

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DEL MICROARRREGLO DE EXPRESIÓN DE PROLACTINA, $CAMKII\alpha$,
MDK, TRH, YWHAG Y GFAP EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA LACTANTE, EN
RESPUESTA A LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO KAÍNICO.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

DANIEL ALFONSO VARELA PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Profesor: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

SECRETARIO: Profesor: Marco Antonio Cerbón Cervantes

1er. SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

2° SUPLENTE: Profesor: Laura Carmona Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ

SUSTENTANTE:

DANIEL ALFONSO VARELA PÉREZ

Agradecimientos

A mi madre, mi abuela, mi tía y mi hermana, a quienes pertenecen cada uno de mis triunfos, es por ellas que he logrado convertirme en la persona que soy el día de hoy. A mi padre por estar ahí en el momento justo que lo necesitaba.

Al Dr. Cerbón y la Dra. Adriana, por haberme instruido y aceptado en su laboratorio para llevar a cabo el presente trabajo, ya que sin su apoyo y presencia nada de esto se hubiera llevado a cabo. Así como a todos los compañeros del laboratorio 206 por su apoyo y compañía con los que compartí risas y buenos momentos durante mi estancia en éste.

A los otros 3 fantásticos (Chivi, Army y Trova), mis hermanos, porque sobrevivimos a la universidad, a los viajes a Huatulco, la sierra de Guerrero, al aire, los ataques de la morsa, los mosquitos y a tantos y tantos buenos momentos que simplemente no alcanzaría a describir en esta tesis.

A mi compadre Oscar por la constante exigencia, los eternos debrayes, por su sincera amistad y compañía, así como a su familia por aceptarme en su hogar como uno más.

A mis hermanos del MJC y la JCA por alejarme un poco de la sordidez y recordarme lo bueno que es hacer algo por los demás sin esperar nada a cambio.

A toda la banda jardinera, los del auditorio, los buenos, los colados y toda la gente conocida de la facultad por haber terminado la carrera a pesar de ser mis amigos, por ayudarme a terminarla, y por seguir saludándome aún cuando fuimos compañeros de clase.

Y como ministro de lo obvio agradeciendo a Rafa la esposa, al Vaquero solitario, Chava el perdido, Alicia la tía, Caro Sports, Memo el gordo, Stevie y sus pipetas, Myrna y su Lalo, Piffi amarguras, Emmanuel el gato, Axel

cubeta, Karim peludo, Elly la hermana, Carlos el barbón, Luk la jerga, Iván el Nazi, Paola la fuerte, Chava musical, Walter Phelps, Deneb masajitos, Arturo el waterpolista, Alán el biólogo, Itzel metalera, Rommie hawaiiana, Cariño el ñoño, Erika la esponja y bueno a todos aquellos que pertenecieron y ayudaron a la fundación del ministerio de lo obvio.

En fin agradezco a todos los que han estado junto y para mí a lo largo de todos estos años, por enseñarme algo sobre la vida y mi persona, porque hemos terminado un camino juntos y emprenderemos el siguiente de la misma forma.

Índice

I.	Introducción.	
	1.1 Planteamiento del problema.....	7
	1.2 Objetivo general.....	9
	1.2.1 Objetivos particulares.....	9
	1.3 Hipótesis de trabajo.....	10
II.	Marco teórico.	
	2.1 Glutamato y excitotoxicidad.....	10
	2.2 Ácido Kaínico y receptores a kainato.....	16
	2.3 Hormonas sexuales y neuroprotección.....	21
	2.4 Efectos hormonales en el cerebro materno.....	26
	2.5 Resultados del microarreglo.....	30
	2.6 Prolactina.....	31
	2.7 CaMKII α	37
	2.8 GFAP.....	40
	2.9 MDK.....	44
	2.10 TRH.....	47
	2.11 YWHAG.....	49
III.	Diseño experimental y metodología.	
	3.1 Soluciones.....	54
	3.2 Animales.....	55
	3.3 Disección del hipocampo medio.....	56
	3.4 Extracción de RNA.....	56
	3.5 Retrotranscripción del RNA (RT).....	58
	3.6 Síntesis de oligonucleótidos.....	58
	3.7 Reacción en cadena de la polimerasa.....	59
	3.8 Electroforesis de los productos de RT-PCR.....	60
	3.9 Análisis densitométrico.....	61
	3.10 Análisis estadístico.....	61

IV.	Resultados y discusión.	
	4.1 Resultados.....	61
	4.2 CaMKII α	63
	4.3 GFAP.....	64
	4.4 MDK.....	65
	4.5 PRL.....	66
	4.6 TRH.....	67
	4.7 YWHAG.....	68
	4.8 Discusión de resultados.....	69
V.	Conclusiones.....	80
VI.	Bibliografía.....	81

I. Introducción

1.1 Planteamiento del problema

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor de tipo excitador en el Sistema Nervioso Central (CNS) de mamíferos (Vanoye-Carlo, 2006b). Es un importante neurotransmisor para el desarrollo neuronal, la plasticidad cerebral, el aprendizaje y la memoria en condiciones fisiológicas (Wang and Qin, 2010).

La participación del Glu en el CNS incluye varias formas de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo (LTP), respuesta que ha sido ampliamente considerada como un mecanismo involucrado en el aprendizaje y la memoria (Vanoye-Carlo, 2006b).

El ácido kaínico (KA) se aisló del alga roja *Digenea*, encontrada en aguas tropicales y subtropicales, la cual ha sido usada por siglos como antihelmintico y es conocido junto con el ácido domoico, de causar intoxicación amnésica por mariscos (Pinheiro and Mulle, 2006) (Wang et al., 2005).

Estudios subsecuentes demostraron que el KA era un agonista de Glu con una fuerza treinta veces mayor que éste en potencial neurotóxico (Wang et al., 2005). Se sabe que la administración de KA al igual que otros modelos de excitotoxicidad llevan a la apoptosis neuronal en distintas regiones del cerebro.

La inyección sistémica de KA en roedores también resulta en la activación de células gliales y la respuesta inflamatoria típica en enfermedades neurodegenerativas (Pinheiro and Mulle, 2006). Además de provocar la muerte retardada de neuronas piramidales en las regiones de CA1 y CA3 en ratas adultas por excitotoxicidad (Wang et al., 2005). El concepto de excitotoxicidad fue acuñado por el Dr. Olney en 1969 como un efecto tóxico debido a la elevada activación de receptores por aminoácidos excitadores.

La excitotoxicidad puede mediar el daño neuronal en varios desórdenes neurológicos incluidos la isquemia y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, Huntington y Alzheimer, por estas razones se ha convertido en un importante tema de estudio por décadas (Wang and Qin, 2010).

Por otro lado se sabe que la PRL es la responsable de la producción de leche en los mamíferos durante el periodo de lactancia. Aparte de su papel en la fisiología reproductiva, regula la neurogénesis, proliferación de células cerebrales y tiene un efecto mitogénico en la astrogliá (Tejadilla et al., 2010). De manera interesante, nuestro grupo de trabajo demostró recientemente que la PRL evita el daño provocado por excitotoxicidad tras la administración de KA .

Este hecho le otorga un particular interés en términos de neuroprotección y abre la posibilidad de un campo nuevo de investigación. Los mecanismos candidatos para la acción protectora de la PRL incluyen cambios en la neurotransmisión glutamatérgica, efectos antiapoptóticos y regulación de la expresión de factores neurotróficos en el hipocampo (Tejadilla et al., 2010).

Debido al potencial neuroprotector de la PRL, y a la importancia clínica implícita en la elucidación de los mecanismos moleculares involucrados en la recuperación del cerebro en distintas condiciones patológicas, el modelo de excitotoxicidad se convierte en un candidato adecuado para la evaluación de los cambios moleculares ocurridos tanto en el cerebro dañado como en el protegido.

Por lo que sabemos, la condición de lactancia produce cambios en la expresión genética en el cerebro de la rata que pueden estar involucrados en la neuroprotección observada durante este estadio. Por lo tanto, la expresión genética inducida por la lactancia en neuronas hipocampales será diferente respecto a las ratas en la etapa de metaestro.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es la validación del microarreglo de expresión de PRL, CAMKII α , GFAP, MDK, TRH y YWHAG en el hipocampo de la rata lactante en respuesta a la administración de ácido kaínico, comparando con ratas en metaestro.

1.2 Objetivo general

Validación del microarreglo de expresión de PRL, CAMKII α , GFAP, MDK, TRH y YWHAG en el hipocampo de la rata lactante en respuesta a la administración de KA, comparando con ratas en metaestro de genes relacionados con funciones neuronales.

1.2.1 Objetivos particulares

Validación del perfil de expresión de PRL en el hipocampo de la ratas lactantes en respuesta a la administración de KA comparando con ratas en metaestro.

Validación del perfil de expresión de CAMKII α en el hipocampo de la ratas lactantes en respuesta a la administración de KA comparando con ratas en metaestro.

Validación del perfil de expresión de GFAP en el hipocampo de la ratas lactantes en respuesta a la administración de KA comparando con ratas en metaestro.

Validación del perfil de expresión de MDK en el hipocampo de la ratas lactantes en respuesta a la administración de KA comparando con ratas en metaestro.

Validación del perfil de expresión de TRH en el hipocampo de la ratas lactantes en respuesta a la administración de KA comparando con ratas en metaestro.

Validación del perfil de expresión de YWHAG en el hipocampo de las ratas lactantes en respuesta a la administración de KA comparando con ratas en metaestro.

1.3 Hipótesis de trabajo

La condición de lactancia produce cambios en la expresión genética en el cerebro de la rata que pueden estar involucrados en la neuroprotección observada durante este estadio .

Por lo tanto, la expresión genética inducida por la lactancia en neuronas hipocámpales será diferente respecto a las ratas en la etapa de metaestro.

II. Marco teórico

2.1 Glutamato y excitotoxicidad.

El Glu es el principal neurotransmisor de tipo excitador en el CNS de mamíferos (Vanoye-Carlo, 2006). Es un importante neurotransmisor para el desarrollo neuronal, la plasticidad cerebral, el aprendizaje y la memoria en condiciones fisiológicas (Wang and Qin, 2010). La participación del Glu en el CNS incluye varias formas de plasticidad sináptica como la LTP, respuesta que ha sido considerada como el posible mecanismo involucrado en el aprendizaje y la memoria (Vanoye-Carlo 2006).

Existen numerosas moléculas endógenas que funcionan como aminoácidos excitadores, como pueden ser el ácido quinolínico (QA), el ácido homocistéico, y moléculas exógenas como el N-Metil-D-Aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) y el ácido kaínico (KA) (Wang and Qin 2010).

Los aminoácidos excitadores producen sus efectos a través de una familia de receptores conocidos como receptores a Glu (GluRs) (Wang and Qin 2010), los cuales son responsables de la neurotransmisión.

Estos receptores se clasifican en dos tipos: los acoplados a proteínas G denominados metabotrópicos (mGluRs) y los acoplados a canales iónicos llamados ionotrópicos (iGluRs), y su activación conlleva a un rápido aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática a iones de sodio, potasio y calcio (Vanoye-Carlo 2006).

Estudios farmacológicos, biofísicos y moleculares sustentan la existencia de tres familias diferentes de iGluRs que han sido nombradas de acuerdo al agonista que induce su activación: receptores tipo NMDA (NMDARs), receptores tipo AMPA (AMPAARs) y receptores tipo KA (KARs) (Vanoye-Carlo 2006). Asimismo, existen tres clases de mGluRs (I,II y III) (Wang and Qin 2010).

Los iGluRs son canales iónicos asociados a ligando que se abren tras la unión a Glu, lo que conlleva a la entrada de sodio y/o calcio, así como la salida de potasio (Wang and Qin 2010).

Los iones Ca^{2+} son necesarios para el correcto funcionamiento y supervivencia de las neuronas, aunque en numerosos padecimientos la concentración de estos iones alcanza niveles críticos que provocan daño o muerte neuronal (Szydłowska et al., 2010).

Se ha demostrado que la principal determinante de la neurotoxicidad por Ca^{2+} es la ruta por la cual ingresa a la célula. La evidencia ha implicado virtualmente a todos los miembros de la familia de GluRs en la excitotoxicidad, siendo particularmente importantes los iGluRs (Szydłowska, Gozdz et al. 2010).

Los mGluRs pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. La activación de receptores metabotrópicos modifica los niveles de cAMP y la liberación de las reservas intracelulares de Ca^{2+} (Wang and Qin 2010).

Los iGluRs comparten un diseño estructural que consiste en 4 subunidades con un gran dominio amino terminal que se dispone de modo extracelular y cuatro dominios transmembranales que dan paso a un asa intracelular carboxilo terminal.

Cada subunidad cuenta con 4 dominios (M1, M2, M3 y M4). Los dominios M1, M3 y M4 atraviesan la membrana mientras que M2 forma una asa sin atravesarla, formando parte del canal iónico que da propiedades importantes de permeabilidad iónica a los receptores.

Entre los dominios M2 y M3 se presenta una región que, junto con el extremo amino terminal, forma el sitio de reconocimiento al agonista. (Vanoye-Carlo 2006).

La regulación de la transmisión glutamatérgica es crítica debido a que un indebido control de ésta y la actividad de sus receptores puede alterar no solo sus propiedades de señalización, sino que puede llevar a la muerte neuronal por excitotoxicidad (Wang and Qin 2010). El concepto de excitotoxicidad fue acuñado por el Dr. Olney en 1969 como un efecto tóxico debido a la elevada activación de receptores por aminoácidos excitadores.

La excitotoxicidad puede mediar el daño neuronal en varios desórdenes neurológicos incluidos la isquemia y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, Huntington y Alzheimer, y ha sido un importante tema de estudio por décadas (Wang and Qin 2010).

La isquemia global activa la muerte celular de las neuronas piramidales de CA1 en el hipocampo y algunos tipos de neuronas hilares (Gorter et al., 1997). Se piensa que la entrada de Ca^{2+} mediado por los GluRs tiene un papel primordial en este proceso.

Aunque las rutas moleculares involucradas en la excitotoxicidad no son entendidas completamente en la actualidad, existe suficiente evidencia para afirmar que la sobreestimulación de los GluRs produce múltiples efectos adversos, tales como fallas en la homeostasis de Ca^{2+} , el comprometer la función de los organelos, incremento de la producción de óxido nítrico (NO) y de radicales libres, activación persistente de proteasas, endonucleasas y cinasas, incremento en la expresión de factores de transcripción pro-muerte y de genes inmediatos tempranos (IEGs), y la inducción de la apoptosis (Gorter, Petrozzino et al. 1997) (Wang and Qin 2010).

Una interrupción del suministro de sangre durante un ataque isquémico resulta en privación de oxígeno y glucosa, provocando así una reducción en la cantidad de energía disponible para mantener a las células cerebrales. Las neuronas en particular se vuelven incapaces de mantener los gradientes iónicos necesarios para la función celular y la homeostasis. Esto resulta en una excesiva despolarización neuronal, liberación de neurotransmisores excitadores y una disminución en la recaptura de neurotransmisores del espacio extracelular (Szydlowska, Gozdz et al. 2010).

Bajo condiciones patológicas, e.g. convulsiones, hipoxia, e isquemia, numerosas células incrementan la entrada de Ca^{2+} a pesar de la regulación dada por los AMPA-R o NMDA-R.

Es importante notar que los patrones de expresión específicos de los receptores dependen de la edad del animal y de su historial convulsivo (Wang and Qin 2010).

La muerte neuronal por excitotoxicidad en el cerebro no es un efecto uniforme, sino que más bien tiene distintas formas morfológicas: necrótica, apopótica, y autofágica continua. Las características de la muerte por excitotoxicidad pueden ser bastante útiles en varias condiciones patológicas.

Los primeros estudios al respecto descubrieron que la muerte cerebral inducida por excitotoxinas es caracterizada también por vacuolización citoplasmática, inestabilidad de las membranas celulares e hinchamiento celular (Wang and Qin 2010).

Estos aspectos implican que las células mueren de necrosis. Estudios posteriores descubrieron degradación internucleosomal de DNA, condensación y fragmentación cromosómica, y activación de caspasas, indicando que las neuronas también exhiben aspectos apoptóticos. Así se llegó a la conclusión de que la muerte neuronal excitotóxica es una mezcla de necrosis y apoptosis (Wang and Qin 2010).

La sobreestimulación prolongada de los GluRs lleva a una sobrecarga de Ca^{2+} y Na^{+} . La entrada de Ca^{2+} a través de los canales dependientes de voltaje puede aumentar la concentración de Ca^{2+} , bajo condiciones excitotóxicas o isquémicas (Wang and Qin 2010).

Además, la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria y la subsecuente liberación del mismo pueden tener un rol importante en el mantenimiento de la sobrecarga de Ca^{2+} (Wang and Qin 2010).

El movimiento de Cl^{-} también ha sido implicado como un componente primordial de la respuesta excitotóxica aguda en las neuronas. Se piensa que la excitotoxicidad aguda es mediada por despolarización excesiva en la membrana postsináptica. Esto resulta en un desequilibrio osmótico, que se intenta remediar mediante la entrada de Cl^{-} , Na^{+} , y agua, lo que eventualmente provoca la lisis celular (Wang and Qin 2010).

La excitotoxicidad mediada por Glu está estrechamente relacionada con cambios neuroquímicos y neuropatológicos ocurridos durante el daño neuronal agudo y distintas enfermedades neurodegenerativas (Wang and Qin 2010).

La disfunción de los organelos ocurre en numerosas enfermedades neurológicas humanas como en la enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y el Alzheimer.

Siendo la muerte neuronal regulada por la actividad de cascadas de señalización y proteínas de comunicación cruzada entre organelos (Wang and Qin 2010).

Mientras que los eventos inmediatos durante el daño excitotóxico están bien establecidos, los cambios subsecuentes son menos claros. Siendo candidato a este paso la transducción de señales a partir de señales extracelulares al núcleo (Wang and Qin 2010).

Este proceso provoca la acumulación de iones Ca^{2+} , que induce la sobreactivación de varias enzimas perjudiciales y procesos de señalización que afectan la función neuronal y provocan la muerte celular (Szydlowska, Gozdz et al. 2010).

Aunque el mecanismo exacto por el cual el Ca^{2+} provoca excitotoxicidad es bastante controversial y puede ocurrir por numerosos mecanismos, actualmente se reconocen dos teorías: La hipótesis de la sobrecarga de Ca^{2+} , que sugiere que la excitotoxicidad existe meramente en función de la cantidad de Ca^{2+} que entra a la célula; y la hipótesis de la fuente específica sugiere que la excitotoxicidad por Ca^{2+} no es debida únicamente a una elevación en la concentración de Ca^{2+} , sino que se relaciona con la ruta de entrada del mismo a la célula y las distintas señalizaciones activadas por éste (Szydlowska, Gozdz et al. 2010).

A pesar de la presencia ubicua de iones Ca^{2+} en las células, distintos procesos dependientes de Ca^{2+} , incluidos la plasticidad sináptica y la expresión génica, son regulados de manera separada a través de distintas cascadas de señalización que se encuentran relacionadas por la entrada de Ca^{2+} .

Existen numerosas rutas para la entrada de Ca^{2+} a las células y la regulación de varias de ellas se ve afectada por distintos fenómenos como la excitotoxicidad, anoxia o isquemia cerebral (Szydłowska, Gozdz et al. 2010). Aunque se ha realizado investigación exhaustiva en años recientes, no se ha determinado por completo el mecanismo por el cual el Ca^{2+} provoca excitotoxicidad.

La elevación en la concentración de Ca^{2+} puede desencadenar numerosas cascadas neurotóxicas, como el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, la activación y sobreestimulación de enzimas como las calpaínas y otras proteasas, proteincinasas, NOS, calcineurina y endonucleasas (Szydłowska, Gozdz et al. 2010).

Los KAR son receptores heteroméricos permeables a sodio, potasio y calcio. La excitotoxicidad aumentada por la activación de el KAR puede ser debida a la liberación de Glu y la entrada de sodio que despolarizan la membrana y liberan el bloqueo de Mg del NMDAR, para que acto siguiente se de la activación de los NMDAR (Wang and Qin 2010).

La excitotoxicidad resultante de la estimulación del KAR puede ser sucedida por señalizaciones apoptóticas más que las necróticas, observadas en algunas ocasiones en la muerte celular asociada a NMDAR. Además, existen numerosos estudios que sugieren que la excesiva activación de GluRs no-NMDA con KA pueden inducir la autofagia y activación de enzimas lisosomales, que pueden estar involucradas de manera importante en el daño neuronal provocado por excitotoxicidad (Wang and Qin 2010).

2.2 Ácido Kaínico y receptores a kainato.

El KA es aislado del alga roja *Digenea* encontrada en aguas tropicales y subtropicales, la cual ha sido usada por siglos como antihelmintico y es conocido junto con el ácido domoico, de causar intoxicación amnésica por mariscos (Pinheiro and Mülle, 2006) (Wang et al., 2005).

Estudios subsecuentes demostraron que el KA era un agonista de Glu con una fuerza treinta veces mayor que éste en potencial neurotóxico. (Wang, Yu et al. 2005)

Se sabe que la administración de KA al igual que en otros modelos de excitotoxicidad causa un incremento en el calcio intracelular y activa cascadas apoptóticas de señalización dependientes de calcio, que llevan a la apoptosis neuronal en distintas regiones del cerebro.

La inyección sistémica de KA en roedores también resulta en la activación de células gliales y la respuesta inflamatoria típica en enfermedades neurodegenerativas (Pinheiro and Mulle 2006) Además de provocar la muerte retardada de neuronas piramidales en las regiones de CA1 y CA3 en ratas adultas (Wang, Yu et al. 2005).

Además se ha demostrado que la administración de KA aumenta la peroxidación lipídica e incrementa la cantidad de sintasa de oxido nítrico (NOS) en el cerebro, lo que conlleva la acumulación de especies reactivas de nitrógeno que activan la necrosis o apoptosis al alterar la función mitocondrial (Wang, Yu et al. 2005).

En la región de CA3 del hipocampo hay particularmente un elevado número de sitios de unión de alta afinidad por KA que es consistente con las bajas concentraciones de KA necesarias para disparar actividad epiléptica (Vincent and Mulle 2009). El hecho de que concentraciones submicromolares de KA generan efectos epileptogénicos en la región de CA3, llevó a la conclusión de que los KARs son los principales responsables del efecto epileptogénico del KA (Pinheiro and Mulle 2006).

Y aunque los receptores de alta afinidad probablemente se vean involucrados en el proceso epileptogénico, hay muy poca evidencia que los asocie directamente a éste (Pinheiro and Mulle 2006).

La clonación de las subunidades de los KARs fue decisiva en demostrar que los receptores a AMPA (AMPARs) y los KARs constituyen dos familias separadas de receptores con cuatro subunidades de AMPAR (GluR1, GluR2, GluR3, y GluR4) y cinco subunidades de KAR (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2) que se arman en combinaciones tetraméricas sin posibilidad de combinación entre las subunidades de KAR con las subunidades de AMPAR.

Los mRNA de GluR6 y KA2 están altamente expresados en las células piramidales de CA3 (Vincent and Mulle, 2009). KA1 y KA2 pueden combinarse con GluR5, GluR6 y GluR7 para formar receptores funcionales con propiedades farmacológicas y biofísicas modificadas. Los KARs son arreglos tetraméricos con una estructura similar a otros receptores iGluRs (Pinheiro and Mulle 2006).

Estudios posteriores hallaron que el KA puede unirse a los AMPARs y KARs en el cerebro. Los KARs son canales asociados a ligando, permeables a cationes, activados por bajas concentraciones de KA que muestran activación rápida y desensibilización características (Pinheiro and Mulle 2006).

La activación de los KARs provoca diversos eventos celulares que llevan a la muerte neuronal. Los AMPARs Y KARs están presentes en las dendritas de las células piramidales hipocampales de CA1 y CA3, que muestran una heterogenicidad molecular considerable en la expresión de estos canales (Wang, Yu et al. 2005).

Las subunidades de los AMPARs tienen una baja afinidad por KA, haciendo que estos receptores también respondan a KA, lo que hace difícil la distinción entre los distintos agonistas a iGluRs (Vincent and Mulle 2009). Aparentemente, la distribución específica de los AMPARs y KARs en el cerebro y la permeabilidad a Ca²⁺ son factores importantes que subyacen la vulnerabilidad selectiva de estas neuronas a la neurodegeneración (Wang, Yu et al. 2005).

Los altos niveles de expresión de KARs en las células piramidales de CA3 y su actividad recurrente dan a esta región una sensibilidad particular a los efectos epileptogénicos del KA (Pinheiro and Mulle 2006). Los KARs cumplen con distintas actividades a nivel biológico: despolarización de la membrana neuronal por una corriente entrante, la regulación de la excitabilidad neuronal a través de la regulación de la conductancia y la regulación de la liberación de neurotransmisores excitadores e inhibidores (Pinheiro and Mulle, 2006).

Los KARs juegan un papel fundamental en la función fisiológica en la regulación de la actividad de red en numerosas regiones del cerebro. Están ampliamente involucrados en la regulación de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica.

A nivel presináptico, algunos KAR facilitan la transmisión glutamatérgica y la plasticidad a corto plazo (STP), mientras que otros regulan la transmisión GABAérgica. A nivel post sináptico los KARs son activados en condiciones de liberación endógena de Glu ejerciendo una acción excitatoria en las células piramidales y las interneuronas GABAérgicas. Hay un amplio interés en descubrir nuevos agonistas y antagonistas de KARs ya que su labor es más bien regulatoria (Vincent and Mulle 2009).

En años recientes, la neurodegeneración causada por la administración sistémica de KA ha sido utilizada ampliamente como modelo para investigar los mecanismos de excitotoxicidad mediados por neurotransmisores excitadores y la posible intervención farmacológica en contra de eventos excitotóxicos (Wang, Yu et al. 2005).

La epilepsia es un desorden neurológico crónico que se caracteriza por la ocurrencia de convulsiones espontáneas recurrentes (SRS), que consisten en descargas neuronales prolongadas sincronizadas (Vincent and Mulle 2009).

La epilepsia del lóbulo temporal (TLE) es la forma más común de epilepsia en humanos con convulsiones recurrentes parciales que se originan en distintas estructuras mesiales como el hipocampo.

Existen numerosos modelos animales que involucran disfunción cerebral que suponemos reflejan los procesos que conllevan a la TLE (Vincent and Mulle 2009). Tanto en humanos como en modelos animales de TLE, los axones de células granulares dentadas brotan y generan fibras musgosas recurrentes que llevan a una excitación aumentada que puede facilitar la generación de convulsiones y es de la misma manera que los KARs contribuyen a la actividad de red sincrónica aumentada en el giro dentado de ratas epilépticas (Pinheiro and Mulle 2006).

Dentro de los modelos clásicos de TLE, se ha sabido por largo tiempo que la administración sistémica o intracerebral de KA en roedores induce convulsiones epileptiformes; estas convulsiones se originan en la región CA3 del hipocampo (Vincent and Mulle 2009).

Los animales sobrevivientes a dosis sistémicas de KA exhiben una fase crónica de SRS. Las convulsiones inducidas por KA producen patrones de pérdida neuronal inducidos por actividad y astrogliosis que se aproximan a la neuropatología (esclerosis hipocampal o esclerosis del cuerno de Amon) (Vincent and Mulle 2009). La esclerosis del hipocampo abarca más frecuentemente la pérdida extensiva de células piramidales de CA1 y CA3 y las interneuronas del giro dentado (Vincent and Mulle 2009).

Aunque los modelos experimentales de epilepsia como el modelo de TLE por KA no concuerda completamente con la compleja etiología y características identificadas en humanos, han sido muy fructíferos para el descubrimiento de fármacos antiepilépticos y han contribuido ampliamente al conocimiento que se tiene de los mecanismos que provocan las convulsiones epilépticas (Vincent and Mulle 2009).

El hipocampo y particularmente las células piramidales de CA3 son susceptibles a la acción epileptogénica del KA, debido a que el *stratum lucidum* de CA3 tiene alto contenido de sitios de unión de alta afinidad por KA, estando GluR6, KA1 y KA2 altamente expresados a nivel de mRNA en las células piramidales de CA3 y CA1 (Vincent and Mulle 2009).

El primer efecto del KA cuando alcanza el hipocampo después de la administración sistémica es la despolarización por activación directa de KARs conteniendo GluR6, por bajas concentraciones de KA en las células piramidales de CA3. El KA también provoca una reducción de la inhibición GABAérgica en las células piramidales de CA1 (Vincent and Mulle 2009). Además de las convulsiones epilépticas, la administración sistémica de KA produce daño neuronal principal en estructuras del sistema límbico, siendo las neuronas piramidales del hipocampo muy vulnerables a éste. (Vincent and Mulle 2009).

2.3 Hormonas sexuales y neuroprotección.

Las hormonas sexuales regulan la función cerebral a lo largo de la vida de los organismos. Durante el desarrollo temprano, regulan el proceso de diferenciación sexual y están involucradas en la maduración de numerosas estructuras celulares como el hipotálamo y el hipocampo (Mejias-Aponte et al., 2002).

La especificidad sexual puede ser modelada en cultivos celulares sin esteroides sexuales de fondo, siendo las neuronas masculinas más susceptibles que las femeninas, a los insultos farmacológicos utilizados para simular el daño cerebral (Vagnerova et al., 2008).

Estas observaciones no parecen estar limitadas a las neuronas. La muerte celular provocada por la privación de oxígeno y glucosa, es menos extensa en los astrocitos e hipocampo femeninos. Estos descubrimientos sugieren que la sensibilidad específica por género puede ser atribuida parcialmente a una función del sexo celular (Vagnerova, Koerner et al. 2008).

Estudios de isquemia global y local en distintos modelos con roedores han demostrado que las hembras sufren menos daño tisular que los machos ante insultos similares. Este efecto benéfico del género femenino se pierde en animales reproductivamente seniles u ovariectomizados, pero puede ser restaurado con terapia hormonal (Vagnerova, Koerner et al. 2008).

Existen dos clases de hormonas esteroides femeninas, las adrenales y las gonadales. Los ovarios producen las hormonas esteroides: los estrógenos en los folículos ováricos y la progesterona en el cuerpo lúteo.

Los efectos clásicos de los estrógenos y la progesterona ocurren a través de un mecanismo molecular en el núcleo celular (Morrell, 1999). Los estrógenos regulan la expresión génica en distintos tejidos, siendo los efectos más estudiados, los ocurridos en el tracto reproductivo y el CNS. Los estrógenos provocan sus efectos tras la activación de dos subtipos de receptores a estrógeno (ERs), ER α y ER β (Vanoye-Carlo et al., 2009). Los ERs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y se encuentran ampliamente distribuidos por el cerebro y la espina dorsal. Se han encontrado altos niveles de expresión de ERs en distintas estructuras del sistema límbico como el hipocampo, el *septum lateral* y la amígdala (Vanoye-Carlo, Mendoza-Rodriguez et al. 2009).

Los estrógenos y sus receptores pueden activar funciones celulares a través de mecanismos tanto genómicos como no genómicos. El mecanismo genómico requiere una serie de pasos que finalmente activan la transcripción de diversos genes (Vanoye-Carlo, Mendoza-Rodriguez et al. 2009).

En la señalización clásica por estrógenos, el estradiol (E2), el estrógeno humano predominante, se une a un receptor a estrógeno ER α o ER β que se transloca al núcleo y se une a un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el gen diana para activar la transcripción (Vagnerova, Koerner et al. 2008).

En modelos de daño neuronal, se ha demostrado que los ERs regulan la neuroprotección, teniendo en común la regulación positiva de ER β y la negativa de ER α (Vanoye-Carlo, Mendoza-Rodriguez et al. 2009).

El mecanismo no genómico consiste en la activación de distintas cascadas de señalización incluidas las MAPK, Akt, CREB y la regulación de la concentración iónica intracelular a través de los canales iónicos y la homeostasis de Ca²⁺. Además, modulan genes pro y anti-apoptóticos como las caspasas y la familia de genes Bcl-2 (Vanoye-Carlo, Mendoza-Rodriguez et al. 2009). Los ERs regulan distintos efectos en la estructura y función del CNS, incluidos la excitabilidad, la liberación de neurotransmisores, los procesos de memoria, la sinapsis, neurogénesis, y neuroprotección (Vanoye-Carlo, Mendoza-Rodriguez et al. 2009). Los estrógenos son antioxidantes y pueden prevenir la peroxidación lipídica lo que puede contribuir a la neuroprotección, disminuyendo la excitotoxicidad (Vagnerova, Koerner et al. 2008).

Sobre todo, mientras la mayor parte de la evidencia experimental señala un efecto benéfico de E2, los resultados que niegan esta evidencia enfatizan que la neuroprotección mediada por E2 puede depender de la situación clínica y experimental específicas (Vagnerova, Koerner et al. 2008).

Durante la madurez, los niveles plasmáticos de esteroides sexuales pueden influenciar el progreso de desórdenes neuronales como el Parkinson, el Alzheimer y la epilepsia (Mejias-Aponte, Jimenez-Rivera et al. 2002). Es necesaria una mayor investigación para definir claramente las circunstancias bajo las cuales se puede esperar que el E2 muestre su potencial neuroprotector completo (Vagnerova, Koerner et al. 2008). La contribución de los estrógenos a la neuroprotección, se cree, está asociada a la regulación transcripcional de moléculas preapoptóticas, antiapoptóticas así como proapoptóticas (Vanoye-Carlo, Mendoza-Rodriguez et al. 2009).

Numerosos estudios epidemiológicos sugieren diferencias de género en la incidencia de la epilepsia. Estas diferencias parecen estar relacionadas al tipo de desorden específico. La incidencia de epilepsia parece sobre todo ser más alta en machos, aunque las hembras son más susceptibles a sufrir de epilepsia idiopática generalizada o epilepsia no convulsiva (Vagnerova, Koerner et al. 2008). La evidencia reportada indica que los machos son más susceptibles a los efectos convulsivos de agentes que provocan convulsiones similares a las del lóbulo temporal, como el KA y la pilocarpina. Los machos presentan un mayor número de convulsiones fuertes que las hembras (Mejias-Aponte, Jimenez-Rivera et al. 2002).

La frecuencia convulsiva y la severidad de esta pueden verse alterados en la pubertad, durante el ciclo menstrual, en el embarazo, la menopausia y la lactancia (Cabrera et al., 2009). Estas alteraciones en la frecuencia de las convulsiones es debida probablemente a los efectos de las hormonas esteroides ováricas en las neuronas del CNS (Morrell 1999). Debido a la influencia del ciclo menstrual la ocurrencia de convulsiones complejas parciales que involucren al sistema límbico, y a que la menopausia eclipsa enormemente las diferencias entre género, se piensa que los esteroides sexuales parecen tener un papel significativo en los procesos relativos a estas enfermedades (Vagnerova, Koerner et al. 2008).

La relación entre los esteroides sexuales y la epilepsia ha sido reportada desde 1950. Estos primeros estudios encontraron una correlación entre la etapa del ciclo menstrual y la susceptibilidad a convulsiones, un fenómeno conocido como epilepsia catamenial (Scharfman et al., 2003) (Mejias-Aponte et al., 2002).

Durante el ciclo reproductivo femenino, la susceptibilidad a las convulsiones cambia de forma dramática, un efecto que ha sido implicado en la epilepsia catamenial, en la que las mujeres exhiben cambios en la incidencia de convulsiones a lo largo de su ciclo reproductivo (Scharfman, Mercurio et al. 2003).

Se ha observado una elevación en la frecuencia de las convulsiones cerca de la menstruación, cuando los niveles de esteroides sexuales es bajo, y antes de la ovulación, lo que coincide con la oleada de estradiol preovulatoria (Mejias-Aponte, Jimenez-Rivera et al. 2002).

En modelos animales los estrógenos tienen un efecto proconvulsivo y la progesterona anticonvulsivo (Morrell 1999).

De hecho la incidencia incrementada de convulsiones está asociada a bajo estrógeno y baja progesterona y con la fase folicular cuando el E2 plasmático se incrementa de manera aguda, aunque la actividad convulsiva disminuye cuando la progesterona se encuentra elevada respecto a E2, todo confirmado por estudios en modelos animales (Vagnerova, Koerner et al. 2008).

La progesterona es utilizada para el tratamiento de la epilepsia catamenial. El tratamiento con progesterona también reduce las convulsiones límbicas en una variedad de modelos experimentales; aunque sus efectos benéficos son observables únicamente a niveles fisiológicos bajos, los mecanismos antiepilépticos de la progesterona probablemente involucren la modulación del receptor GABAA (Vagnerova, Koerner et al. 2008).

En contraste, los estrógenos pueden incrementar el potencial convulsivo en animales, aunque puede que provean también alguna neuroprotección contra daño neuronal por convulsiones (Vagnerova, Koerner et al. 2008).

Se ha sugerido que los estrógenos tienen un efecto exacerbante y la progesterona un efecto protector a la susceptibilidad convulsiva. En vista de esto, la terapia con progesterona también ha sido utilizada efectivamente en mujeres con convulsiones complejas parciales para disminuir la frecuencia de las convulsiones (Mejias-Aponte, Jimenez-Rivera et al. 2002).

Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la hiperexcitabilidad inducida por E2 puede contribuir a la inducción de convulsiones en el hipocampo en la fase periovulatoria del ciclo reproductivo femenino (Scharfman, Mercurio et al. 2003).

Las bases fisiológicas de estos cambios permanecen pobremente entendidas. Aunque la progesterona y sus metabolitos han sido implicados como anticonvulsivos, también es claro que el E2 tiene un poder excitatorio significativo que puede exceder la acción de la progesterona (Scharfman, Mercurio et al. 2003).

Se han reportado también efectos tempranos a nivel de membrana. Algunos mediados por el receptor GABAA, en el que hay un sitio de reconocimiento a hormonas esteroides adyacente al sitio de unión a barbitúricos y benzodiazepinas, ambos agentes antiepilépticos (Morrell 1999). Los estrógenos tienen un efecto neto sobre estos receptores que incluye una disminución en el número de subunidades del receptor en cuestión, en la concentración de GABA y por lo tanto un menor efecto inhibitor (Morrell, 1999).

2.4 Efectos hormonales en el cerebro materno.

El ciclo reproductivo en mamíferos es un proceso complejo que comprende varias etapas como son: el cortejo, el apareamiento, la ovulación, la gestación, el parto y la lactancia. Durante cada etapa del ciclo reproductivo se producen cambios fisiológicos en el sistema neuroendócrino, que regula las funciones reproductivas (Vanoye-Carlo 2009).

Se ha considerado que el comportamiento materno es una situación de adaptación y por ende un proceso complejo que conlleva cambios a nivel tanto corporal como cerebral, cuyo objetivo es asegurar la sobrevivencia del linaje y con ello el éxito reproductivo de la especie (Vanoye-Carlo, 2009).

Una variedad de cambios adaptativos en la fisiología materna son requeridos para mantener a la progenie, incluidas respuestas autónomas, de comportamiento y neuroendócrinas que promueven el comportamiento maternal y la producción de leche (Vanoye-Carlo et al., 2008).

La experiencia materna involucra la adquisición de nuevas conductas que le permiten a la madre llevar a cabo una gran variedad de actividades encaminadas al cuidado de la progenie, entre ellas el agrupar y limpiar a las crías y su protección ante depredadores, un continuo estado de alerta y la agresión intensificada ante potenciales amenazas intra o inter especie (Vanoye-Carlo 2009).

A lo largo del embarazo y la lactancia, existen cambios fisiológicos notables en los niveles de hormonas esteroides (estradiol, progesterona y corticoesterona) y hormonas peptídicas (oxitocina y prolactina) (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008).

Además de lo relacionado al cuidado e interacción con las crías en el nido, la nueva madre ha de proveer el alimento, lo que se ha relacionado con un aumento en las habilidades predatorias y de orientación espacial así como una reducción de la ansiedad provocada por estrés (Vanoye-Carlo 2009).

A pesar de esta complejidad, el cerebro materno ha servido como un modelo experimental de plasticidad morfológica, neuroquímica, y funcional en el CNS (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008). La plasticidad neuronal es definida como la habilidad natural del cerebro para modificar su organización y procesos para satisfacer las demandas del ambiente cambiante (Vanoye-Carlo 2009). Uno de los aspectos de plasticidad neuronal más estudiados durante el embarazo y la lactancia es el remodelado reversible de áreas del hipotálamo, incluida una reducción o incremento en la cobertura astrocítica que puede modular la actividad en vecindarios neuronales (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008).

Diversos estudios sugieren que la expresión del comportamiento materno, tanto en la etapa gestacional como durante la lactancia, se encuentra relacionada a las fluctuaciones hormonales. (Vanoye-Carlo 2009).

Se ha demostrado también que el estrés y la ansiedad, factores que pueden interferir con los procesos de aprendizaje y memoria, se encuentran reguladas a la baja en hembras con experiencia materna, además de que la actividad neuronal se encuentra reducida en hembras que han parido bajo condiciones de estrés (Vanoye-Carlo 2009).

En paralelo a la reorganización morfológica en las áreas hipocampales, se ha observado un aumento en el desempeño de la memoria y aprendizaje espacial durante el embarazo, parto y lactancia (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008).

Algunas respuestas hormonales a aminoácidos excitadores también se encuentran alteradas durante el embarazo y la lactancia, e.g. disminución de la excitotoxicidad provocada por la administración de KA. Dadas estas diferencias en la respuesta de los GluRs durante el embarazo y la lactancia, estas son condiciones fisiológicas interesantes para el estudio de la participación hormonal para prevenir la neurotoxicidad en el cerebro (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008).

El porcentaje de pacientes con cambios en la frecuencia de convulsiones durante el embarazo varía ampliamente. En aproximadamente 50% de las mujeres epilépticas embarazadas no existe ningún cambio en la frecuencia convulsiva, mientras que en 25% se incrementa, y en el 25% restante disminuye (Berzaghi Mda et al., 1987).

Aparte de las estructuras directamente involucradas en la regulación neuroendocrina y el comportamiento materno, estudios recientes se han concentrado en los cambios morfológicos y funcionales que ocurren en el hipocampo de la madre durante la lactancia (Cabrera, Cantu et al. 2009).

El estudio de la relación entre la epilepsia y el embarazo incluye cambios en la frecuencia convulsiva, así como el efecto de las convulsiones en la progenie (Berzaghi Mda, Amado et al. 1987).

Los cambios observados en la frecuencia convulsiva durante el embarazo y la lactancia sugieren que ambos periodos tienen un efecto neuroprotector, disminuyendo el número de SRS durante los primeros dos tercios del periodo gestacional y durante todo el periodo de lactancia (Berzaghi Mda, Amado et al. 1987).

La administración de KA ofrece un modelo experimental de epilepsia caracterizado por la aparición tardía de convulsiones espontáneas que recuerdan las observadas en la epilepsia del lóbulo temporal humano. Siendo así un modelo animal útil para estudiar las interacciones embarazo-convulsiones (Berzaghi Mda, Amado et al. 1987).

Se ha demostrado previamente que la expresión de ER β se encuentra incrementada de manera significativa en las regiones de CA1 y CA3 del hipocampo de ratas lactantes tras el tratamiento con KA, mientras que la expresión de ER α se encuentra disminuida en la misma región con el mismo tratamiento (Vanoye-Carlo, Mendoza-Rodriguez et al. 2009).

Además de una relocalización de ER β desde el espacio citoplasmático al núcleo, lo que sugiere la participación del receptor en la neuroprotección observada, aunque las hormonas involucradas en la lactancia también podrían participar de esta (Vanoye-Carlo, Mendoza-Rodriguez et al. 2009).

Utilizando el modelo de KA se ha demostrado que el embarazo disminuye la frecuencia de SRS y reduce la afinidad de GluRs y KARs por sus respectivos ligandos; y que la lactancia previene del daño celular inducido por la administración de KA en CA1, CA3, y CA4 en el hipocampo (Cabrera, Cantu et al. 2009).

Y se ha demostrado previamente que la lactancia protege al hipocampo del daño celular por administración sistémica de KA, incluida una menor frecuencia de SRS inducidas por KA, así como la reducción de sitios de unión a KA (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008).

Se ha especulado que el efecto protector de la lactancia en las neuronas del hipocampo, junto con una menor proliferación celular y una atenuación de la respuesta a estrés, podrían funcionar para mantener las neuronas que han sufrido cambios inducidos por el embarazo necesarios para la expresión de cambios endócrinos y de comportamiento ocurridos en esta etapa.(Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008).

En nuestro laboratorio se llevo a cabo un microarreglo para estudiar los genes que presentaban cambios importantes entre las ratas lactantes y las ratas en metaestro, con y sin el tratamiento de KA, para detectar algunos genes que podrían ser importantes durante la neuroprotección.

2.5 Resultados del microarreglo.

Se llevó a cabo el perfil de expresión génica por medio de la técnica de microarreglos en el GeneChip Rat Expression Set 230 – Affymetrix, seleccionándose las secuencias del banco de datos GenBank de NCBI, dbEST y RefSeq.

La información obtenida hasta Junio del 2002 del UniGene Build 107 fue refinada por análisis y comparación con información disponible públicamente sobre el genoma de rata del Whitehead Institute for Genome Research en Abril del 2002. Los conjuntos de sondas con los que se determinó la expresión de cada gen estuvieron formados por 16-20 pares de oligos para la detección de transcritos y otras variantes de entre más de 14,000 genes de rata perfectamente bien caracterizados.

El diseño de los microarreglos de la tecnología Affymetrix incluye controles y “house-keeping genes” distribuidos a lo largo de todo el microarreglo.

Estos controles pueden o no tener interés biológico pero son de radical importancia para evaluar la calidad y alineamiento del microarreglo.

Para identificar los genes diferencialmente expresados se implementó un modelo lineal que usa todos los datos disponibles para modelar la dinámica de esa información, usa estadística Bayesiana para calcular la probabilidad de que un gen está diferencialmente expresado en alguno de los contrastes de interés. En la Tabla 1 mostramos los genes que fueron seleccionados para su validación, así como su expresión diferencial en cada microarreglo realizado.

Tabla 1. Valores de expresión diferencial obtenidos del microarreglo para cada uno de los genes en cada estadio, estando en función del segundo estadio anotado.

	D Basal vs D Ka	Lac Basal vs Lac Ka	D basal vs Lac basal	D KA vs Lac Ka
Gen	Expresión Dif.	Expresión Dif.	Expresión Dif.	Expresión Dif.
CaMKIIα	-1.19348	1.07220	-1.23124	1.03932
MDK	1.03441	1.60855	-1.53647	1.01209
PRL	-1.01071	2.61696	-7.50968	-2.83922
TRH	-1.62756	-1.64892	-1.02438	-1.03783
YWHAG	1.03932	1.53155	-1.01547	1.45116
GFAP	1.70733	-1.11731	1.25281	1.91438

D, diestro; Lac, lactante; KA, ácido kaínico

2.6 Prolactina.

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada en células especializadas de la hipófisis anterior llamadas lactótrofos o mamótrofos que abarcan entre el 20–50% de la población celular de la hipófisis anterior.

La hormona fue nombrada con base en su propiedad de promover la producción de leche en distintas especies (Freeman et al., 2000). La PRL, tiene múltiples papeles para mantener la homeostasis en el organismo.

Además, se sabe que la síntesis de PRL no se encuentra restringida a la hipófisis anterior, sino que además otros órganos tienen la capacidad de sintetizarla (Freeman, Kanyicska et al. 2000). El 50% de la PRL se encuentra formando α -hélices, mientras el resto forma asas y giros, describiéndose actualmente como 4 α -hélices largas acomodadas de forma antiparalela, clasificándose dentro del grupo I de las hormonas proteicas que forman manojos de hélices (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

El receptor a PRL (PRLR) cuenta con distintas isoformas que han sido descritas en diversos tejidos. Estas isoformas dependen del sitio de inicio de la transcripción de los distintos promotores de PRLR, así como del splicing alternativo de transcritos codificantes y no codificantes.

Las tres principales isoformas de PRL-R descritas en ratas son: la corta (291 aminoácidos), la intermedia (393 aminoácidos) y la larga (591 aminoácidos) (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

Los PRLRs pertenecen a la familia de receptores hematopoyéticos que incluye a la GH, numerosas citocinas y algunos factores de crecimiento. Estos son caracterizados por un único dominio transmembranal hidrofóbico que divide al receptor en un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio intracelular (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001).

Se han localizado las distintas isoformas del PRLR y su mRNA en las glándulas mamarias y los ovarios, siendo también encontradas en numerosas regiones del CNS (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

Se han descrito una amplia variedad de acciones neuronales y de comportamiento que son reguladas por los PRLRs. De forma interesante, la actividad del sistema de PRL en el cerebro está elevado tras una exposición al estrés (Torner et al., 2009).

La PRL es la responsable de la producción de leche en los mamíferos durante el periodo de lactancia. Aparte de su papel en la fisiología reproductiva, regula la neurogénesis, proliferación de células cerebrales y tiene un efecto mitogénico en la astrogliá (Tejadilla et al., 2010). El papel central de esta hormona relacionado a la maternidad incluye cambios en el comportamiento y la preparación materna (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008). Promueve el comportamiento maternal y el paternal en algunas especies, modula la respuesta inmune y es luteotrófica.

Su secreción es controlada por un factor inhibidor, la dopamina (Tejadilla et al., 2010). A diferencia de otras hormonas, cuya liberación es regulada por factores de liberación, la secreción de PRL está regulada por un factor inhibidor, la dopamina, que actúa en la hipófisis disminuyendo los niveles de cAMP atenuando la liberación y síntesis de PRL y la división de los lactótrofos (Tejadilla, Cerbon et al. 2010).

Basados en estudios funcionales y anatómicos, dos sistemas dopaminérgicos que regulan la PRL han sido identificados: el tuberoinfundibular (TIDA) y el tuberohipofisiario (THDA) (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001). Refinamientos posteriores en las técnicas de localización neuronal revelaron que la mayoría de las neuronas THDA se originan en el núcleo periventricular y siendo así llamado el sistema dopaminérgico periventricular-hipofisiario (PHDA) (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001).

Únicamente las neuronas del núcleo arqueado y el núcleo periventricular están directamente relacionados con el control de la secreción de PRL (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001). De los tres sistemas dopaminérgicos, las neuronas TIDA juegan el papel predominante en el control de la liberación de PRL. Evidencia sustancial, basada en la medición de dopamina en sangre, ha ayudado a determinar que la actividad de las neuronas TIDA está alterada por numerosas condiciones fisiológicas, que se sabe, afectan la liberación de PRL (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001).

Se ha demostrado que existe un periodo crítico post-natal para la iniciación de la retroalimentación por PRL para el correcto desarrollo de las TIDA (Phelps et al., 2003).

El lactótrofo es una célula endócrina con una elevada actividad secretoria basal única. La inhibición por dopamina, que mantiene bajos niveles circulantes de PRL, requiere una entrada continua y elevada de dopamina (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001).

Debido a la ausencia de hormonas glandulares que provean un control por retroalimentación sobre los lactótrofos, la PRL regula su propia liberación actuando en los sistemas dopaminérgicos hipotalámicos.

Este tipo de interacción, llamado retroalimentación de arco corto, es responsable de la homeostasis de PRL. Numerosos estudios han establecido que un incremento de PRL endógena o exógena resulta en una mayor actividad de las neuronas TIDA, mientras que una disminución en los niveles de PRL circulante disminuye su actividad (Ben-Jonathan and Hnasko 2001).

Las neuronas TIDA responden tanto a cambios agudos como crónicos de PRL con pocas excepciones, e.g. durante el embarazo, la lactancia, y la presencia de prolactinomas, donde observamos que las neuronas dopaminérgicas se vuelven refractarias a los niveles elevados de PRL, manteniendo así una hiperprolactinemia fisiológica y/o patológica (Ben-Jonathan and Hnasko 2001).

En el eje neuroendocrino, la disfunción de la dopamina o sus receptores son la causa de la hiperprolactinemia y perturbaciones reproductivas. Se ha establecido que la dopamina es el principal regulador de la liberación y expresión de PRL. Por otro lado, entre los numerosos factores capaces de estimular la liberación de PRL, no se ha logrado elucidar el factor liberador de PRL (PRF) (Ben-Jonathan and Hnasko 2001).

Debe ser enfatizado que la PRL por sí misma, no inicia el comportamiento materno, sino que provoca una disminución en el tiempo de latencia del mismo. Aunque ha sido descrito ampliamente en ratas, existen numerosos reportes referentes a los efectos de la PRL en la inducción y mantenimiento de esta conducta en ratones, conejos, hamsters y ovejas (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

Los efectos de la PRL a nivel lúteo dependen de la especie y el estadio del ciclo reproductivo. En los roedores la PRL puede ser luteotrófica o luteolítica dependiendo de si hubo apareamiento o no (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

La acción luteotrófica, está caracterizada por una secreción aumentada de progesterona, siendo ésta esencial para la implantación del óvulo fertilizado, el mantenimiento del embarazo y la inhibición de la ovulación (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

La acción luteolítica consiste en la inducción de la muerte celular programada en el cuerpo lúteo. El efecto luteolítico de la PRL parece ser mediado por linfocitos CD3, que incrementan la expresión de factores que regulan la muerte lútea (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

El mecanismo por el cual la PRL puede ser tanto luteolítica como luteotrófica es aún desconocido, aunque se ha sugerido que en ciertos estadios del ciclo reproductivo el cuerpo lúteo adquiere la capacidad de expresar factores quimioatrayentes de monocitos, que de manera subsecuente interactúan con la PRL para inducir la muerte celular lútea (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

La PRL también se ha asociado con fertilidad disminuida durante la lactancia para así dirigir las reservas energéticas de la madre al neonato, en lugar de a un nuevo embarazo (Phelps et al., 2003). La PRL es liberada en respuesta a la succión, y estrés psicológico, y su expresión en el hipotálamo está aumentada en hembras lactantes y embarazadas.

La hipoxia y la isquemia inducen una fuerte activación de PRL en regiones de la corteza cerebral y a diferencia de la GH, la prolactina no está involucrada en el rescate neuronal sino en la respuesta gliogénica durante la recuperación ante daño cerebral (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008).

El ritmo de liberación de PRL en humanos es un ritmo circadiano que puede ser generado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

Los mecanismos candidato para la acción protectora de la PRL incluyen cambios en la neurotransmisión glutamatérgica, efectos antiapoptóticos y regulación de la expresión de factores neurotróficos en el hipocampo (Tejadilla, Cerbon et al. 2010). Se ha demostrado previamente, que la PRL protege la neurogénesis en el ganglio dorsal de ratones estresados de forma crónica (Torner, Karg et al. 2009).

La PRL también es liberada a la circulación sistémica en respuesta a las convulsiones epilépticas y el tratamiento a largo plazo con la hormona modula la actividad de las convulsiones. La PRL es conocida como un mitógeno de la astrogliá que participa en las acciones neuroprotectoras de los estrógenos (Tejadilla, Cerbon et al. 2010).

La PRL funciona como mitógeno, tanto como un factor de supervivencia en las células del sistema inmune al promover la supervivencia de linfocitos y puede tener funciones similares en el cerebro (Ben-Jonathan and Hnasko 2001). El potencial mitogénico de PRL ha sido probado en distintas especies y etapas embrionarias, y se ha demostrado que induce considerablemente la proliferación, y mantenimiento de la diferenciación astrocítica (Mangoura et al., 2000). El efecto mitogénico de PRL requiere factores derivados del suero lo que sugiere que podría funcionar como un coactivador. Los estrógenos afectan la homeostasis de la PRL en numerosos sitios anatómicos, incluidos el hipotálamo, la hipófisis posterior y anterior (Ben-Jonathan and Hnasko 2001).

La PRL es un mediador común de la red neuroinmunoendócrina, teniendo un papel fundamental en la regulación de las respuestas celular y humoral del sistema inmune en estados tanto fisiológicos como patológicos, así como en las enfermedades autoinmunes (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

2.7 CaMKII α .

Los cambios internos de Ca²⁺ son detectados por múltiples proteínas sensibles a Ca²⁺, la más ubicua de estas es la calmodulina (CaM). Los complejos Ca²⁺/CaM interactúan y modulan la función de un enorme número de proteínas (Soderling, 2000).

Siendo el principal receptor intracelular de elevación de calcio la CaM puede activar varias proteína cinasas dependientes de complejos Ca²⁺/CaM incluida la cinasa fosforilasa, la cinasa de la cadena ligera de miosina, así como varias Ser/Thr cinasas (CaMKs).

CaMKII es la única cinasa multifuncional en este grupo, es abundante en tejidos neuronales y varias familias de isoenzimas existen en distintas células y tejidos (Tokui et al., 1990).

La CaMKII es muy abundante en el cerebro, particularmente en la densidad postsináptica (PSD). En los mamíferos, la CaMKII se encuentra codificada por una familia de 4 genes α , β , γ , y δ , todas las isoformas son detectables en el cerebro, pero las isoformas α y β están sobreexpresadas (Okamoto et al., 2009).

Estudios estructurales han revelado que la CaMKII es un oligómero compuesto por entre 10–14 monómeros en simetría rotacional. La autofosforilación en Thr 286 se lleva a cabo entre monómeros adyacentes de forma regenerativa, lo que nos indica que si una subunidad es desfosforilada, la unidad adyacente la refosforila.

Debido a esta propiedad única, se ha considerado que la CaMKII es un candidato ideal para controlar la cascada de eventos que sostienen la transmisión tras la inducción de la LTP (Okamoto, Bosch et al. 2009).

La actividad de CaMKII está muy regulada. En estado inactivo, el núcleo catalítico se encuentra ocluido por un dominio de autoinhibición. Durante la LTP, la entrada de Ca^{2+} a través de NMDARs conllevan la formación de complejos $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Este complejo relaja la autoinhibición al unirse al dominio regulatorio de CaMKII que se encuentra localizado de forma adyacente al dominio de autoinhibición, exponiendo así la región autocatalítica.

Una vez ocurrido este evento, ocurre la autofosforilación de la Thr 286 localizada dentro del dominio de autoinhibición que permite la actividad constitutiva de cinasa, aún cuando la concentración de Ca^{2+} regrese al estado basal (Okamoto, Bosch et al. 2009). La CaMKII es una de las tres principales proteínas cinasas identificadas en el cerebro, y conforma entre el uno al dos por ciento del contenido proteico del hipocampo.

Es una cinasa multifuncional que desempeña distintos papeles en la plasticidad cerebral y el daño neuronal postisquémico (Osuka et al., 2002). La fosforilación de proteínas es uno de los fenómenos regulatorios más comunes, las neuronas contienen niveles elevados de distintas proteínas cinasas (Soderling 2000). CaMKII es una cinasa multifuncional que transduce numerosas señales neuronales asociadas a Ca^{2+} . Se ha supuesto un mecanismo decodificante debido a su particular capacidad de autofosforilarse (Soderling 2000)).

La sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) es fosforilada directamente por CaMKII, llevando a la disminución de su actividad enzimática *in vitro* e *in situ*, además de llevar a cabo esta acción en el hipocampo postisquémico. Desarrollando un rol neuroprotector que es necesario elucidar. (Osuka, Watanabe et al. 2002)

Las neuronas utilizan la dependencia de frecuencia de la transmisión sináptica para iniciar cambios que llevan a la plasticidad sináptica. En las sinapsis glutamatérgicas excitatorias, la plasticidad sináptica dependiente de frecuencia, como la LTP y la depresión a largo plazo (LTD) son disparadas por niveles incrementados de Ca^{2+} en las espinas postsinápticas (Soderling 2000).

Dos características de la LTP están contenidas en las propiedades moleculares de CaMKII: la decodificación de la frecuencia de la estimulación sináptica y el dar una respuesta prolongada después de una elevación pasajera de Ca^{2+} (Soderling 2000).

La inducción de LTP en la región CA1 del hipocampo genera en 5 minutos CaMKII autofosforilada. Varios estudios señalan que esta proteína activada puede translocarse a la PSD y que una de sus proteínas blanco es el NMDAR (Soderling 2000).

Otra proteína de la PSD regulada por CaMKII es el AMPAR. La corriente de AMPAR es potenciada durante la LTP. Numerosos estudios han documentado que CaMKII puede fosforilar la subunidad GluR1 de AMPAR y elevar su corriente.

La fosforilación de GluR1 en Ser 831 por CaMKII incrementa la potencia de la corriente de AMPAR. De hecho aproximadamente 60% de las neuronas de CA1 que muestran potenciación durante la LTP muestran un incremento en la conductancia unitaria (Soderling 2000).

Existe evidencia de un papel para CaMKII en la formación y/o estabilización de las sinapsis. En *C. Elegans* CaMKII parece ser necesaria para un tráfico normal de los GluRs desde el cuerpo celular y para su agrupamiento en las sinapsis neuromusculares (Soderling, 2000).

Las proteínas del citoesqueleto son objetivos potenciales para CaMKII, debido a que severas alteraciones en la arquitectura del citoesqueleto ocurren en respuesta a la estimulación por señales extracelulares que elevan la concentración de Ca²⁺.

Las proteínas del citoesqueleto como la miosina cerebral, neurofilamentos y GFAP son fosforilados *in vitro* por esta cinasa (Tokui, Yamauchi et al. 1990).

Se ha reportado que el mRNA que codifica la subunidad α de CaMKII se encuentra presente a lo largo de las capas que contienen las dendritas del estrato piramidal y del giro dentado (Steward and Wallace, 1995).

Uno de los mRNAs más abundantes en las dendritas codifica la subunidad α de CaMKII. La inducción de LTP da como resultado un incremento selectivo de CaMKII α en las dendritas (Soderling 2000). Debido a que esta última no se expresa en altos niveles en la glia, se puede asociar el marcaje en la lámina dendrítica a neuronas y no a células gliales o sus procesos (Steward and Wallace 1995). El marcaje para la subunidad es mucho mayor en el cuerpo celular, aunque también está presente a lo largo del *stratum radiatum* y el *stratum moleculare* en una densidad bastante similar. (Steward and Wallace 1995).

2.8 GFAP.

El sistema nervioso central de los vertebrados está compuesto principalmente por dos clases heterogéneas de células, las neuronas y la glia. Toda la información que se tiene hasta el momento indica una dependencia mutua entre neuronas y la glia para su supervivencia y expresión fenotípica. Las neuronas son la unidad funcional del CNS, mientras las células de la glia ayudan a la migración neuronal durante el desarrollo del cerebro, están además involucradas en proveer señales neurotróficas requeridas para la supervivencia, proliferación y diferenciación neuronal (Gomes et al., 1999a).

Comprenden una familia heterogénea de células morfológica y funcionalmente distintas cuya plasticidad estructural está mantenida principalmente por una red de filamentos que consiste principalmente de vimentina y la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) (Gomes et al., 1999b). Además, la forma y polaridad neuronales son modulados por poblaciones heterogéneas de astrocitos, lo que es fundamental para la correcta formación de los circuitos neuronales (Gomes, Garcia-Abreu et al. 1999).

GFAP es la proteína que conforma mayoritariamente los filamentos intermedios (IFs) de los astrocitos maduros. Los IFs (10 nm) son componentes mayores del citoesqueleto de las células eucariotas y parecen tener un papel importante manteniendo la organización del espacio citoplasmático (Inagaki et al., 1990). Aunque los mayores componentes estructurales de los microtúbulos y los microfilamentos, tubulina y actina, están altamente conservados en distintos tipos celulares, las proteínas constitutivas de los IFs pueden variar enormemente en secuencia y longitud.

Los IFs están agrupados en 4 distintos grupos: 1) Keratina ácida del epitelio, 2) Keratina básica-neutra del epitelio, 3) Vimentina en las células mesenquimales, desmina en músculos y GFAP en la astroglia, y 4) los neurofilamentos del sistema nervioso (Inagaki, Gonda et al. 1990).

Los IFs sufren cambios dinámicos durante la mitosis, movimiento celular y en procesos patológicos. Se ha demostrado una relación temporal entre los cambios en la organización de los IFs y alteraciones en la fosforilación de las proteínas que los conforman.

Además de haberse demostrado que la fosforilación de los filamentos formados por GFAP, vimentina y desmina conlleva el desacople de los mismos, la GFAP existe fosforilada y sin fosforilar, y se ha obtenido evidencia de que puede servir como sustrato de la proteína cinasa dependiente de cAMP y la proteína cinasa C.

Lo que lleva a especular que la fosforilación de los filamentos es fundamental para la organización del citoesqueleto. Otros factores como la fuerza iónica, y la concentración de $MgCl_2$ y $CaCl_2$ tienen efectos en la formación de filamentos de GFAP (Inagaki, Gonda et al. 1990).

Inicialmente la GFAP fue aislada de placas escleróticas, y ha sido reconocida ampliamente como un marcador de diferenciación astrocítico, siendo el filamento intermedio característico de las células astrocíticas maduras ya que antes de la diferenciación celular el filamento intermedio más abundante es la vimentina.

Los niveles de proteína y de mRNA de GFAP tienden a incrementarse en algunas regiones como el hipocampo, el estriado y la corteza, lo que usualmente corresponde al incremento de astrocitos reactivos. Dicho incremento durante la senescencia es uno de los marcadores más generalizados para el envejecimiento cerebral (Gomes, Paulin et al. 1999).

La evidencia acumulada en el pasado demuestra que los astrocitos tienen una variedad de papeles para el mantenimiento de la fisiología normal del cerebro así como para la secreción de diversos compuestos activos, la formación de la barrera hematoencefálica, el metabolismo de distintos neurotransmisores y el mantenimiento del balance iónico en el medio extracelular (Gomes, Paulin et al. 1999).

La acumulación de fibras gliales es la señal histológica de la respuesta astrocítica al daño al sistema nervioso, llamada formalmente gliosis. Se caracteriza por la proliferación de astrocitos y la sobreexpresión de GFAP (Gomes, Paulin et al. 1999). La abundancia de GFAP en estas células y su alta conservación dentro de los vertebrados sugeriría que tiene un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso central (Messing and Brenner, 2003).

Así pues se creía que el fenotipo GFAP $-/-$ no era compatible con la vida. Sin embargo, tras experimentos realizados con ratones knock-out para la proteína GFAP han demostrado que la ausencia de la misma trae cambios sutiles en los procesos astrocíticos, como la habilidad de los mismos para inducir o mantener la barrera hematoencefálica en el endotelio, llegándose a reportar degeneración de la mielina y cambios en la transmisión sináptica y LTP aumentada en el hipocampo. Asimismo, se ha señalado como la principal causante de la enfermedad de Alexander (Messing and Brenner 2003).

La expresión de GFAP se incrementa de forma progresiva durante el envejecimiento en humanos, ratones y conejos. Al ser medidos los niveles de proteína y el mRNA de la misma, se sabe que la expresión incrementada se debe a una elevación en la transcripción (Finch, 2003). Existe la hipótesis de que este aumento en la transcripción de GFAP sea provocada por un incremento en el número de proteínas dañadas por oxidación, en el que la lenta acumulación de daño oxidativo activa la transcripción de GFAP y otros genes gliales.

La expresión elevada de GFAP incrementa el volumen astrocítico que a su vez expande el área de contacto entre las neuronas y las membranas de los astrocitos (Finch 2003).

El incremento de GFAP, similar en roedores y humanos envejecidos, es importante debido a que los roedores no desarrollan los cambios producidos por la enfermedad de Alzheimer a menos que sean transfectados con genes humanos de la enfermedad de Alzheimer (Finch 2003).

Aunque aún existe controversia sobre la función cerebral de GFAP en la fisiología y patogenia del cerebro, se ha acumulado evidencia suficiente de que este filamento intermedio tiene un papel activo y relevante para el desarrollo del cerebro y es parte importante de la respuesta activa a casi cualquier herida al CNS (Gomes, Paulin et al. 1999).

2.9 MDK.

La proteína midkine (MDK) es un factor de unión a heparina y es producto de un gen de respuesta a ácido retinoico (RA). Descubierta por screening de genes inducidos durante la diferenciación de células cancerosas embrionarias, el RA induce la expresión de la proteína al unirse al elemento de respuesta a RA (Kadomatsu and Muramatsu, 2004).

La MDK también es un factor de crecimiento que pertenece a las proteínas de unión a carbohidratos y junto con la pleiotropina (PTN) forma una familia de proteínas, teniendo ambas una homología del 50% en su secuencia (Muramatsu, 2010).

Las funciones biológicas de la MDK residen en el extremo C-terminal e.g. el crecimiento de neuritas, fibrinólisis y migración de células nerviosas.

La proteína asociada al receptor de LDL (LRP) es un importante receptor de MDK asociado a la enfermedad de Alzheimer que protege a las células nerviosas de la muerte por proteína beta amiloide, teniendo la MDK un efecto neuroprotector (Kadomatsu and Muramatsu 2004). Los receptores a MDK consisten de proteoglicanos sobresulfatados, del tipo Tyr-cinasas (Muramatsu et al., 2006).

La MDK tiene varias funciones *in vitro*, la supervivencia de neuronas embrionarias, crecimiento de fibroblastos, aumento del crecimiento y supervivencia de precursores neuronales sin inhibir su capacidad de diferenciación, la formación de sinapsis, la maduración folicular y la expresión de quimiocinas (Muramatsu 2010).

Desempeñando también un papel angiogénico, y un papel fundamental en el correcto desarrollo de los órganos reproductivos femeninos, el control de las actividades reproductivas y la maduración de los ovocitos (Muramatsu, Zou et al. 2006).

La MDK tiene acción en el crecimiento de las neuritas además de ser mitogénica, siendo características interesantes su papel en el desarrollo neuronal y la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas y su presencia en diversos tumores malignos (Muramatsu, Zou et al. 2006).

La MDK es rica en aminoácidos básicos, tiene un peso molecular aproximado de 13 kDA, y está compuesta principalmente por dos dominios unidos por puentes disulfuro. El carbono terminal tiene actividad de unión a heparina, compuesto cada dominio por tres hojas β plegadas. La MDK tiende a formar dímeros de manera espontánea, estabilizados por unión cruzada con transglutaminasa, siendo ésta necesaria para la actividad de la proteína (Muramatsu 2010).

La MDK promueve el crecimiento, la supervivencia, la migración y la expresión génica de varias células diana. Se encuentra involucrada en la reproducción, la reparación y también juega un papel patológico en distintas enfermedades (Muramatsu 2010).

La proteína en cuestión es inducida en astrocitos reactivos en humanos durante infarto cerebral y por insultos isquémicos en modelos animales, dándose a notar que la MDK también se expresa fuertemente en neuroblastomas, astrocitomas y neurofibromas y se detecta en las placas seniles y ovillos neurofibrilares en pacientes de Alzheimer además de disminuir la toxicidad de la proteína beta amiloide al unirse a esta última, lo que ha llevado a sugerir que la MDK está estrechamente relacionada a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Kadomatsu and Muramatsu 2004).

La expresión de la MDK se ve inhibida por los glucocorticoides, y la hipoxia induce la expresión de la MDK. La expresión de la misma está estrictamente controlada durante la embriogénesis, siendo los niveles de expresión en tejidos adultos muy baja o nula (Muramatsu 2010).

Se ha propuesto el utilizar esta proteína como marcador tumoral debido a su limitada expresión en tejidos normales comparada a la sobreexpresión de la misma en el desarrollo de cáncer en numerosos tejidos, además de ser detectada fácilmente al ser una proteína que se secreta (Kadomatsu and Muramatsu 2004).

La sobreexpresión de MDK en numerosos tumores malignos humanos, es atribuida a las condiciones hipóxicas en los tumores (Muramatsu 2010). Además de en tejidos dañados, particularmente tras isquemia, en vasos sanguíneos, la corteza cerebral y el miocardio, teniendo dos efectos: aumento de la inflamación y la promoción de la supervivencia y la reparación del daño, dependiendo de la cascada de señalización subsecuente al daño (Muramatsu 2010).

La MDK regula la supervivencia y crecimiento celular a través de la cinasa IP3, aunado a su presencia en distintos tipos de cáncer, los niveles en orina y en suero se han vuelto marcadores de diagnóstico para distintos tumores, además de estar estrechamente relacionada con la carcinogénesis, indicando que la MDK podría ayudar al tratamiento de numerosos carcinomas (Dai, 2009).

Se espera que los inhibidores de MDK resulten útiles en el tratamiento del cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, hipertensión, enfermedades renales, mientras que la propia MDK es promisorio para el tratamiento de daño isquémico cerebral, degeneración de la retina y falla cardiaca (Muramatsu 2010).

Se ha observado en ratones knock-out para PTN y MDK una baja tasa de nacimientos, bajo peso corporal e infertilidad en las hembras. Ya que este último es el fenotipo más significativo se ha analizado el mecanismo causante de la infertilidad, encontrándose deficiencias en la actividad de los órganos reproductivos femeninos así como en la maduración de los ovocitos, anomalías en la cavidad vaginal y el ciclo estral (Muramatsu, Zou et al. 2006).

2.10 TRH.

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) es el principal neuropéptido hipotalámico que evoca la hormona estimulante de la tiroides (TSH), y puede también incrementar la liberación de PRL y GH (van den Pol, 2010)

La TRH fue aislada de extractos hipotalámicos debido a su efecto en la liberación de TSH de la hipófisis murina, y de forma subsecuente de un extracto dérmico de rana, descubriéndose que sus estructuras eran idénticas. De hecho la estructura de la hormona se ha conservado a lo largo de todo el *phylum* vertebrado, lo que indica que una presión evolutiva bastante fuerte ha actuado para preservar su estructura (Galas et al., 2009).

En el CNS, el gen de TRH es altamente expresado en numerosos tejidos cerebrales y en la espina dorsal, además de en numerosos órganos periféricos, incluidos la hipófisis, tiroides, placenta, páncreas y testículos (Galas, Raoult et al. 2009).

La TRH es una amida tripeptídica derivada de la proTRH. La proTRH contiene múltiples repeticiones de Gln-His-Pro-Gly.

La proTRH es cortada por dos enzimas prohormonales, PC1/3 y PC2, en progenitores de TRH y múltiples péptidos crípticos, para luego sufrir modificaciones postraduccionales: amidación de la glicina del C-terminal, y la conversión de la glutamina en piroglutamina. La maduración de la TRH ocurre en la región trans del aparato de Golgi y en las vesículas de la ruta secretora regulada (Fekete and Lechan, 2007).

En roedores, la población predominante de células que expresan el mRNA de la proTRH está localizada en el área preóptica, en el núcleo paraventricular, en los núcleos dorsomedial, lateral y en el núcleo arqueado.

En el ser humano, las células inmunoreactivas a TRH están presentes en la cara caudo dorsal del núcleo paraventricular, en el núcleo supraquiasmático, y una densa red de fibras en la eminencia media (Galas, Raoult et al. 2009).

En mamíferos la TRH también está presente en el lóbulo anterior de la hipófisis, lo que sugiere que el péptido pueda participar en la regulación parácrina de la actividad celular adenohipofisiaria (Galas, Raoult et al. 2009). Mientras que la TRH sirve como un regulador neuronal en la mayoría de estas poblaciones neuronales, en las neuronas TRH hipofisiarias, encargadas de regular la secreción de TSH en la hipófisis anterior, la TRH funciona primordialmente como una neurohormona (Fekete and Lechan 2007).

La TRH estimula la liberación de TSH a través de la unión a receptores específicos en la membrana plasmática de la célula hipofisiaria. El receptor de TRH es un receptor acoplado a proteína G, que participa en la secreción de TSH. Además, estimula la liberación de PRL. Y ya que las células productoras de PRL responden directamente a la TRH, se asume que la TRH actúa directamente sobre la hipófisis (van den Pol, 2010).

Aunque la TRH fue el primer factor hipofisiario hipotalámico en aislarse, sus receptores fueron caracterizados mucho después que los receptores para otros factores hipofisiarios (Galas, Raoult et al. 2009). Así como la mayoría de los neuropéptidos, la TRH actúa a través de receptores, llamados TRHRs, los cuales tienen 7 dominios transmembranales acoplados a proteína G (Galas, Raoult et al. 2009).

En mamíferos, se han identificado dos tipos de TRHRs: TRHR1 y TRHR2 ambos presentes en ratas y ratones. De forma interesante, en seres humanos sólo se ha logrado clonar el TRHR1, que se expresa de forma significativa en el lóbulo distal de la hipófisis, indicando que en los mamíferos las acciones hipofisiarias de la TRH son mediadas por TRHR1 (Galas, Raoult et al. 2009).

Aunque la TRH fue nombrada originalmente debido a su capacidad de aumentar la liberación de TSH, actualmente existe evidencia que señala a la TRH como un péptido con diversas funciones hipofisarias especie específicas (Galas, Raoult et al. 2009).

Existen principalmente dos tipos distintos de células sensibles a TRH, los tirotrofos y los lactótrofos, constituyendo aproximadamente el 90% de las células que unen TRH de la hipófisis anterior (Fekete and Lechan 2007).

La principal función de la TRH es el mantenimiento de la homeostasis de las hormonas tiroideas, a través de la regulación de la liberación de TSH a partir de los tirotrofos. Además regula la actividad biológica de la TSH controlando la glicosilación de la misma (Fekete and Lechan 2007).

2.11 YWHAG.

Las proteínas 14-3-3 son una familia de proteínas ácidas regulatorias que se encuentran presentes en todos los eucariotas. A través de la modulación funcional de una enorme gama de moléculas capaces de unírseles, son importantes en numerosos procesos biológicos (Obsilova et al., 2008). Las 14-3-3 fueron nombradas por Moore y Peres en 1967, durante una clasificación sistemática de proteínas cerebrales basadas en su patrón de bandas tras someterlas a una cromatografía DEAE, y la subsecuente electroforesis en geles de almidón.

Aunque expresadas en todos los tejidos eucariotas, su mayor nivel de expresión es en el cerebro, representando el 1% de las proteínas solubles del compartimiento citoplasmático, membrana plasmática y organelos intracelulares (Dong et al., 2010).

La familia está conformada por siete miembros identificados por letras griegas β , ϵ , γ , η , σ , τ , y ζ . Todas tienen buena capacidad de unión debido a su estructura altamente conservada y sus ligandos requieren tres o cuatro aminoácidos específicos, incluyendo la fosforilación de residuos de serina o treonina en la secuencia (Dong, Zhao et al. 2010).

La familia 14-3-3 también es conocida como Ywha o Proteínas activadoras de Tirosina 3-monooxigenasa/Triptófano 5-monooxigenasa. Una nomenclatura alterna de los genes de la 14-3-3 sería la siguiente: 14-3-3 β , Ywhab; 14-3-3 ϵ , Ywhae; 14-3-3 γ , Ywhag; 14-3-3 η , Ywhah; 14-3-3 σ , Ywhas; 14-3-3 τ , Ywhaq; 14-3-3 ζ , Ywhaz (Gouraud et al., 2007). Las distintas isoformas de las 14-3-3 muestran un cierto grado de especificidad tisular y están presentes a distintas concentraciones en distintos tejidos (Sun et al., 2009).

Se encuentran ampliamente conservadas a lo largo de distintas especies, y existen organismos que expresan múltiples isoformas. Todas las proteínas de la familia pueden formar homo y heterodímeros, cada monómero está constituido por 9 α -hélices antiparalelas (Obsilova, Silhan et al. 2008). Los dímeros tienen dos surcos anfipáticos en el centro que les permite interactuar con más de una proteína de forma simultánea, se han encontrado dos secuencias consenso de unión óptima a las 14-3-3: Arg-Ser-X-pSer-X-Pro y Arg-X-(Tyr/Phe)-X-pSer-X-Pro, siendo X cualquier aminoácido exceptuando cisteína (Obsilova, Silhan et al. 2008).

La proteína es realmente rígida por la extensa interacción entre las hélices, siendo la región más flexible el C-terminal, que es también la región más variable entre las distintas 14-3-3 (Obsilova, Silhan et al. 2008). La estructura helicoidal rígida provee la base funcional para la unión específica, el carboxilo terminal permite la unión alternativa, mientras que la región amino terminal forma la interfase para la dimerización, determinando así las combinaciones específicas de las distintas isoformas (Sun, Wong et al. 2009).

La función de las 14-3-3 puede ser clasificada con base en tres modos de acción: Cambiando la conformación de la molécula unida, ocluyendo secuencias específicas o características estructurales de la molécula unida y como andamio molecular para anclar proteínas y promover su interacción.

Casi todos los miembros de la familia se expresan de manera ubicua en todos los tejidos, uniéndose a sus dianas moleculares con alta afinidad. Se ha establecido que las propiedades de unión de las 14-3-3 están reguladas de forma post-traducciona por fosforilaciones específicas (Obsilova, Silhan et al. 2008).

Las 14-3-3 actúan como chaperonas, con movimiento libre desde el citoplasma hasta el núcleo y viceversa, siendo las 14-3-3 primordialmente citoplasmáticas (Mhaweck, 2005). Se ha considerado que pudieran fungir como un nuevo biomarcador para la detección de daño al CNS, ya que no existe duda de la importancia intrínseca de éstas en la resistencia a daño isquémico y la promoción de la supervivencia celular (Dong, Zhao et al. 2010).

Los sitios de fosforilación no se encuentran conservados entre las isoformas de las 14-3-3, dándose una regulación selectiva de las distintas 14-3-3, por lo que cada isoforma tiene un patrón de fosforilación específico, regulado por Ser/Thr cinasas, que se sabe están involucradas en la señalización y regulación celular (Obsilova, Silhan et al. 2008).

La actividad de las 14-3-3 puede ser interrumpida por la acción de fosfatasas que eliminen el sitio de unión, por fosforilación de la pareja de unión en sitios que desalojen a las 14-3-3 y por la fosforilación directa de las 14-3-3 que abroge su actividad de unión (Morrison, 2009).

Las 14-3-3 tienen distintos papeles en la regulación de distintas proteínas celulares. Mientras activan o estabilizan algunas proteínas, e inactivan otras. A través de la regulación funcional de una amplia gama de dianas, las 14-3-3 ayudan a la regulación del ciclo celular, control del metabolismo, apoptosis y transcripción génica. Por este motivo es difícil la asignación de un papel celular específico. Debido a su complejidad es necesaria mayor investigación para elucidar los mecanismos de acción específicos, así como la gama de interacciones completa de esta familia de proteínas (Obsilova, Silhan et al. 2008).

Siendo la función más común de las 14-3-3 el secuestro de proteínas del citoplasma, lo que lleva a la inhibición de la pareja de unión (Mhaweck 2005)..

A la fecha se han reportado más de 200 moléculas con capacidad de unión a las 14-3-3, descubriéndose que sólo hay una pequeña proporción de traslape entre las parejas de unión a las distintas isoformas de esta familia (Sun, Wong et al. 2009).

La unión a las 14-3-3 puede resultar en un aumento o disminución de la actividad de sus parejas de unión debido a cambios conformacionales (van Heusden, 2009).

Encontrándose también que las 14-3-3 se unen a proteínas membranales, modificando sus niveles de expresión en la superficie celular (Sun, Wong et al. 2009). Parece que las 14-3-3 son reguladores celulares cruciales gracias a sus extensas interacciones con cientos de proteínas moduladoras de eventos celulares.

Las parejas de unión a 14-3-3 se encuentran relacionadas al tráfico intracelular, la dinámica de unión entre células y polaridad celular, sugiriendo que las 14-3-3 se encuentran relacionadas con todos estos eventos fisiológicos (Sun, Wong et al. 2009).

La fosforilación es un mecanismo clave en la regulación de la biología celular y debido a que las interacciones con la 14-3-3 son dependientes de fosforilación, las 14-3-3 han emergido como componentes importantes de los procesos biológicos esenciales que son regulados por fosforilación, así como transducción de señales y regulación del ciclo celular (Morrison 2009). Existen modelos que predicen que la disociación de las 14-3-3 de sus parejas de unión desmantelan la maquinaria de supervivencia celular, forzando a las células a seguir la ruta de muerte por defecto (Porter et al., 2006).

Otra vía por la que las 14-3-3 tienen influencia entre la supervivencia y la muerte es el antagonismo con proteínas que promueven la muerte celular y la senescencia (Morrison 2009).

La neuroglobina (Ngb) tiene un papel protector importante durante el daño oxidativo al incrementar la expresión de la 14-3-3 γ , habiéndose demostrado que la supresión de la Ngb aumenta la vulnerabilidad a daño oxidativo por medio de un mecanismo de regulación a la baja de la 14-3-3 γ (Ye et al., 2009).

La 14-3-3 γ es un isotipo de la familia 14-3-3 y se piensa que tiene funciones neuroprotectoras contra insultos isquémicos con una fuerte capacidad de unión y múltiples funciones reguladoras, es expresada en los astrocitos (Dong, Zhao et al. 2010). La 14-3-3 γ es necesaria para el correcto desarrollo del cerebro y el corazón, se une a la proteína cinasa α (PKCA), p53 es fosforilada directamente por PKCA, lo que es crucial para la activación de p53 siendo 14-3-3 γ una proteína que modula la supervivencia celular y que controla la apoptosis (Komoike et al., 2010).

La 14-3-3 γ se ha detectado en líquido cefalorraquídeo de pacientes con daño cerebral, siendo considerado como un potencial marcador para la detección clínica de daño al sistema nervioso central y enfermedades del mismo (Dong, Zhao et al. 2010).

Experimentos de sobreexpresión y tratamiento con oligonucleótidos antisentido demostraron un incremento en la expresión de los niveles de 14-3-3 γ , sugiriendo que podría promover la supervivencia celular, mientras que el descenso en la expresión activa la apoptosis por isquemia (Dong, Zhao et al. 2010).

El mecanismo de protección se da cuando la 14-3-3 γ endógena se une a p-Bad y previene la entrada de Bad a la mitocondria para iniciar la apoptosis, llegándose a demostrar la sobreexpresión de 14-3-3 γ en condiciones de isquemia.

El incremento en la expresión de la 14-3-3 γ aumentaría su función neuroprotectora, indicando la importancia de ésta contra el daño isquémico (Dong, Zhao et al. 2010).

III. Diseño experimental y metodología.

3.1 Soluciones

TBE 10 x (25 mM)

54 g Trizma base.

27.5 g ácido bórico.

20 ml EDTA 0.5 M (pH 8).

Agua cbp 500 ml.

Se esterilizó por autoclave.

Gel de agarosa al 2% en TBE

1.6 g Agarosa.

180 ml TBE 0.5 x.

0.5 μ g /ml bromuro de etidio.

Amortiguador de carga para DNA 6 x (Loading Buffer)

0.25 % azul de bromofenol.

0.25 % xilencianol.

30.0 % glicerol.

Se preparó en condiciones estériles y se guardó a 4° C.

TRIzol reactivo para la extracción de RNA (Gibco BRL)

Tiocianato de guanidina

Fenol

β -mercaptoetanol

H₂O-DEPC

Se mezcló 1 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) con 9 ml de alcohol etílico absoluto y se aforó a 1000 ml con H₂O destilada.

Se dejó solubilizando con agitación por alrededor de 2 horas a 37 °C y se esterilizó por autoclave.

EDTA 0.5 M (pH 8)

186.1 g de Na₂EDTA*2H₂O (Etilendiaminotetraacetato de sodio).

800 ml de H₂O.

Se ajustó el pH a 8.0, se aforó a 1000 ml y se esterilizó por autoclave.

3.2 Animales

A lo largo de este estudio se usaron ratas hembra de la cepa wistar adultas (250-300g) vírgenes y ratas lactantes (18-20 días), las cuales fueron acomodadas de forma individual bajo condiciones de luz y temperatura controladas, con agua y comida disponibles *ad libitum*. Las ratas lactantes en la fase final de la lactancia fueron escogidas para este estudio y se compararon con ratas en metaestro, ya que ambas tienen niveles séricos semejantes de estradiol y progesterona, pero niveles diferentes de corticosterona (> 300 ng/ml ratas lactantes vs. < 300 ng/ml ratas en metaestro).

En el caso de las ratas lactantes las camadas fueron ajustadas a 8-10 crías, un día después de dar a luz. Las madres se mantuvieron sin molestias con las crías, y fueron usadas para los experimentos en el día 19 de lactancia, considerándose como la condición basal.

Los animales tratados recibieron una inyección intraperitoneal de vehículo (PBS) o KA (7.5 mg/kg), según correspondiera, siendo sacrificadas por decapitación 24 hr después.

Se siguió el ciclo estral de las ratas vírgenes (200-250 g) hasta observar cuatro ciclos regulares de 4 días de duración de forma continua. Se consideró el metaestro como el estado basal. Las ratas en esta etapa del ciclo estral recibieron el mismo tratamiento con vehículo (PBS) o KA (7.5 mg/kg) descrito anteriormente.

3.3 Disección del hipocampo medio

Todo el material utilizado en la disección se limpió con gasa estéril impregnada de RNase-zap para liberarlo de RNAsas. Las ratas se anestesiaron profundamente con éter y se procedió a sacrificarlas por decapitación.

Una vez obtenida la cabeza de las ratas se procedió a la disección: introduciendo una tijera de disección por el *fóramen mágnum* y realizando cortes a ambos lados del cráneo cuidando no dañar el cerebro, con alicatas se realizó un corte en medio de los ojos, para después con tijeras de disección delgadas cortar la línea media del cráneo y extraer el cerebro completo.

Previamente se preparó una caja *petri* sobre la que se colocó un trozo de papel filtro humedecido con agua DEPC en un recipiente con hielo. Sobre este papel se llevó a cabo la disección del hipocampo medio que una vez diseccionado se trasladó a tubos eppendorf de 2 ml con 700 µl de trizol.

3.4 Extracción de RNA

El RNA total se extrajo de los hipocampos provenientes de los diferentes grupos de ratas en estudio de la siguiente manera:

- 1.- En tubos nuevos y estériles se homogenizaron, con un sonicador, los hipocampos con 700 µl de Trizol.
- 2.- Se transfirieron las muestras homogenadas a tubos eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 140 µl de cloroformo. Se cerraron los tubos y se agitaron en el vortex por 30 seg.
- 3.- Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol, cloroformo y la porción superior acuosa incolora.

El RNA quedó en esta última fase, mientras el DNA y las proteínas se mantienen en la interfase y en la fase orgánica.

4.- Se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen igual de isopropanol. La muestra se mantuvo a 4°C durante toda la noche.

5.- Se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12,000 rpm a 4° C. El RNA se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta.

6.- Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80%. Se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4° C.

7.- Se removió el sobrenadante y se colocaron los tubos en sentido inverso sobre una gasa estéril y se secó la pastilla a temperatura ambiente, evitando la sequedad total de la pastilla para evitar la insolubilidad de la misma.

8.- Se disolvió la pastilla de RNA en 50 µl de H₂O-DEPC. Se hicieron diluciones 1:100 y se leyó la absorbancia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda: 260 y 280. Se determinó la concentración de RNA mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de absorbancia = 40 µg de RNA/ml. También se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbancias obtenida a 260 y 280 nm (260/280 nm).

3.5 Retrotranscripción del RNA (RT)

Se realizó la retrotranscripción del RNA total para obtener los cDNA . Con este objetivo se preparó la siguiente mezcla de reacción:

	Concentración final
RNA total	2 µg
Buffer RT	1 x: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3) 75 mM KCl 3 mM MgCl ₂
DTT	10 mM
dNTP's	0.5 mM de cada dNTP
RT m-MLV	400 unidades
Oligo (dT)	0.05 µg
H ₂ O	cbp 10 µl

Se mezclaron todos los reactivos en un tubo eppendorf y se incubó a 37°C por una hora. El control negativo consistió en una muestra de agua en sustitución del RNA y realizando una reacción paralela con el gen 18S para fines cuantitativos.

3.6 Síntesis de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos para detectar la expresión de los genes PRL, CaMKII α , GFAP, YWHAG, TRH y MDK y 18s fueron adquiridos. La secuencia de éstos se encuentra en la tabla siguiente:

	Oligo sentido	Oligo antisentido
PRL	AGAAAACCGCATCACCATTC	TCCTTAATGACCTCGCCATC
CaMKII α	GCTCTCAGCCAGAGATCACC	CTGGCATCAGCCTCACTGTA
GFAP	AGTCTGTTCTGGTGGCGACT	GAAGTGGGGCAGTCATTGAT
MDK	CCTGCAACTGGAAGAAGGAG	GCCTTTGACTTGGTCTTGGA
TRH	GGTGCTGCCTTAGACTCCTG	CTCCTCATCTGCCATGAATAC
YWHAG	GCCATGAAGAACGTGACAGAG	TCTTCTTCTCTCGTTGCCATCC
18s	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

Los fragmentos delimitan un fragmento de 170 pb del cDNA de PRL de rata que abarca de +276 a +446, un fragmento de 194 pb del cDNA de CAMKII α de rata que abarca de +185 a +379, un fragmento de 149 pb del cDNA de GFAP de rata que abarca de +1114 a +1244, un fragmento de 183 pb del cDNA de MDK de rata que abarca de +209 a +392, un fragmento de 182 pb del cDNA de TRH de rata que abarca de +298 a +480, un fragmento de 153 pb del cDNA de CAMKII α de rata que abarca de +221 a +374, y un fragmento de 155 pb del cDNA de 18s que abarca del +448 a +602 con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

3.7 Reacción en cadena de la polimerasa.

Se amplificó por medio de la técnica de PCR un fragmento de los genes de PRL, CAMKII α , GFAP, MDK, TRH, YWHAG y 18s. Se procedió a preparar la siguiente mezcla de reacción:

	Concentración final
Buffer PCR	1x : 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) 50 mM KCl
MgCl ₂	1 mM
dNTP's	0.2 mM de cada uno
Oligo Sentido	0.5 μ M
Oligo Antisentido	0.5 μ M
Taq DNA Polimerasa	2.5 unidades
H ₂ O	cbp 40 μ l

A 10 μ l de la reacción de RT se agregaron los 40 μ l de la mezcla de PCR. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad modelo MyCycler™ Thermal Cycler, efectuándose para todos los genes un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguidos de un número de ciclos y temperatura de alineamiento (T.A.) de los oligos específico para cada gen que se muestra en la siguiente tabla:

	Número de ciclos	T.A. (° C)
PRL	30	60
CAMKII α	25	60
GFAP	30	65
MDK	25	60
TRH	35	55.5
YWHAG	30	60
18 s	25	55

Seguido del ciclo de desnaturalización se llevó a cabo el número de ciclos correspondientes de la siguiente manera: 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de alineación de los oligos iniciadores a la temperatura correspondiente a cada uno y 1 ciclo de extensión a 72 °C. Al finalizar los ciclos se realizó un ciclo de extensión a 72 °C por 5 minutos. El número de ciclos utilizados en cada reacción nos aseguran encontrarnos en medio de la fase exponencial de la amplificación de la PCR.

3.8 Electroforesis de los productos de RT-PCR

Llevada a cabo la reacción de RT-PCR, se efectuó una electroforesis de los productos obtenidos de la siguiente manera:

1.- Se preparó un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de la siguiente manera:

	Concentración final	Cantidad necesaria para 180 ml de gel
Agarosa	2%	3.6 g
Bromuro de etidio	0.5%	9 μ g
TBE 0.5X	0.5%	180 ml

La agarosa se disolvió en TBE. Posteriormente se agregó el bromuro de etidio, se mezcló la solución y se vertió en el molde de la cámara de electroforesis.

2. Para el corrimiento de cada uno de los geles se prepararon las muestras de la siguiente manera: a los 50 μ l resultantes de la reacción de PCR se agregaron 10 μ l de Loading Buffer para DNA 6x y la mezcla se cargó en el gel. Cada uno de los geles se corrió a 90 volts por hora y media en amortiguador TBE 0.5 x.

3.9 Análisis densitométrico

Se obtuvieron las imágenes correspondientes a cada gel en una cámara UV y se procedió a analizar la densidad de área con el software UVP lifesciences.

3.10 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado y los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguida por la prueba de Tuckey para diferencias entre grupos. El programa de estadística Prisma Graph Pad fue utilizado para calcular los valores y dibujar las gráficas.

IV. Resultados y discusión.

4.1 Resultados

Expresión de los genes CaMKII α , GFAP, MDK, PRL, TRH y YWHAG a nivel de mRNA en el hipocampo de ratas lactantes y en la fase de metaestro del ciclo estral. Para conocer las diferencias en los niveles de los genes CaMKII α , GFAP, MDK, PRL, TRH y YWHAG a nivel de mRNA en el hipocampo de ratas lactantes y en la fase de metaestro del ciclo estral, con y sin tratamiento con KA, se hicieron los siguientes grupos de ratas: ratas en el día 19 de lactancia tratadas con vehículo; ratas en el día 19 de lactancia tratadas con KA; ratas en la etapa de metaestro tratadas con vehículo, ratas en la etapa de metaestro tratadas con KA, como se describe en la sección de animales.

Se sacrificaron los animales 24 h después del tratamiento e inmediatamente después de sacrificar a los animales, se disectó el hipocampo medio, y se procedió a extraer el RNA total del tejido por medio de la técnica del Trizol. La concentración y pureza de cada una de las muestras fue determinada mediante espectrofotometría de UV. A partir del RNA obtenido, se realizó la RT-PCR para amplificar el mRNA de cada gen estudiado, utilizando el gen 18s como control de carga interno. Se llevó a cabo la electroforesis de 25 μ l del producto de RT-PCR y se observó su corrimiento en un gel de agarosa al 2% con la ayuda de un transiluminador con filtro de emisión para bromuro de etidio.

Las bandas obtenidas por RT-PCR de cada gen correspondieron al tamaño del fragmento esperado: Los oligonucleótidos delimitan un fragmento de 170 pb del cDNA de PRL, un fragmento de 194 pb del cDNA de CAMKII α , un fragmento de 149 pb del cDNA de GFAP, un fragmento de 183 pb del cDNA de MDK, un fragmento de 182 pb del cDNA de TRH, un fragmento de 153 pb del cDNA de CAMKII α , y un fragmento de 155 pb del cDNA de 18s.

Se cuantificaron las bandas obtenidas mediante densitometría para cada uno de los experimentos. La expresión relativa del mensajero se obtuvo al corregir la expresión de cada gen contra el 18s. Para ello, se llevó a cabo el cálculo de la relación de la expresión del gen de interés relativa al de 18s para analizar los cambios en los niveles de expresión en cada uno de los estadios. En las gráficas se muestra el valor promedio \pm desviación estándar de 4 ó 5 animales.

La importancia estadística está indicada con asteriscos: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; y *** $p < 0.001$. Estos resultados se obtuvieron por medio de una ANOVA de una vía, y posterior prueba de Tuckey para diferencias entre grupos.

4.2 CaMKII α .

Expresión de CaMKII α en ratas en D1 y lactantes, con y sin tratamiento con KA

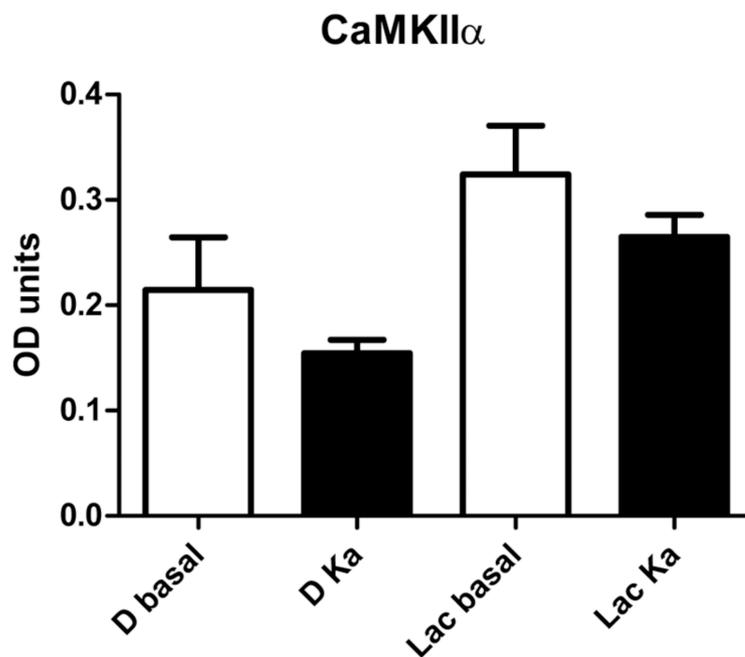
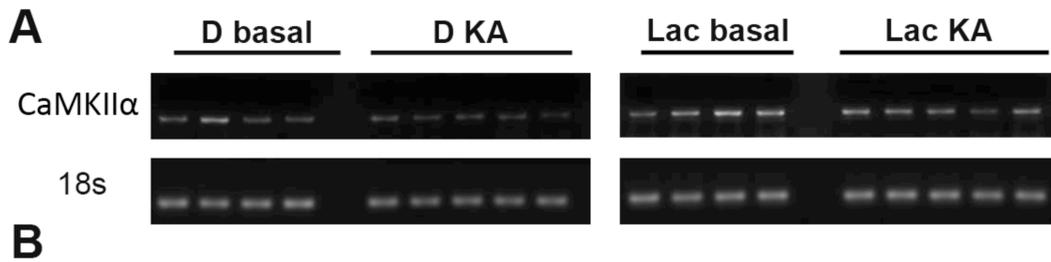


Figura 1. Expresión de CaMKII α en el hipocampo de ratas en la etapa de metaestro, o lactantes, con y sin el tratamiento con KA. A) Electroforesis de los productos de RT-PCR. B) Cuantificación densitométrica de la expresión de CaMKII α corregida respecto a la expresión de 18s. D, diestro; Lac, lactante, Ka, ácido kaínico

No se encontraron diferencias significativas para CaMKII α .

4.3 GFAP

Expresión de GFAP en ratas en D1 y lactantes con y sin tratamiento con KA

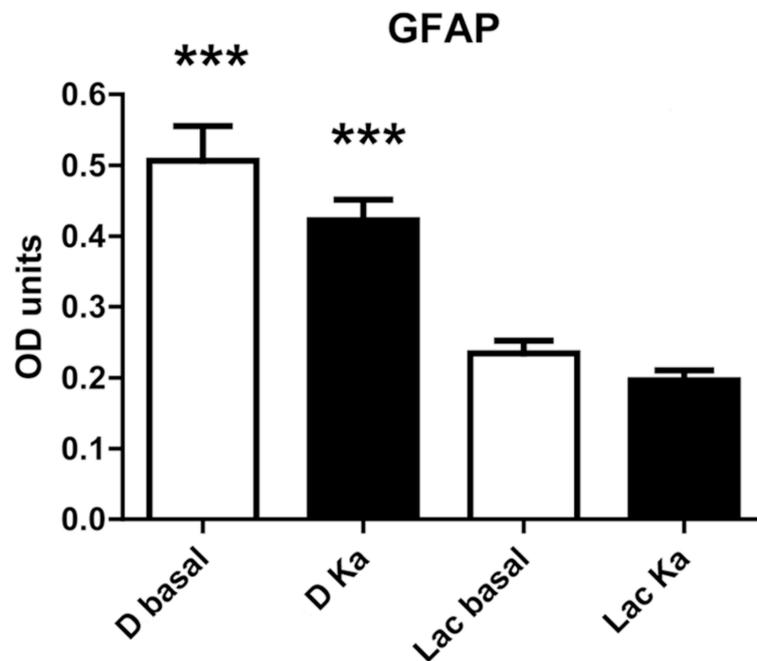
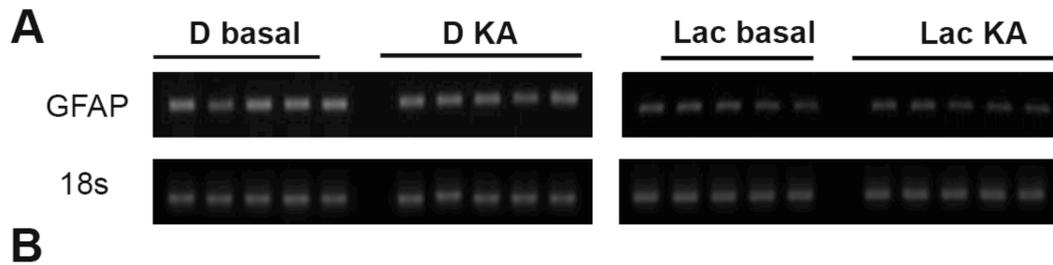


Figura 2. Expresión de GFAP en el hipocampo de ratas en la etapa de metaestro, o lactantes, con y sin el tratamiento con KA. A) Electroforesis de los productos de RT-PCR. B) Cuantificación densitométrica de la expresión de GFAP corregida respecto a la expresión de 18s. *** $p < 0.001$ D basal vs Lac basal y D KA vs Lac KA. D, diestro; Lac, lactante, Ka, ácido kaínico

Se observó una diferencia significativa entre D basal y Lac basal, siendo el nivel de expresión más alto en D basal, y entre D KA y Lac KA, siendo el nivel de expresión más alto en D KA.

4.4 MDK

Expresión de MDK en ratas en D1 y lactantes con y sin tratamiento con KA

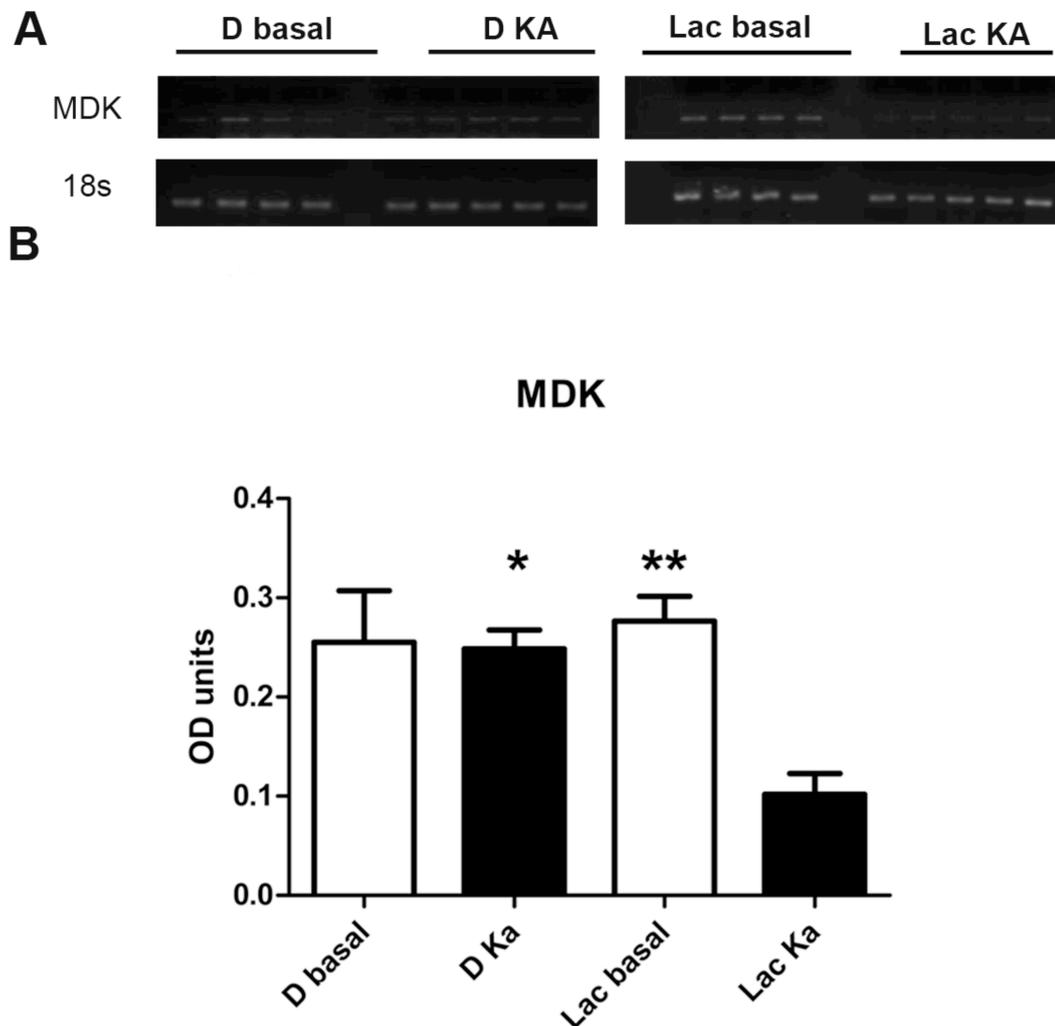


Figura 3. Expresión de MDK en el hipocampo de ratas en la etapa de metaestro, o lactantes, con y sin el tratamiento con KA. A) Electroforesis de los productos de RT-PCR. B) Cuantificación densitométrica de la expresión de MDK corregida respecto a la expresión de 18s. ** $p < 0.01$ Lac basal vs Lac KA; y * $p < 0.05$ D KA vs Lac KA.

Para MDK se encontró una diferencia significativa entre Lac basal y Lac KA, siendo el nivel de expresión más alto en Lac basal, y entre D KA y Lac KA, siendo el nivel de expresión más alto en D KA.

4.5 PRL

Expresión de PRL en ratas en D1 y lactantes con y sin tratamiento con KA

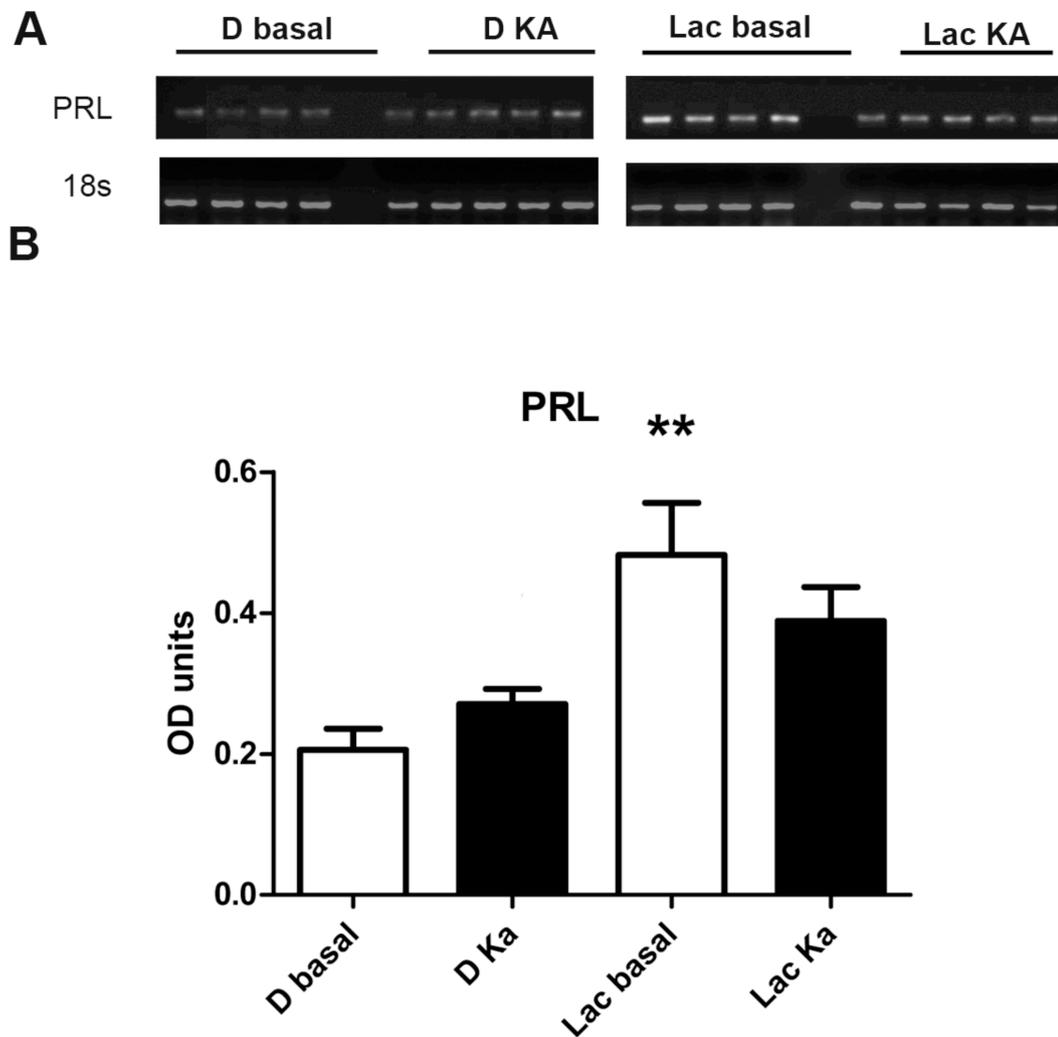


Figura 4. Expresión de PRL en el hipocampo de ratas en la etapa de metaestro, o lactantes, con y sin el tratamiento con KA. A) Electroforesis de los productos de RT-PCR. B) Cuantificación densitométrica de la expresión de PRL corregida respecto a la expresión de 18s. * $p < 0.05$ Lac basal vs D basal.

Para PRL se encontró una diferencia significativa entre Lac basal y D basal, siendo el nivel de expresión más alto en Lac basal.

4.6 TRH

Expresión de TRH en ratas en D1 y lactantes con y sin tratamiento con KA.

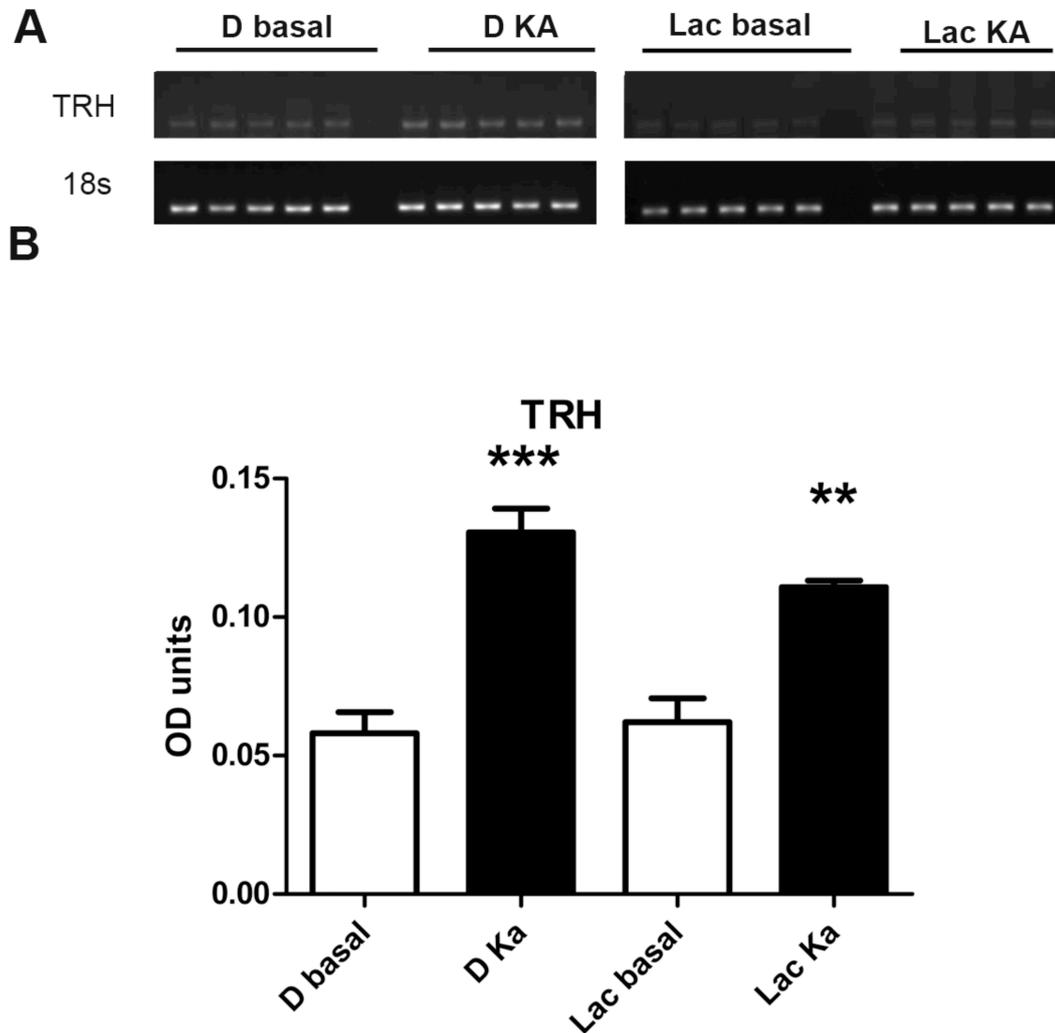
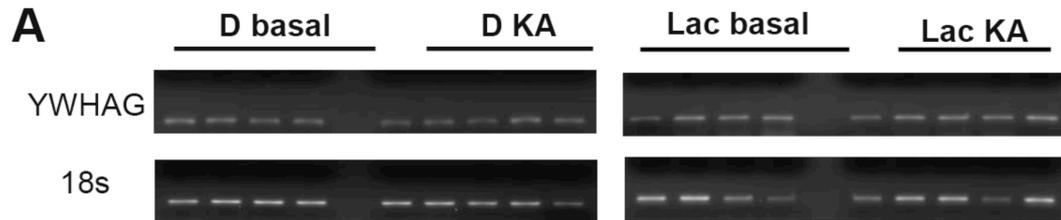


Figura 5. Expresión de TRH en el hipocampo de ratas en la etapa de metaestro, o lactantes, con y sin el tratamiento con KA. A) Electroforesis de los productos de RT-PCR. B) Cuantificación densitométrica de la expresión de TRH corregida respecto a la expresión de 18s. ** $p < 0.01$ Lac KA vs Lac basal; y *** $p < 0.001$ D KA vs D basal. D, diestro; Lac, lactante, Ka, ácido kaínico

Para TRH se encontró una diferencia significativa entre D KA y D basal, siendo el nivel de expresión más alto en D KA, y entre Lac KA y Lac basal, siendo el nivel de expresión más alto en Lac KA.

4.7 YWHAG

Expresión de YWHAG en ratas en D1 y lactantes con y sin tratamiento con KA



B

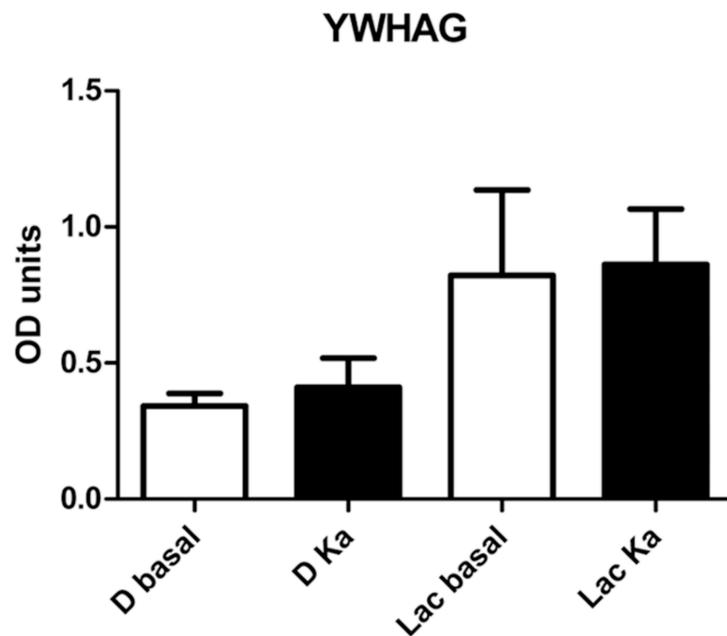


Figura 6. Expresión de YWHAG en el hipocampo de ratas en la etapa de metaestro, o lactantes, con y sin el tratamiento con KA. A) Electroforesis de los productos de RT-PCR. B) Cuantificación densitométrica de la expresión de Ywhag corregida respecto a la expresión de 18s. D, diestro; Lac, lactante, Ka, ácido kaínico

No se encontraron diferencias significativas para la YWHAG.

4.8 Discusión de resultados

Se ha reportado que la condición de lactancia previene el daño provocado por KA en el hipocampo y no solo lo retrasa (Cabrera, Cantu et al. 2009), por lo que se especula que el efecto neuroprotector de la lactancia en las neuronas del hipocampo, junto con una menor proliferación celular y una atenuación de la respuesta a estrés, podría funcionar para asegurar la supervivencia neuronal durante el embarazo y la lactancia (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008).

Por lo que se ha buscado determinar los cambios en la expresión génica durante la lactancia involucrados en la disminución de daño en el cerebro de la rata lactante.

Con este antecedente, se procedió a realizar el microarreglo de expresión en el hipocampo de la rata lactante tras la administración de KA comparando con ratas en la etapa de metaestro.

Tomando en cuenta que hay limitaciones existentes con la tecnología actual para detectar de forma fidedigna transcritos de baja expresión, y seguir por completo procesos fisiológicos complejos como la epileptogénesis, los microarreglos son una herramienta poderosa para analizar la regulación transcripcional en el cerebro. (Gu, Lynch et al. 2004).

En estudios previos se ha utilizado información dada por microarreglos de muestras tumorales para la identificación de diversas dianas con potencial terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de distintos tipos de cáncer (Stockwin, Vistica et al. 2009).

Debido a la enorme cantidad de genes evaluados mediante los microarreglos, y las posibles uniones inespecíficas que pudieran darse al momento de realizar este ensayo, es necesario validar los resultados obtenidos mediante una técnica de mayor sensibilidad y especificidad.

En el presente trabajo se llevó a cabo la cuantificación de los productos de la reacción de RT-PCR para cada uno de los genes blanco identificados mediante el microarreglo, con lo que se llevó a cabo una técnica con los parámetros necesarios para validar los resultados obtenidos del microarreglo.

A pesar de las diferencias cuantitativas observadas durante la validación, respecto a los resultados del microarreglo, no existen cambios en el comportamiento de la expresión de los distintos genes evaluados durante el presente estudio.

Al analizar de primera instancia los resultados obtenidos, se observaron cambios significativos en los niveles de expresión en la mayoría de los genes analizados, con CaMKII α y YWHAG como las únicas excepciones. Se observó un número considerable de cambios en los grupos lactantes, lo cual es justificable debido a los numerosos cambios endócrinos y regulatorios por los que pasan las hembras en torno al embarazo y la lactancia (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008).

Uno de los aspectos de plasticidad neuronal más estudiados durante el embarazo y la lactancia es el remodelado reversible de áreas del hipocampo. Existen reportes contradictorios que indican una reducción o incremento, en la cobertura astrocítica, que puede modular la actividad neuronal en vecindarios neuronales (Vanoye-Carlo, Morales et al. 2008; (Featherstone et al., 2000; Hatton and Zhao Yang, 2002).

PRL

Para la PRL se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de Lac basal vs D basal, siendo más altos los niveles de expresión en Lac basal. La PRL procedente de la hipófisis y fuera de esta, tiene efectos similares a un factor de crecimiento fisiológico en el CNS, así como en la regulación del ciclo sueño/vigilia, y es un conocido mitógeno para los astrocitos en cultivo.

El PRLR por sí mismo no demuestra una actividad de cinasa, pero desencadena señales a través de Tyr-cinasas de las familias JAK y Src. Se piensa que las JAKs son activadoras de las Stat que son las principales efectoras del crecimiento celular en tejidos dependientes de PRL, mientras que la activación de las Src está asociada a la señalización mitogénica en la mayoría de estirpes celulares (Mangoura, Pelletiere et al. 2000).

Se ha descubierto una elevación en los niveles de expresión de varios factores mitogénicos en distintos tipos de cáncer. Siendo la PRL uno de ellos, estando además involucrada en la supervivencia celular de cáncer de mama, y habiéndose descubierto la capacidad de los inhibidores de PRL de inhibir la proliferación celular *in vitro* y disminuir el crecimiento tumoral en ratones (Stockwin, Vistica et al. 2009).

Las Tyr-cinasas asociadas al PRLR son las responsables de la transducción de señales, y se considera que la activación de JAK2 es el primer evento que sigue a la unión del ligando y la dimerización del receptor, luego entonces, puede fosforilar el receptor directamente, así como a alguna Tyr-cinasa con alta especificidad por PRLR (Mangoura, Pelletiere et al. 2000).

La activación de Stat1 por PRL es tan aguda como la de JAK2, pero con una mayor duración, además de encontrarse virtualmente en todos los astrocitos, en un patrón consistente con la regulación positiva de GFAP, siendo evidente la relación entre la expresión de Stat1 y la diferenciación de los astrocitos (Mangoura, Pelletiere et al. 2000).

Los mecanismos candidato para la acción neuroprotectora de la PRL incluyen cambios en la neurotransmisión, efectos antiapoptóticas y la regulación de la expresión de factores neurotróficos (Tejadilla et al., 2010).

La administración intracerebral crónica de PRL bloquea de forma restrictiva la activación neuronal producida por estrés en CA3 y el giro dentado del hipocampo dorsal (Tejadilla et al., 2010) (Donner et al., 2007).

Además, la expresión reducida de c-fos en el hipocampo ventral bajo condiciones basales sugieren que la PRL modula la entrada de información al hipocampo (Tejadilla et al., 2010) (Donner et al., 2007).

La PRL es liberada a la circulación sistémica en respuesta a las convulsiones epilépticas, y el tratamiento a largo plazo con PRL modula la actividad convulsiva (Tejadilla et al., 2010). Así también la acción estimuladora de el NMDA en la liberación de PRL cambia a inhibitoria en ratas lactantes, en las que los niveles de PRL están incrementados, sugiriendo que el agonista glutamatérgico no puede ejercer su acción excitatoria cuando los niveles de PRL son altos (Tejadilla et al., 2010) (Nagy et al., 2005).

La evidencia experimental indica una interacción entre la transmisión glutamatérgica y la PRL, pero aún no se sabe si la PRL actúa directamente en la transmisión glutamatérgica o a través de la GABAérgica (Maguire et al., 2009) (Tejadilla et al., 2010).

Además la PRL disminuye la apoptosis, en parte, al incrementar la expresión de la proteína antiapoptóticas Bcl-2 mientras disminuye la expresión de proteínas proapoptóticas como la proteína Bax (Tejadilla et al., 2010) (Leff et al., 1996).

A pesar de la falta de evidencia experimental, la acción neuroprotectora reportada puede darse por medio de cambios en la transmisión glutamatérgica o por una acción antiapoptótica en el hipocampo (DeVito et al., 1995; Tejadilla et al., 2010). La expresión de PRL se incrementa de forma local tras daño cerebral.

La expresión del mRNA y la PRL en sí, se incrementan tras daño al hipotálamo de la rata, y los niveles circulantes de PRL se incrementan durante la fase aguda de daño traumático.

En el modelo de hipoxia/isquemia el tratamiento central con PRL ha demostrado fuertes propiedades gliatróficas, indicando que juega un papel importante en la recuperación del cerebro dañado a través de respuestas de la glia (Tejadilla et al., 2010).

CaMKII α

Aunque no se encontraron diferencias significativas para CaMKII α se ha demostrado que la CaMKII tiene un papel fundamental en mediar algunos eventos bioquímicos que llevan a la muerte celular tras un agudo insulto excitotóxico de neuronas corticales.

Aunque no todo está claro al respecto, se ha descubierto que CaMKII α , que se encuentra regulada por Ca²⁺, puede inducir la activación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) en neuronas y células vasculares del músculo liso, siendo esta una proteína candidato para la regulación de la muerte celular excitotóxica mediada por CaMKII (Wang and Qin 2010).

La alteración de la actividad enzimática celular por excitotoxicidad acarrea un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones del citoesqueleto, activación de las señales genéticas que llevan a la muerte celular y la disfunción mitocondrial (Szydlowska, Gozdz et al. 2010).

Además en cultivos de neuronas hipocampales, el incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ causada por la activación de NMDARs o canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje provoca una disminución pasajera de las corrientes mediadas por KARs (Coussen et al., 2005).

Esta depresión es máxima después de 1 s tras la entrada de Ca^{2+} y parece requerir calcineurina, siendo la recuperación completa tras 10 s y requiere la fosforilación de KARs por CaMKII (Coussen, Perrais et al. 2005).

Siendo importante elucidar cómo las fosfatasas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ regulan la función de los KARs *in vivo*, suponiéndose que la actividad de CamKII es la principal responsable de la fosforilación de los KARs (Coussen, Perrais et al. 2005). El gen de PRL es regulado por numerosas hormonas que actúan a través de distintas vías de señalización intracelular.

Existe evidencia abundante de que el Ca^{2+} se encuentra relacionado con la regulación de este gen, siendo demostrado previamente que la expresión del gen de PRL en células GH3 era inhibido al retirar el Ca^{2+} existente en el medio, mientras la adición de Ca^{2+} podía estimular el incremento del mRNA de PRL (Nowakowski et al., 1997).

De forma subsecuente se ha demostrado que los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} pueden participar en mediar respuestas a hormonas específicas (Nowakowski, Okimura et al. 1997), por lo que no se puede descartar a la CaMKII como un factor importante en la neuroprotección observada durante la lactancia.

GFAP

El cambio observado en la expresión de GFAP entre los grupos de D basal y Lac basal, siendo el nivel de expresión más alto en D basal, y entre D KA y Lac KA, siendo el nivel de expresión más alto en D KA., puede ser debida a la acción de la PRL ya que se ha demostrado que la PRL induce la activación de una cascada de señalización mitogénica en los astrocitos que produce una estimulación prolongada de Stat1, por lo que se sugiere que estén directamente relacionados (Mangoura, Pelletiere et al. 2000).

La expresión inducida de GFAP, que es un IF de la microglía, se piensa es el resultado del primer paso en un proceso en el que las convulsiones inducen hipertrofia astrocítica (Gu et al., 2004).

Los IFs se encuentran en abundancia en la mayoría de las células, haciéndolos eficientes tanto como buffers del estrés, así como andamios de señalización incluso para moléculas señalizadoras tan abundantes como las 14-3-3 (Eriksson, Dechat et al. 2009) .

Por lo que las modificaciones en su nivel de expresión, y el patrón de fosforilación de los filamentos de GFAP podrían contribuir a la acción neuroprotectora de la PRL ante un estímulo excitotóxico, al amortiguar los efectos del Ca^{2+} , o bien al intervenir en la vía de señalización desencadenada por los altos niveles de expresión basal de PRL durante la lactancia. Los astrocitos son las células más abundantes de la glia en el cerebro y son importantes en el mantenimiento del microambiente en el cerebro.

Al ser el mayor componente de la barrera hematoencefálica son probablemente los primeros candidatos a sufrir daño por un insulto isquémico durante un accidente cerebrovascular (Dong et al., 2010). Por lo que la disminución de la respuesta de éstos al insulto excitotóxico, y de los niveles de expresión en ratas lactantes deben estar directamente relacionados a la acción neuroprotectora de la PRL.

MDK

En los niveles de expresión de MDK se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión entre Lac basal vs Lac KA y D KA vs Lac KA siendo notoriamente inferiores en Lac KA. La MDK es un factor de crecimiento inducido por hipoxia involucrado en la supervivencia celular. Es producto de un gen de respuesta inducida por RA y una diana potencial para la inhibición de algunos tipos de cáncer (Stockwin et al., 2009).

De forma interesante, se ha descubierto que el RA tiene un papel importante en la gliosis, y al ser responsable de la expresión de MDK, la disminución en los niveles de expresión de MDK puede ser resultado de la respuesta del RA ante un insulto excitotóxico (Jung et al., 2007).

Se ha descrito que el tratamiento con RA reduce la gliosis. Aunque es necesario elucidar si la gliosis es regulada directa o indirectamente por RA (Jung et al., 2007).

También se sabe que la administración de MDK en el ventrículo cerebral retrasa la muerte de células hipocampales seguida a la isquemia (Muramatsu 2010).

Otra actividad importante de la MDK en las neuronas es un papel neuroprotector en astrocitos reactivos por insultos isquémicos al cerebro en modelos animales e infarto cerebral en humanos.

En este contexto debe notarse que la MDK también se encuentra sobreexpresada en tumores cerebrales, como neuroblastomas, astrocitomas y neurofibromas (Muramatsu, Zou et al. 2006).

Por lo que una de las vías probables por medio de las que la PRL ejercería su papel neuroprotector sería mediante una disminución de la gliosis, y la consecuente intervención de la MDK para promover la recuperación del cerebro dañado a través de la glia.

TRH

Para la TRH se observan cambios importantes en su expresión en cada uno de los grupos, esto debido probablemente a un papel regulador en los niveles de PRL, habiendo un incremento en los grupos administrados con KA respecto a los grupos en estado basal.

Los genes con diferencias significativas en el grupo de Lac KA son GFAP, MDK y TRH, siendo estos los candidatos potenciales de la acción neuroprotectora de la PRL.

La administración de TRH puede llevar a la liberación de PRL, en parte por la acción directa de la hormona sobre los lactótrofos; sin embargo la liberación temporal de TRH en animales no muestra una alta correlación con la liberación de prolactina (van den Pol, 2010).

Se ha demostrado que la inmunoneutralización de TRH en ranas disminuye la liberación de PRL. Además de haber sido caracterizada como el factor hipotalámico de liberación de PRL más importante en la rana toro (Galas, Raoult et al. 2009).

Ya que los lactótrofos pueden responder directamente a la TRH, se ha asumido que ésta actúa directamente en la hipófisis. Además de que la TRH actúa sobre las neuronas TIDA, reduciendo sustancialmente la liberación de dopamina, y por lo tanto modifica la liberación de PRL (Van den Pol, 2010).

Se considera constantemente que la TRH tiene un papel importante en la fisiopatología de la epilepsia mediante la modulación de procesos excitatorios. (Gu, Lynch et al. 2004).

De forma interesante, en mamíferos la TRH no parece ser fundamental para el mantenimiento de la secreción basal de PRL, pero tiene un papel fundamental en el incremento en la liberación de PRL inducida por succión durante la lactancia (Fekete and Lechan 2007).

Por ejemplo la TRH actúa a través de un receptor acoplado a proteína G que modula la actividad de la fosfolipasa C, lo que lleva a la hidrólisis de fosfoinositol y una liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares y la activación de la PKC.

Los tratamientos con TRH conllevan a un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, debido probablemente a la liberación de las reservas intracelulares de Ca^{2+} , seguido de una meseta que parece ser debida a la entrada de Ca^{2+} (Nowakowski, Okimura et al. 1997).

Los efectos de la TRH a nivel transcripcional son muy dependientes de los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Aunque es bastante claro que los cambios en los niveles de Ca^{2+} son importantes para la regulación del gen de PRL (Nowakowski, Okimura et al. 1997).

Se ha demostrado que el tratamiento con TRH puede incrementar la actividad de CaMKII y que un vector de expresión de la forma activa de la CaMKII puede activar la transcripción del promotor de PRL (Nowakowski, Okimura et al. 1997).

Toda esta evidencia señala a la TRH como un importante regulador fisiológico de los lactótrofos, por lo que su involucramiento en la neuroprotección observada en la etapa de lactancia puede ser de carácter regulatorio mediante la inducción de la liberación de PRL.

YWHAG

Aunque para YWHAG no se encontraron diferencias significativas en su expresión entre los grupos, podría estar involucrada en la ruta de señalización neuroprotectora en la lactancia.

Los miembros de la familia 14-3-3 típicamente modulan las funciones de proteínas señalizadoras a través de interacciones por fosforilación directa. Se ha sugerido que los IFs tienen un papel regulador de la función de las 14-3-3 (Eriksson et al., 2009).

Su interacción con cinasas activadas por estrés las hace muy convenientes para actuar como esponjas de fosfato en células estresadas.

Estudios proteómicos de las proteínas asociadas a la subunidad GluR6a de cerebro de ratón han logrado identificar a la isoforma γ de la 14-3-3 como una chaperona importante en el tráfico de KARs en el CNS (Vivithanaporn et al., 2006).

En el modelo de hipoxia/isquemia el tratamiento con PRL a nivel central exhibe fuertes propiedades gliatróficas indicando que tiene un papel importante en la recuperación del cerebro dañado a través de la glia (Mangoura, Pelletiere et al. 2000).

Los astrocitos contribuyen de forma clave a la protección contra el daño cerebral por isquemia. Aunque bajo ciertas condiciones, los astrocitos activados pueden contribuir a la muerte de tejido cerebral tras isquemia cerebral (Jung et al., 2007).

V. Conclusiones

Se validó el perfil de expresión de PRL en el hipocampo de la rata lactante en respuesta a la administración de KA, comparando con ratas en metaastro.

Se validó el perfil de expresión de GFAP en el hipocampo de la rata lactante en respuesta a la administración de KA, comparando con ratas en metaastro.

Se validó el perfil de expresión de MDK en el hipocampo de la rata lactante en respuesta a la administración de KA, comparando con ratas en metaastro.

Se validó el perfil de expresión de TRH en el hipocampo de la rata lactante en respuesta a la administración de KA, comparando con ratas en metaastro.

Se propone que la disminución del daño observado durante la etapa de lactancia sea consecuencia de una disminución de la gliosis, evidenciándose la PRL como un factor fundamental para la disminución del daño provocado por excitotoxicidad en el hipocampo de la rata lactante por una ruta de señalización en la que probablemente intervengan YWHAG y CaMKII α , modificando la expresión esperada de GFAP como un marcador de gliosis, siendo regulada la expresión de PRL por TRH y teniendo como resultado una disminución en la expresión de MDK lo que probablemente disminuya la gliosis provocada por excitotoxicidad, promoviendo la supervivencia celular.

VI. Bibliografia

- Ben-Jonathan, N., and Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22, 724-763.
- Berzaghi Mda, P., Amado, D., and Cavalheiro, E.A. (1987). Pregnancy decreases the frequency of spontaneous recurrent seizures in rats with kainic acid lesions of the hippocampus. *Epilepsy Res* 1, 142-144.
- Cabrera, V., Cantu, D., Ramos, E., Vanoye-Carlo, A., Cerbon, M., and Morales, T. (2009). Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity. *Neurosci Lett* 461, 136-139.
- Coussen, F., Perrais, D., Jaskolski, F., Sachidhanandam, S., Normand, E., Bockaert, J., Marin, P., and Mulle, C. (2005). Co-assembly of two GluR6 kainate receptor splice variants within a functional protein complex. *Neuron* 47, 555-566.
- Dai, L.C. (2009). Midkine translocated to nucleoli and involved in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 15, 412-416.
- DeVito, W.J., Avakian, C., Stone, S., Okulicz, W.C., Tang, K.T., and Shamgochian, M. (1995). Prolactin induced expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-alpha in cultured astrocytes. *J Cell Biochem* 57, 290-298.
- Dong, Y., Zhao, R., Chen, X.Q., and Yu, A.C. (2010). 14-3-3gamma and neuroglobin are new intrinsic protective factors for cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 41, 218-231.
- Donner, N., Bredewold, R., Maloumy, R., and Neumann, I.D. (2007). Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur J Neurosci* 25, 1804-1814.
- Eriksson, J.E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H.M., and Goldman, R.D. (2009). Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 119, 1763-1771.
- Featherstone, R.E., Fleming, A.S., and Ivy, G.O. (2000). Plasticity in the maternal circuit: effects of experience and partum condition on brain astrocyte number in female rats. *Behav Neurosci* 114, 158-172.
- Fekete, C., and Lechan, R.M. (2007). Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing

neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol* 28, 97-114.

Finch, C.E. (2003). Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. *Neurobiol Aging* 24 Suppl 1, S123-127; discussion S131.

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

Galas, L., Raoult, E., Tonon, M.C., Okada, R., Jenks, B.G., Castano, J.P., Kikuyama, S., Malagon, M., Roubos, E.W., and Vaudry, H. (2009). TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 164, 40-50.

Gomes, F.C., Garcia-Abreu, J., Galou, M., Paulin, D., and Moura Neto, V. (1999a). Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. *Glia* 26, 97-108.

Gomes, F.C., Paulin, D., and Moura Neto, V. (1999b). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 32, 619-631.

Gorter, J.A., Petrozzino, J.J., Aronica, E.M., Rosenbaum, D.M., Opitz, T., Bennett, M.V., Connor, J.A., and Zukin, R.S. (1997). Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci* 17, 6179-6188.

Gouraud, S.S., Yao, S.T., Heesom, K.J., Paton, J.F., and Murphy, D. (2007). 14-3-3 proteins within the hypothalamic-neurohypophyseal system of the osmotically stressed rat: transcriptomic and proteomic studies. *J Neuroendocrinol* 19, 913-922.

Gu, J., Lynch, B.A., Anderson, D., Klitgaard, H., Lu, S., Elashoff, M., Ebert, U., Potschka, H., and Loscher, W. (2004). The antiepileptic drug levetiracetam selectively modifies kindling-induced alterations in gene expression in the temporal lobe of rats. *Eur J Neurosci* 19, 334-345.

Hatton, G.I., and Zhao Yang, Q. (2002). Peripartum interneuronal coupling in the supraoptic nucleus. *Brain Res* 932, 120-123.

Inagaki, M., Gonda, Y., Nishizawa, K., Kitamura, S., Sato, C., Ando, S., Tanabe, K., Kikuchi, K., Tsuiki, S., and Nishi, Y. (1990). Phosphorylation

sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non-alpha-helical head domain. *J Biol Chem* 265, 4722-4729.

Jung, D.S., Baek, S.Y., Park, K.H., Chung, Y.I., Kim, H.J., Kim, C.D., Cho, M.K., Han, M.E., Park, K.P., Kim, B.S., et al. (2007). Effects of retinoic acid on ischemic brain injury-induced neurogenesis. *Exp Mol Med* 39, 304-315.

Kadomatsu, K., and Muramatsu, T. (2004). Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett* 204, 127-143.

Komoike, Y., Fujii, K., Nishimura, A., Hiraki, Y., Hayashidani, M., Shimojima, K., Nishizawa, T., Higashi, K., Yasukawa, K., Saitsu, H., et al. (2010). Zebrafish gene knockdowns imply roles for human YWHAG in infantile spasms and cardiomegaly. *Genesis* 48, 233-243.

Leff, M.A., Buckley, D.J., Krumenacker, J.S., Reed, J.C., Miyashita, T., and Buckley, A.R. (1996). Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, *bcl-2* and *bax* by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 137, 5456-5462.

Maguire, J., Ferando, I., Simonsen, C., and Mody, I. (2009). Excitability changes related to GABAA receptor plasticity during pregnancy. *J Neurosci* 29, 9592-9601.

Mangoura, D., Pelletiere, C., Leung, S., Sakellaridis, N., and Wang, D.X. (2000). Prolactin concurrently activates src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *Int J Dev Neurosci* 18, 693-704.

Mejias-Aponte, C.A., Jimenez-Rivera, C.A., and Segarra, A.C. (2002). Sex differences in models of temporal lobe epilepsy: role of testosterone. *Brain Res* 944, 210-218.

Messing, A., and Brenner, M. (2003). GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice. *Glia* 43, 87-90.

Mhaweck, P. (2005). 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res* 15, 228-236.

Morrell, M.J. (1999). Epilepsy in women: the science of why it is special. *Neurology* 53, S42-48.

Morrison, D.K. (2009). The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 19, 16-23.

Muramatsu, H., Zou, P., Kurosawa, N., Ichihara-Tanaka, K., Maruyama, K., Inoh, K., Sakai, T., Chen, L., Sato, M., and Muramatsu, T. (2006). Female infertility in mice deficient in midkine and pleiotrophin, which form a distinct family of growth factors. *Genes Cells* 11, 1405-1417.

Muramatsu, T. (2010). Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 410-425.

Nagy, G.M., Bodnar, I., Banky, Z., and Halasz, B. (2005). Control of prolactin secretion by excitatory amino acids. *Endocrine* 28, 303-308.

Nowakowski, B.E., Okimura, Y., and Maurer, R.A. (1997). Characterization of DNA regions mediating the ability of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II to stimulate prolactin promoter activity. *Mol Cell Endocrinol* 132, 109-116.

Obsilova, V., Silhan, J., Boura, E., Teisinger, J., and Obsil, T. (2008). 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res* 57 Suppl 3, S11-21.

Okamoto, K., Bosch, M., and Hayashi, Y. (2009). The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology (Bethesda)* 24, 357-366.

Osuka, K., Watanabe, Y., Usuda, N., Nakazawa, A., Fukunaga, K., Miyamoto, E., Takayasu, M., Tokuda, M., and Yoshida, J. (2002). Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser847 by CaM-KII in the hippocampus of rat brain after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 1098-1106.

Phelps, C.J., Romero, M.I., and Hurley, D.L. (2003). Prolactin replacement must be continuous and initiated prior to 21 d of age to maintain hypothalamic dopaminergic neurons in hypopituitary mice. *Endocrine* 20, 139-148.

Pinheiro, P., and Mulle, C. (2006). Kainate receptors. *Cell Tissue Res* 326, 457-482.

Porter, G.W., Khuri, F.R., and Fu, H. (2006). Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biol* 16, 193-202.

Scharfman, H.E., Mercurio, T.C., Goodman, J.H., Wilson, M.A., and MacLusky, N.J. (2003). Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23, 11641-11652.

Soderling, T.R. (2000). CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10, 375-380.

Steward, O., and Wallace, C.S. (1995). mRNA distribution within dendrites: relationship to afferent innervation. *J Neurobiol* 26, 447-449.

Stockwin, L.H., Vistica, D.T., Kenney, S., Schrupp, D.S., Butcher, D.O., Raffeld, M., and Shoemaker, R.H. (2009). Gene expression profiling of alveolar soft-part sarcoma (ASPS). *BMC Cancer* 9, 22.

Sun, S., Wong, E.W., Li, M.W., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2009). 14-3-3 and its binding partners are regulators of protein-protein interactions during spermatogenesis. *J Endocrinol* 202, 327-336.

Szydłowska, K., Gozdz, A., Dabrowski, M., Zawadzka, M., and Kaminska, B. (2010). Prolonged activation of ERK triggers glutamate-induced apoptosis of astrocytes: neuroprotective effect of FK506. *J Neurochem* 113, 904-918.

Tejadilla, D., Cerbon, M., and 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.

Tokui, T., Yamauchi, T., Yano, T., Nishi, Y., Kusagawa, M., Yatani, R., and Inagaki, M. (1990). Ca²⁺(+)-calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates various types of non-epithelial intermediate filament proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 169, 896-904.

Torner, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, H.G., Winkler, J., Aigner, L., and Neumann, I.D. (2009). Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J Neurosci* 29, 1826-1833.

Vagnerova, K., Koerner, I.P., and Hurn, P.D. (2008). Gender and the injured brain. *Anesth Analg* 107, 201-214.

van den Pol, A.N. (2010). Excitatory neuromodulator reduces dopamine release, enhancing prolactin secretion. *Neuron* 65, 147-149.

- van Heusden, G.P. (2009). 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics* 94, 287-293.
- Vanoye-Carlo (2006). Susceptibilidad a daño neuronal por ácido kaínico en CA1 y CA3 del hipocampo durante la lactancia en *Rattus Norvegicus*. Tesis desarrollada en el Departamento de Biología de la Facultad de Química (México D.F., UNAM).
- Vanoye-Carlo (2009). Caracterización molecular de la respuesta celular ante excitotoxicidad por ácido kaínico durante la lactancia en *Rattus Norvegicus*. Tesis desarrollada en el Departamento de Biología de la Facultad de Química (México D.F., UNAM).
- Vanoye-Carlo, A., Mendoza-Rodriguez, C.A., Morales, T., Langley, E., and Cerbon, M. (2009). Estrogen receptors increased expression during hippocampal neuroprotection in lactating rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116, 1-7.
- Vanoye-Carlo, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza-Rodriguez, A., and 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., and Mulle, C. (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158, 309-323.
- Vivithanaporn, P., Yan, S., and Swanson, G.T. (2006). Intracellular trafficking of KA2 kainate receptors mediated by interactions with coatamer protein complex I (COPI) and 14-3-3 chaperone systems. *J Biol Chem* 281, 15475-15484.
- Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Sun, G.Y., and Sun, A.Y. (2005). Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31, 3-16.
- Wang, Y., and Qin, Z.H. (2010). Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15, 1382-1402.
- Ye, S.Q., Zhou, X.Y., Lai, X.J., Zheng, L., and Chen, X.Q. (2009). Silencing neuroglobin enhances neuronal vulnerability to oxidative injury by down-regulating 14-3-3gamma. *Acta Pharmacol Sin* 30, 913-918.