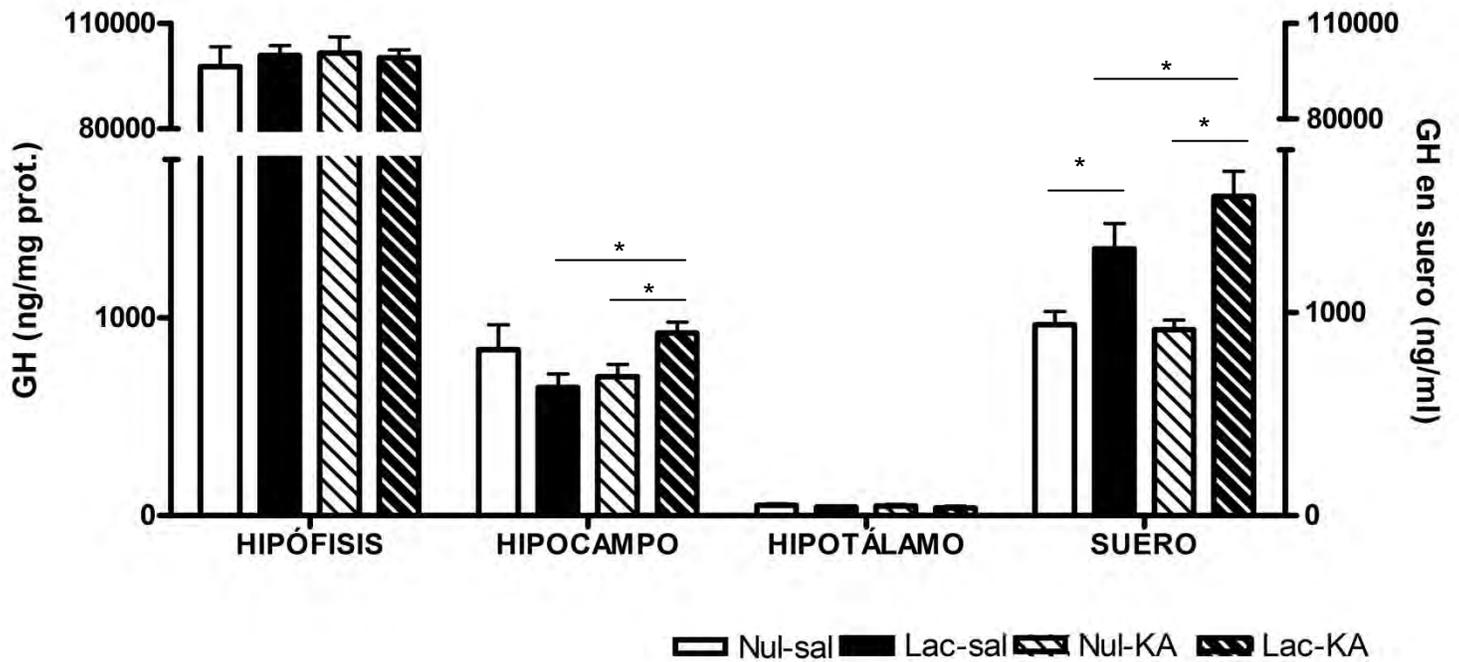


Figura 19. Contenido de rGH en la hipófisis, hipocampo, hipotálamo y suero de ratas nulíparas y lactantes con inyección de KA y vehículo. En el histograma se observa el contenido de rGH expresada en ng de GH por mg de proteína total en ratas nulíparas y lactantes en hipocampo, hipotálamo e hipófisis, mientras que en suero es ng de rGH/ml de suero. (*) Diferencias significativas con $p < 0.05$. $n=4$ por grupo para hipocampo, hipotálamo e hipófisis, mientras que en plasma la $n=8$ por grupo. Nul=nulíparas Lac=Lactantes