

00322

110



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Búsqueda de coexpresión, entre el mRNA de la hormona liberadora de tirotropina y el receptor alfa de estrógenos, en el Área preóptica y Núcleo paraventricular hipotalámico, durante la lactancia

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA:

Alonso Martínez Canabal

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Rosa María Uribe Villegas



2003
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



Autorizo a la Dirección General de Subvenciones de la UNAM a difundir en formato electrónico e imprimir el contenido de mi trabajo de tesis.

NOMBRE: Alonso Martínez Canabal
 FECHA: 22 de Octubre / 2003
 FIRMA: [Firma manuscrita]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la Facultad de Ciencias
 Presente

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Búsqueda de coexpresión, entre en mRNA de la hormona liberadora de tirotrópina y receptor alfa de estrógenos, en el Area preótica y en el Núcleo paraventricular hipotalámico, durante la lactancia."

realizado por Martínez Canabal Alonso

con número de cuenta 09853496-8 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de Tesis Propietario Dra. en IBB Rosa María Uribe Villegas. *[Firma]*
- Propietario Dra. Patricia Rivas Manzano. *[Firma]*
- Propietario M. en C. Ana Erika Rodríguez Martínez. *[Firma]*
- Suplente Dr. Manuel Miranda Anaya. *[Firma]*
- Suplente Dr. Julio Alejandro Prieto Sagredo. *[Firma]*

Consejo Departamental de Biología

M. en C. [Firma] Manuel Rodríguez-Chávez.

FAACULTAD DE CIENCIAS



CONSEJO DE ENSEÑANZA DE BIOLOGIA

Índice

Índice	2
Agradecimientos:.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
1.- Generalidades sobre la fisiología de la lactancia en mamíferos placentarios.	5
a. Estado hormonal a lo largo de la lactancia, papel de la prolactina (PRL) y las hormonas sexuales esteroideas.	5
b. Consideraciones sobre la producción y liberación de PRL en la Hipófisis, papel de la hormona liberadora de tirotropina(TRH).	11
2.- Generalidades sobre el receptor α de estrógenos(ER α).....	15
a.- El grupo de los receptores esteroideos:.....	15
b.- Estructura y localización de los receptores de estrógenos.....	16
c.- Función transcripcional del ER α	20
3.- La distribución de la TRH y su regulación génica.	26
4.- Participación del ERA en procesos conductuales asociados a la lactancia.....	30
5.- Introducción a la inmunohistoquímica y la hibridación <i>in situ</i>	35
a.- Inmunohistoquímica en el sistema nervioso central.	35
b.-Hibridación <i>in situ</i> en el sistema nervioso central.	38
Antecedentes directos.....	42
Objetivo.....	44
Estrategia experimental.....	45
Material y métodos.....	46
a.- Grupos experimentales.....	46
b.- Cortes histológicos.....	47
c.- Inmunohistoquímica del receptor α de estrógenos.....	49
d.- Hibridación <i>in situ</i>	51
e.- Conteo de células.....	53
f.-Radioinmunoensayos.....	55
g.- Pruebas estadísticas.....	55
Resultados.....	57
1. Detección del RNAm de TRH por hibridación <i>in situ</i>	57
2. Detección inmunológica del receptor α de estrógenos en el cerebro de la rata.	58
3. Niveles circulantes de prolactina y tirotropina durante la lactancia.....	60
4. Cuantificación de la coexpresión del RNAm de TRH y el receptor α de estrógenos en el área preóptica durante la lactancia.	60
5. Colocalización del RNAm de TRH y el ER α en el NPV del hipotálamo.....	61
Discusión.....	65
Perspectivas.....	70
Conclusión.....	72
Bibliografía referida.....	73
Índice de abreviaturas.....	83
Anexo I, Tinciones histológicas.....	85
Anexo II, Preparación de soluciones.....	86

Agradecimientos

Quiero agradecer la colaboración de la Sra. Elena Martell, La invaluable colaboración técnica en las pruebas de radioinmunoensayos y el funcionamiento diario del laboratorio, al M. en C. Miguel Cisneros. De igual manera agradezco el apoyo recibido por el personal del bioterio del Instituto de Biotecnología, especialmente al Sr. Sergio González. Y finalmente al Sr. Manuel Villa, por su invaluable apoyo logístico.

Financiamiento: DGAPA/UNAM IN223599

Quiero agradecer, especialmente a Rosa María, por todo el apoyo que me ha dado y por todo el conocimiento teórico y práctico que ha compartido conmigo en todo este tiempo.

Agradezco mucho a Lucía, por su amistad en el laboratorio y por todos los momentos gratos compartidos, así como por su siempre oportuna ayuda y consejo en cuestiones académicas y prácticas. Y por supuesto, por ser siempre para mí un gran ejemplo a seguir.

Agradezco a Jean Louis Charli, por compartir conmigo sus conocimientos su brillante inteligencia y su benevolente persona.

También a mis apreciados compañeros, Rocío, Arlene, Kasia, Marcos, Andrés, Nancy, Elda, por el tiempo compartido y a mi querida amiga Nuria, por su genial presencia en todo momento.

A mis maestros de la carrera, que tanta y tan buena influencia tuvieron sobre mi formación profesional y modo de ver y entender la ciencia. Faustino Sánchez, Alicia Negrón, Marta Martínez, Jorge Meave, María Eugenia Gosembait, Teresa Valverde, Julio Morán, Octavio Rojas y muchos otros que seguramente se me están escapando.

También quiero agradecer, especialmente a Leonora, Soledad Gloria, amigas, hermanas de siempre, por su constante apoyo, todo este tiempo. A Valentina, soñadora, A Maite, Poeta, Xiana, Luchadora, María Ángeles, ángel de los olivos, Gloria, cariñosa persona con acento del norte y Elika, brillante y querida compañera inseparable. Y bueno, a mis padres, a mi abuela, y a la familia en general.

Me resta recordar a ciertas personas que estuvieron junto a mí todos estos años, y por quienes a fuerza de cotidianidad y de sucesos inesperados, a fuerza de magia y de sencillez humana, he desarrollado un sentimiento y un vínculo sumamente especial. Lakshmi, Paula, Diego, Libertad, a ellos está dedicada esta tesis.

INTRODUCCIÓN

1.- Generalidades sobre la fisiología de la lactancia en mamíferos placentarios.

a. Estado hormonal a lo largo de la lactancia, papel de la prolactina (PRL) y las hormonas sexuales esteroideas.

Un proceso muy relevante para la vida de los mamíferos

La lactancia se define como la secreción por parte de las hembras, mediante glándulas sudoríparas modificadas, de diversos nutrientes que pueden ser fácilmente asimilados por las crías en su desarrollo, esta mezcla recibe el nombre común de "leche". Este proceso es común a toda la clase de los mamíferos y de hecho le da el nombre a este amplio grupo. Dentro de la misma diversidad biológica de los mamíferos, también hay gran cantidad de formas de llevar a cabo la lactancia, pero en general, es un factor de supervivencia indiscutible e insustituible para las crías de mamíferos en su edad más vulnerable, además de que potencia la relación social más importante de los mamíferos, que es la de la madre y la cría. La evolución de un proceso tan complejo como la lactancia, ha contribuido de manera notable, a que en la estrategia reproductiva de los mamíferos, un alto porcentaje de los vástagos, sobreviva hasta la edad reproductiva. La lactancia garantiza una fuente de alimento para las crías, y garantiza en muchos casos la protección materna necesaria en las etapas más vulnerables del desarrollo de los animales (Norris, 1997).

Aunque la lactancia se presenta en monotremas, que cuentan con glándulas mamarias indistintas de las sudoríparas a lo largo del vientre, y en los marsupiales, que cuentan con una glándula mamaria bien desarrollada, pero no con una placenta. Son los mamíferos del grupo *Eutheria*, o placentarios, los que más se han estudiado.

La lactancia en los mamíferos placentarios, se lleva a cabo mediante complejas interacciones de todo el sistema homeostático de la hembra, entra en juego una compleja modificación de las glándulas sudoríparas, hasta formar un intrincado sistema de células de producción, secreción de nutrientes y un sistema de conducción y secreción al ambiente del producto final, este sistema de glándulas secretoras, vasos conductores y fibras musculares lisas, se denomina glándula mamaria (Tucker, 1988). Por otra parte, hay variaciones hormonales, que canalizan los nutrientes necesarios, así como electrolitos y agua para la

síntesis de leche y otro sistema hormonal, que responde a los estímulos externos y favorece la producción y eyeción de leche. En este complicado juego de hormonas, intervienen las glándulas suprarrenales, el páncreas, el hígado, la glándula tiroides y la hipófisis, de esta última, sus secreciones son principalmente estimuladas por el hipotálamo (Tucker, 1988).

Estado fisiológico durante la lactancia

Sin considerar la parte conductual, se pueden dividir los efectos de la lactancia en metabólicos, cardiovasculares y endócrinos, que están claramente coordinados. En relación a los cambios metabólicos que ocurren, cabe resaltar el redireccionamiento de muchos nutrientes hacia las glándulas mamarias. Otro aspecto importante de los cambios fisiológicos durante la lactancia, es la inhibición de la fertilidad que ocurre en numerosas especies de mamíferos, que es considerada una adaptación para garantizar la supervivencia de los productos. Se considera entonces que estos cambios fisiológicos, son adaptaciones que permiten salvaguardar eficientemente la fuerte inversión de recursos que llevan a cabo los mamíferos durante su reproducción, y es mediante el sistema endocrino regulado por el sistema nervioso central, que se lleva a cabo el preciso control que implican estos cambios fisiológicos (Tucker, 1988).

Los pequeños mamíferos, tienen una elevada producción de leche, grandes gastos de energía y grandes glándulas mamarias por unidad de peso, respecto a los grandes mamíferos. Las ratas, llegan a producir más del 10% de su peso corporal en leche por día, hasta 40 g al día, lo que en una mujer equivaldría a 6 litros de leche al día. En el caso de la mujer, la mayor producción de leche, puede llegar hasta 1 litro de leche por día, lo que puede representar 1 o 2% de su peso corporal. Para mantener los altos requerimientos metabólicos necesarios para la producción de leche, son necesarios importantes cambios en la distribución de los nutrientes en el organismo, redireccionándose gran cantidad de nutrientes hacia la glándula mamaria, mientras que se mantienen lejos de otros tejidos, a los que usualmente son suministrados esos nutrientes. Esta partición modificada de los nutrientes, se considera una consecuencia del control homeorrético. Esencialmente, los cambios hormonales asociados con la lactancia, se encuentran regulando el metabolismo de los tejidos de manera que puedan elevar la tasa de entrada de sustratos en la poza

metabólica; disminuyendo su utilización por tejidos no esenciales para la lactancia y aumentando el flujo de nutrientes hacia la glándula mamaria (Mephan, 1987).

No hay una sola hormona responsable de iniciar la lactancia, hay una cascada de eventos que ocurren en el sistema endócrino durante el tercer periodo de gestación, que preparan la glándula mamaria para la secreción de leche, dichos eventos, se encuentran cercanamente integrados con el control hormonal del parto. Entre estas hormonas, se encuentran la prolactina (PRL), los lactógenos placentarios (PL₁ y PL₂), los glucocorticoides (GC), estrógenos, progesterona, oxitocina, y otras (Tucker, 1998).

La PRL

La hipofisectomía durante la gestación, suprime completamente la producción de leche, a pesar de llevarse a cabo un parto relativamente normal, por esa razón se descubrió la insustituible implicación de las hormonas hipofisarias durante la lactancia (Tucker, 1988 ver referencias). Paralelamente, se ha mostrado que la inyección de extractos de hipófisis, produce lactogénesis en conejos con pseudoembarazo (Tucker, 1988 ver referencias). La purificación de los principales factores hipofisarios, ha mostrado que la PRL, es la hormona con mayor implicación en la lactogénesis. Aunque queda claro sin embargo, que el tejido mamario de los conejos, es especialmente sensible a la PRL, ya que en ratas y ratonas preñadas, la simple inyección de PRL exógena, no tiene el mismo efecto, aunque al parecer esto se debe a que la PRL en roedores, tiene efecto luteotrópico, y la progesterona (P₂) producida en el cuerpo lúteo, es inhibitoria de la lactogénesis, de cualquier modo, se ha mostrado que en ratas y ratones hipofisectomizados, adrenalectomizados y ovariectomizados, la sola administración de PRL y un glucocorticoide (GC) en este caso Corticosterona induce la producción de leche a niveles normales (Tucker, 1988 ver referencias.). Este mismo resultado, se ha obtenido *in vitro*, con el cultivo de células mamarias en ausencia de P₂ (Mills, Topper, et al 1970).

En ratas, las concentraciones de PRL sérica, comienzan a elevarse entre uno y tres minutos después del inicio de la succión, teniendo un pico sobre los 10 minutos de comenzada, es sostenida a niveles constantes mientras el amamantamiento continúa, y caen cuando las crías son saciadas, la expresión del mRNA de PRL en la hipófisis, sigue el mismo patrón (Grosvenor, Mena, et al 1982). Cuando la succión se termina, también se

termina la secreción de PRL y su disminución en el torrente sanguíneo, es proporcional a la tasa de metabolización de la hormona (Grosvenor, Mena, et al 1982). Además, la cantidad de PRL liberada, es proporcional con la intensidad del estímulo (Amemomori, Chen, et al. 1970). Estos parámetros aparecen de forma constante en la mayoría de los mamíferos. En los humanos y los roedores, la respuesta de la PRL a la succión es regulada en gran parte por el ritmo circádico de la propia hormona, es decir, que a diferentes horas del día el mismo estímulo puede tener una respuesta mayor o menor, aunque esto se puede ver afectado por factores ambientales y psicológicos (Tucker, 1988, ver referencias).

Durante la preñez de la rata noruega, la PRL se caracteriza por fuertes fluctuaciones, durante la primera mitad, existen dos picos de secreción durante el día, llegando a sus máximos y mínimos valores diariamente. Hacia la segunda mitad, se comienzan a producir los lactógenos placentarios (I y II) que tienen una gran similitud estructural con la PRL, al parecer estos ejercen una inhibición de la PRL hipofisiaria, ya que los niveles séricos de la PRL disminuyen consistentemente. Cuando inicia el trabajo de parto la PRL experimenta una fuerte liberación, que sin embargo, en el momento del parto se ve reducida. En la rata, se ha demostrado afirmativamente, que los lactógenos placentarios, son agonistas de los receptores de PRL (PRL-R) en las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (Arbogast, Voogt, et al 1996).

En los humanos, conforme avanza el embarazo, aumentan los niveles de PRL y lactógeno placentario humano (hPL) en el plasma. Este fenómeno es peculiar, ya que se podría esperar que el hPL inhibiera la producción de PRL, como ocurre en otras especies. Se propone que durante la gestación, las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares, se tornan insensibles a la PRL, aunque esto no ha sido estudiado con el suficiente rigor. Por otro lado, también es posible que durante el embarazo, los receptores de PRL (PRL-R) sean insensibles al lactógeno placentario humano (Voogt, Lec, et al 2001).

Después del parto, la PRL participa en el inicio y mantenimiento de la lactancia, así como en la producción de la leche (Tucker, 1988). Cuando comienza la lactancia, la succión causa una elevación de los niveles de PRL circulante, cada episodio de succión resulta en una liberación de PRL, que actúa sobre las células epiteliales de la glándula mamaria estimulando la producción de leche. Por consiguiente, durante toda la relación de

las crías con sus madres, se mantiene el estado conocido como hiperprolactinemia, que en la rata se prolonga cuando menos tres semanas (Tucker, 1988; Mephan, 1987).

Estrógenos

El incremento de la secreción de estrógenos durante la pubertad y durante la primera gestación, es necesario para permitir a las células alveolares de la glándula mamaria, responder posteriormente a la PRL y a los GC, en la producción de caseína y el resto de los componentes de la leche. Si los estrógenos son eliminados del torrente sanguíneo, se impide la diferenciación de los alvéolos y se inhibe la producción de caseína inducida por la PRL (Tucker, 1988, ver referencias). Por otra parte, la adición de estrógenos a animales que han desarrollado un buen parénquima mamario, pueden inducir la secreción de leche. En el caso de las vacas, la inyección de E₂ y P₂ en un periodo normal, induce la secreción de leche en un nivel cercano al 70% de la producción de un animal lactante, incluso la secreción de leche se mantiene hasta 7 días posteriores a la última inyección de esteroides. Un efecto similar al que ocurre en las vacas, se da en ratas y otros mamíferos, esto se explica mediante el aumento en la secreción de PRL y ACTH hipofisarios inducidos por los estrógenos; también se ha mostrado que altos niveles de estrógenos, provocan un aumento de los sitios de unión a PRL en la glándula mamaria. La concentración de estrógenos circulantes, va aumentando gradualmente durante la preñez en la mayoría de los mamíferos, en vacas, ratas, conejos y en humanos, aparte de los distintos papeles fisiológicos que pueden tener estas hormonas en el desarrollo del producto, incrementan el desarrollo del epitelio mamario, lo que es importante para la implantación de la lactogénesis y galactopoyesis. Curiosamente, la concentración de sitios de unión a estrógenos en ratas, no presenta mayores cambios durante la preñez, pero durante la lactancia se incrementan significativamente, no se ha determinado el papel adaptativo de este fenómeno (Leung, et al 1976). Algo similar ocurre en el cerebro, ya que en el área preóptica, en el hipotálamo y otras zonas, existen niveles importantes de receptores de estrógenos (Lonstein, et al 2000). Los niveles de estrógenos bajan considerablemente en las horas siguientes al parto, hasta niveles basales, por la posible influencia negativa de la PRL sobre la actividad del ovario y las neuronas GnRHérgicas del hipotálamo, porque la placenta se encuentra produciendo importantes cantidades. El estrógeno más importante en los mamíferos es el 17 β -Estradiol, pero durante la preñez, los niveles de estrona y estriol se

toman muy importantes. Después del parto, la ovariectomía no inhibe la producción de leche, por el contrario, en la mayoría de las especies la inyección de estrógenos, puede inhibir completamente la lactancia. Aparentemente, la inhibición de la lactancia mediada por estrógenos, se da a nivel del tejido muscular de la glándula mamaria. La progesterona, incluso administrada en dosis masivas, una vez iniciada la lactancia, no muestra efecto sobre la producción de leche, es notorio que este hecho es aparentemente contradictorio con el hecho de que el tratamiento con esteroides en animales no lactantes, induce la producción de leche (Tucker, 1988 ver referencias).

Otras hormonas

La adrenalectomía, reduce los niveles de producción de leche en los roedores, al parecer ese efecto se debe a un deficiente control hormonal sobre el metabolismo de carbohidratos y proteínas, así como el balance de electrolitos (Tucker, 1988). Las tiroxinas, son inhibidas al principio de la lactancia, pero poco tiempo después, se elevan nuevamente hasta niveles normales. Se ha detectado que a ciertas dosis, la tirosina exógena puede aumentar la producción de leche, en un orden de 26% en vacas y ratas (Tucker 1988, ver referencias). Aunque en sentido contrario a este hallazgo, las vacas seleccionadas artificialmente para producir más leche, son hipotiroideas (Swanson et al 1973). Respecto a la secreción de TSH, existen dudas, ya que según reportes la succión no produce un incremento de esta hormona (Sar, et al 1979). En el caso de la insulina, un aumento súbito en su concentración sérica o una drástica caída, provoca la disminución de la producción de leche, aparentemente, el papel de esta hormona no es sobre la glándula mamaria, ni en el eje hipotálamo hipófisis, sino que actúa a nivel del hígado, provocando cambios en la tasa de gluconeogénesis, e inhibe la lipólisis y la proteólisis en los tejidos muscular y adiposo (Bines, et al 1982). Los niveles de Oxitocina, son altos durante la succión y en general se considera que es la principal hormona de la galactopoyesis, aunque también se ha propuesto como liberadora de PRL a nivel hipofisiario. Es importante para este trabajo, remarcar que el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV), es uno de los principales productores de Oxitocina sérica y que las neuronas oxitocinérgicas, tanto del NPV como del núcleo supraóptico, colocalizan con receptores α y β de estrógenos (Laflamme, et al 1998).

b. Consideraciones sobre la producción y liberación de PRL en la Hipófisis, papel de la hormona liberadora de tiotropina (TRH).

Las células de la hipófisis anterior, que sintetizan y secretan PRL, se conocen como lactotrofos o mamotrofos, y constituyen entre el 20% y el 50% de la hipófisis anterior, dependiendo del sexo y del estado fisiológico del animal, la forma en que usualmente se les identifica, es mediante inmunohistoquímica de PRL (Freemann, et al 2000). Durante el ciclo estral, preñez y lactancia, la cantidad de lactotrofos varía según las concentraciones séricas de estrógenos, siendo el aumento de estos, proporcional a las concentraciones de la hormona, presentándose altos niveles de proliferación en el estro y en la última fase de la preñez, aunque la proliferación se detiene en el inicio de la lactancia y en el diestro en rata (Yin, et al 2000).

La secreción de PRL por parte de los lactotrofos, ha sido materia de amplios estudios y fuertes debates, lo único que es claro, es que el control de la secreción es altamente complejo e involucra numerosos factores, tanto del sistema nervioso central, provenientes especialmente del hipotálamo, como de los niveles de hormonas séricas (Freemann, et al 2000). Claramente se ha demostrado que el hipotálamo, ejerce un control inhibitorio muy importante sobre la liberación de PRL, debido a la observación de que al eliminar la comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis, por una incisión quirúrgica, la secreción de PRL se eleva hasta alcanzar niveles estables tras una semana (Bishop, et al 1972). Resultados similares se repiten cuando la hipófisis se transplanta a otro lugar del cuerpo como el riñón (Freemann, et al 2000) y cuando los lactotrofos son cultivados *in vitro* (Close, et al 1997), por lo cual se ha determinado que existen ciertos factores hipotalámicos inhibidores de la secreción de PRL (FIP) (Freeman, et al 2000).

La dopamina (DA), es el FIP más importante, además de las evidencias recabadas *in vitro* (Close, et al 1997), se ha mostrado que las drogas agonistas del receptor dos de DA (D₂) disminuyen la secreción de PRL (González-Mariscal, 2001), además de que la DA se ha encontrado en altas concentraciones en la eminencia media y en la sangre portal. Se ha demostrado mediante inmunohistoquímica la presencia de receptores D₂ en las membranas de los lactotrofos y por último, la evidencia más reciente, muestra que el ratón knockout de D₂, genera hiperplasia en la hipófisis anterior, así como prolactinemia (Saiardi, et al 1997).

Las neuronas que producen la DA que se libera hacia la hipófisis, tienen su origen en los núcleos periventriculares del hipotálamo medio, y en el núcleo arqueado (ARC) (Freeman, et al 2000). Durante la lactancia se ha demostrado que el tono inhibitorio disminuye, y disminuye el número de receptores de DA en los lactotopos. Las causas son múltiples, sin embargo el elevado nivel de estrógenos, actúa a nivel del hipotálamo, estimulando la producción de péptidos opioides, que inhiben la secreción de DA (Soaje, et al 2002), y por otro lado, inhibiendo la responsividad de los lactotopos a la DA (Close, 1997), aunque también puede presentarse, una disminución de la responsividad de las neuronas dopaminérgicas, a la retroalimentación negativa que usualmente ejerce la PRL sobre estas (Arbogast, et al 1996).

Una vez que la inhibición dopaminérgica queda reducida durante la lactancia, los lactotopos pueden producir PRL en altas concentraciones (Close, et al 1997; Soaje, DeDinasso, et al 2002), entonces entran en juego los llamados FLPs (factores liberadores de prolactina). Uno de los grandes retos de la neuroendocrinología, ha sido la búsqueda del FLP principal, recientemente, un grupo presentó el hallazgo de un péptido en el cerebro, que era capaz de liberar PRL, además de que receptores clonados en la hipófisis, sin ligando conocido, parecían ser los receptores propios de los péptidos recién descubiertos; sin embargo, pronto se mostró que estos péptidos no actúan como liberadores de PRL, ya que sus neuronas no invierten la eminencia media, ni la hipófisis directamente (Jarry, et al 2000). Previamente se había demostrado la existencia de diferentes factores reguladores de la PRL. Entre las sustancias inhibitorias, las más importantes parecen ser DA (Ben-Jonathan, et al 2001 referencias) y GABA (Komblat, et al 2001), mientras que en las estimulatorias, se encuentra el péptido vasoactivo intestinal (VIP) (Apfelbam, 1998), la Oxitocina (Johnston, et al 1988), la serotonina (5-HT) (Apfelbam, 1998) y la TRH (Haisendeder, et al 1992). El metabolismo de GABA y DA disminuye durante la lactancia (Ben-Jonathan, Hnasko, et al 2001; Kornblat, Grattan et al. 2001), mientras que la succión estimula principalmente la secreción de oxitocina, vasopresina (VP), serotonina y TRH (Freeman, et al 2000 ver referencias).

La TRH fue originalmente aislada como un factor hipofisiotrópico que estimula la secreción de TSH desde los tirotropos de la hipófisis (Guillemin, 1965). Subsecuentemente, la TRH ha mostrado ser un potente liberador de PRL en los lactotopos, de manera dosis

dependiente, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Blake, 1974; Haiseneder, Ortolano, et al 1992). Gran parte de las células inmunopositivas a TRH que proyectan hacia la eminencia media, están en la sección parvocelular del NPV hipotalámico (Brownstein, 1982). La TRH, es secretada cerca de los vasos portales hipofisiarios (Fink, et al 1982) y sus receptores están presentes tanto en tirotropos, como en lactotropos (Hinkle, et al 1973). A su vez, la inyección de antisueros contra TRH, inhiben significativamente la secreción de PRL. Estos hallazgos, propusieron a la TRH, como un factor liberador de PRL (Freeman, et al 2000).

La liberación de la TSH y PRL por medio de la TRH, está disociada. La TSH sólo parece mostrar pequeños cambios en su patrón de liberación, o prácticamente ninguno, cuando se da el estímulo de succión en ratas, mientras que la PRL, si responde significativamente a éste (Rinskid, et al 1984). La inyección del antisero de TRH, o inmunización pasiva, puede suprimir la liberación de PRL que se da durante el proestro, mientras que en la succión, la liberación de PRL se ve disminuída significativamente (De Greff, et al 1987), esto muestra una participación significativa de la TRH en la secreción de prolactina que se da tras la succión, sin embargo, pone en evidencia que la TRH no es el único factor estimulador de PRL con relevancia en la fisiología de la lactancia. La TRH puede también afectar la secreción sérica de prolactina, afectando otras partes del sistema nervioso central. Se ha reportado que la administración central de TRH inhibe la secreción de PRL, más aún, con la administración directa sobre las neuronas tuberoinfundibulares del núcleo arqueado (Ohta, 1985). Ya que se han detectado fibras TRH inmunopositivas que proyectan del NPV al ARC, existen bases morfológicas para sugerir una interacción directa entre la TRH y la DA a nivel hipotalámico, con influencia sobre la secreción de PRL (Freeman, et al 2000).

Se han realizado diversos estudios sobre la respuesta del TRH al estímulo de succión, se ha observado por ejemplo, que la expresión del mRNA de TRH muestra un incremento transitorio en el NPV durante el estímulo de succión, mostrando un pico a los 30 min y una restitución de los niveles iniciales a los 60 min, mientras que las concentraciones del péptido de TRH en el hipotálamo medio basal, disminuye hasta tener sus valores más bajo a los 60min (Uribe, et al 1993). Por otra parte, se ha observado que durante la lactancia, el nivel del mRNA de TRH en el día 15 en el NPV, disminuye con respecto al día 18 de la preñez y el día del parto. Sin embargo, los niveles peptídicos de

TRH en la eminencia media, se incrementan a partir del día 5 hasta el día 15, manteniéndose hasta el destete. Esta tendencia, coincide con la de la PRL circulante (Uribe, et al 1991).

2.- Generalidades sobre el receptor α de estrógenos(ER α)

Figura 1. Esquematación de la cristalografía del receptor α de estrógenos dimerizado unido a E₂. En la parte inferior se tiene la zona F que corresponde a la c-terminal, abajo a los extremos, en una esfera se esquematizan los dedos de Zinc, el extremo superior frontal, se ven las N-terminales. Tomado del Protein Data Bank.



a.- El grupo de los receptores esteroideos:

Los receptores esteroideos, son una familia de proteínas que hacen de factores de transcripción a nivel nuclear, activados por hormonas derivadas del colesterol, que incluyen a receptores de progesterona (PRs), andrógenos (ARs), estrógenos (ERs), glucocorticoides (GRs) y mineralocorticoides (MRs), los estudios filogenéticos modernos, han evidenciado que proceden de un ancestro común (Evans, 1988; Weigel, 1996). Son también funcional y filogenéticamente cercanos a los receptores para hormonas tiroideas (TRs), retinoides (XR) y vitamina D, además de un nutrido grupo de proteínas, conocidas como receptores huérfanos, cuyos ligandos y actividad biológica, son aún desconocidos (Escriba, et al 1997; Evans, 1988; Thornton, 2001). Estos receptores, tienen importancia fisiológica como activadores o represores de la transcripción en muchos procesos fisiológicos, incluyendo la regulación del desarrollo, metabolismo, y reproducción (Evans, 1988). Los receptores esteroideos tienen la característica de que se unen a

proteínas de choque térmico, que incluyen las hsp90 (proteína Heat-shock de 90kDa) y hsp70 (de 70KDa) (Weigel, 1996). Estos complejos pueden ser citoplásmicos o asociados al núcleo, en ausencia de ligando el GR y el AR, son predominantemente citoplásmicos, mientras que el PR y los ERs, son predominantemente nucleares (Weigel, 1996). La unión a ligando deriva en la disociación de las proteínas de choque térmico, la dimerización y la unión a elementos génicos específicos de respuesta a esteroides, la secuencia consenso es un palíndromo separado por tres nucleótidos, los GRs, PRs, ARs, y MRs, se unen a la secuencia AGAACAnnnTGTTCT, los dos receptores de estrógenos, se unen a la secuencia AGGTCAAnnnTGACCT (Weigel, 1996; Pettersson, 2001). Aunque existen otras secuencias para cada receptor, a las que se pueden unir solos, o en interacción con otras proteínas (Kushner, Agard, et al. 2000; Paech, Webb, et al. 1997).

b.- Estructura y localización de los receptores de estrógenos

Las proteínas de la familia de los receptores esteroideos, se han dividido en tres dominios, que consisten, en una región altamente conservada ó de sitio de unión a DNA constituido por dos motivos con Zn⁺⁺ y dos regiones menos conservadas. La región amino terminal del dominio de unión a DNA, exhibe gran variabilidad en las secuencias, entre las distintas proteínas de la familia (Evans, 1998; Petterson, 2001; Weigel, 1996).

Amino terminal , unión a DNA(AF-1)	Unión DNA	Bis.	Unión al ligando (AF-2)	F
------------------------------------	-----------	------	-------------------------	---

Este esquema general, ha sido obtenido de muchos estudios en varios receptores, mediante deleciones específicas, la única región altamente conservada en todos los miembros de la familia, es el sitio de unión a DNA, el resto de las regiones pueden ser variables en los otros receptores, careciendo de ella, o incluso con otras más. Los estudios de deleción, han mostrado que la porción del receptor requerida para la unión a DNA, es muy larga, con cerca de 25kDa. Para ligandos esteroideos, estudios de afinidad muestran que el esteroide interactúa con cerca de 100 residuos. La región de unión a ligando, también cuenta con sitios muy importantes para la regulación de la dimerización, cristalografía de rayos x de GR y ER, revelaron este hecho (Weigel, 1996).

Tanto la región N-terminal, como la C-terminal, resultan trascendentes para la transactivación, estas regiones se llaman AF1 y AF2 (activation function) (Evans, 1988; Kushner, et al 2000). La región que se considera determinante para la localización nuclear, es la llamada región bisagra, entre el sitio de unión a DNA, y el sitio de unión a ligando, esta región también participa importantemente en la unión con las Hsp (Weigel, 1996). Muchas evidencias, señalan que la unión al ligando, cambia la conformación y la hidrofobicidad del receptor (Weigel, 1996). Muchos grupos de investigación, han analizado el papel que puede tener la fosforilación en la activación de los receptores de estrógenos, dos grupos de investigación han reportado una fosfotirosina en el aminoácido 537 del ER α , que se encuentra en el sitio de unión a ligando, otros grupos no han detectado fosfotirosinas, pero han identificado fosfoserinas en el ER α de células COS in vitro, encontrando además, que la secuencia Ser-Pro es el mayor sitio de fosforilación, cuando se da la activación mediada por ligandos (Weigel, 1996). Otros grupos han mostrado que el tratamiento de los ERs con fosfatasas, decrementa su unión al DNA y que la fosforilación de la Tyr⁵³⁷, es importante para la dimerización del receptor y para la unión al DNA. En conjunto, estos estudios que se han realizado mediante deleciones específicas, muestran que la fosforilación de los ERs, puede regular su papel transcripcional y su unión a DNA, aunque no existe una clara certeza sobre este hecho (Weigel, 1996).

Los primeros métodos utilizados para identificar el receptor de estrógenos, se desarrollaron utilizando ligandos marcados con Tritio, [H]³ E₂, visualizando los sitios de unión mediante granos de plata precipitados por autoradiografía, esto se remonta a 1962, cuando se mostró que existían moléculas biológicas tanto en el citoplasma como en los núcleos, que tenían gran afinidad por los estrógenos (Evans, 1988). La primera medición de los niveles de receptores de estrógenos en el tejido nervioso, se mostró también mediante ligandos marcados con H³. El rango de coeficiente de disociación (Kd) determinado, fue de 0.1-1x10⁻⁹M; en el hipotálamo y en la hipófisis (Clark, 1983). En 1996, se clonó de la próstata de rata, una proteína que guardaba fuerte homología con el receptor de estrógenos, y posteriormente se demostró que dicha proteína era un nuevo receptor para los estrógenos, encontrándose además en el cerebro, útero, ovarios y epidídimo. El receptor recién descubierto, se llamó receptor beta de estrógenos (ER β), el que anteriormente era conocido solamente como receptor de estrógenos, pasó a denominarse receptor de estrógenos α (Pettersson, 2001).

La estructura del ER α , ha sido determinada por medio de cristalografía en varias ocasiones, en unión con distintos ligandos endógenos, así como en fármacos agonistas y antagonistas. El primer reporte de la estructura mediante cristalografía, fue en unión con estradiol 17 β (E $_2$) en el sitio de unión al ligando (LBD), posteriormente se ha hecho con el antagonista raloxifén, el antagonista dietilstilbestrol, el antagonista tamoxifén y el fitoestrógeno genisteína, que es antagonista del ER α y agonista del ER β (Pike, et al 2000; Shiau, et al 1998). El sitio de dimerización, incluye cerca del 14% de toda la superficie monomérica accesible en ambos receptores, la interfase es dominada por las α -hélices H11 de cada monómero, que interactúan por medio de residuos hidrofóbicos conservados en la zona amino terminal, tal vez sea por esta razón, que se ha demostrado la existencia de heterodímeros entre el receptor α y el receptor β , aunque la posible actividad funcional de estos, aún está por determinarse (Pike, et al 2000). La mayoría de los ligandos posibles de los ERs, comprenden típicamente dos grupos hidroxilos, separados por una rígida región hidrofóbica, y un grupo fenólico (Pike, Brozowski, et al.2000; Shiau, et al 1998). La cavidad de unión a ligando, está formada por cinco α -hélices, el reconocimiento de ligando, está determinado por una combinación de puentes de hidrógeno, y una serie de residuos hidrofóbicos, que determinan una cavidad no polar dentro de los ERs (Pike, et al 2000). Los antagonistas del receptor, como el raloxifén, se acomodan dentro de esta cavidad, pero su larga cadena desplaza una de las α -hélices, eso cambia la estructura del AF-2, lo que impide el acoplamiento con las proteínas coactivadoras (Shiau, et al 1998). Hay una diferencia de dos aminoácidos en esta zona entre el ER α y el ER β , como consecuencia de esto, tienen distinta afinidad con distintos ligandos, solo en el caso de la genisteína, el ER β tiene de 7 a 30 veces mayor afinidad que el ER α (Pike, et al 2000; Pettersson, 2001). Los coactivadores más conocidos, la familia de los p160, se unen a los ER α en la zona de AF-2 de manera ligando dependiente en un motivo llamado NR-box, que es LxxLL, lo cual ha sido determinado por mutagénesis y cristalografía (Kushner, et al 2000). Existe una estructura en forma de surco hidrofóbico, donde interactúan directamente los coactivadores, esta estructura solo tiene afinidad por los coactivadores cuando está en contacto con el LBD, produciéndose así un sujetador de carga (Pike, et al 2000).

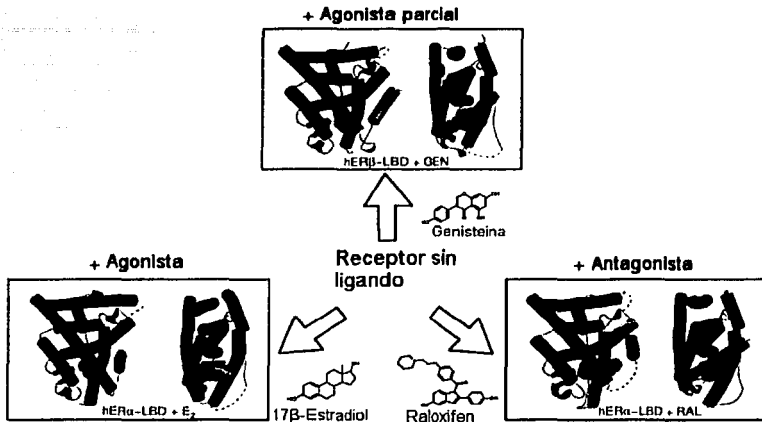


Figura 2. La imagen muestra la unión del ER α con distintos ligandos (Tomado de Pike, et al 2000).

Los receptores de estrógenos, se han localizado en gran cantidad de tejidos, tanto por radioligandos, como por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica (McEwen, et al 1999). El receptor α es el más abundante en la mayor parte del organismo de los mamíferos, se encuentra en el útero, en los ovarios, en la próstata, en el hígado, en el tejido óseo, en los endotelios, pulmones, vesícula seminal, testículos, glándula mamaria, músculo liso, en epitelios y en el sistema nervioso central. El receptor β , se encuentra en menor cantidad que el α , se localiza en todos los tejidos del sistema reproductor de ambos sexos, en el timo, los pulmones, el corazón, la glándula mamaria, algunos epitelios, la corteza adrenal y también en el sistema nervioso central (Saunders, 1997). En el sistema nervioso central, los mRNAs de los receptores de estrógenos se han detectado mediante hibridación *in situ* (Shughrue, et al 1997; Laflamme, Nappi, et al. 1998) y sus proteínas mediante inmunohistoquímica, tanto en ratas (Li, et al 1997) como en humanos (Kruijver, et al 2001). Ambos receptores de estrógenos, se han detectado a lo largo de todo el sistema nervioso central de la rata, coincidiendo con los reportes en humanos, en el cerebro anterior, la retina, el cerebro medio, el posterior y en la médula espinal. Las zonas corticales, tienden a mostrar mayor densidad de receptores β , mientras que la mayor distribución de los receptores α , se da en el hipotálamo y en las zonas del sistema límbico, salvo en el

hipocampo, donde el β es predominante. En el área preóptica, se encuentran los dos tipos de receptores en altas proporciones, en tanto que en el núcleo paraventricular hipotalámico, se ha reportado que el predominante es el β , mientras que el α tiende a expresarse en la zona dorsal parvocelular, en la zona parvocelular anterior, en la zona periventricular y en la parte fornical de dicho núcleo. El receptor β tiende a encontrarse en mayores proporciones en el cerebelo, mientras que el receptor α , se encuentra más representado en el bulbo raquídeo. En la hipófisis anterior, se ha mostrado la existencia de receptores α , mientras que no hay datos que confirmen la presencia del receptor β en dicha glándula (Shughrue, et al 1997; Laflamme, et al 1998; Li, et al 1997).

c.- Función transcripcional del ER α

Se ha determinado, que ambos receptores de estrógenos tienen un importante papel transcripcional en diversos tejidos, modulando una buena cantidad de genes, entre ellos algunos muy importantes para el sistema nervioso central y la reproducción, por ejemplo el de la vasopresina (VP), el de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), el del receptor de oxitocina (OT-R), el receptor 2A de serotonina (5-HT_{2A}), y el mismo ER α (McEwen, Alves, et al. 1999; Donaghue, et al 1999). Las proteínas coactivadoras, incluyen tres proteínas distintas, pertenecientes a la familia de p160: SRC-1, TIF2 y AIB1, así como las acetilasas de histonas, CBP y p300, aunque posiblemente SRC1 y AIB1, también tengan intrínsecamente actividad acetiltransferasa de histonas (Shang, et al 2000; McKenna, 2002) y la RNA helicasa p68 (Kushner, et al 2000).

Activación transcripcional mediada por ligandos

El ligando natural (E₂, estrona (E₁) o estriol (E₃)) se une al ER α en el sitio de unión a ligando, que es el dominio carboxilo terminal. Los factores p300, p160 y pbp se unen al dominio AF-2 del receptor y se da la acetilación de la histona, volviendo la cromatina más accesible (Chen, et al 1999). La RNA polimerasa II en su forma competente para la iniciación de la transcripción no fosforilada, es reclutada por p300, que sin embargo, no vuelve a participar en la reiniciación del proceso. La RNA polimerasa II, es fosforilada por las cinasas CDK7 y CDK9, volviéndose

competente para la elongación del transcrito. P160 y p300 son sustituidos por CBP y pCAF. El ciclo se reinicia constantemente pero sin la participación de p300, mientras el ligando se mantenga interactuando con el receptor (Shang, et al 2000). El comienzo de la transcripción desde la unión al ligando, comienza aproximadamente a los 45 min, y puede prolongarse por más de diez horas, según la cantidad de ligandos disponibles en el citoplasma, este ciclo se ha determinado mediante la utilización de inmunoprecipitación contra las distintas proteínas y con northern blot, contra distintos transcritos derivados de la actividad del ER α (Shang, et al 2000).

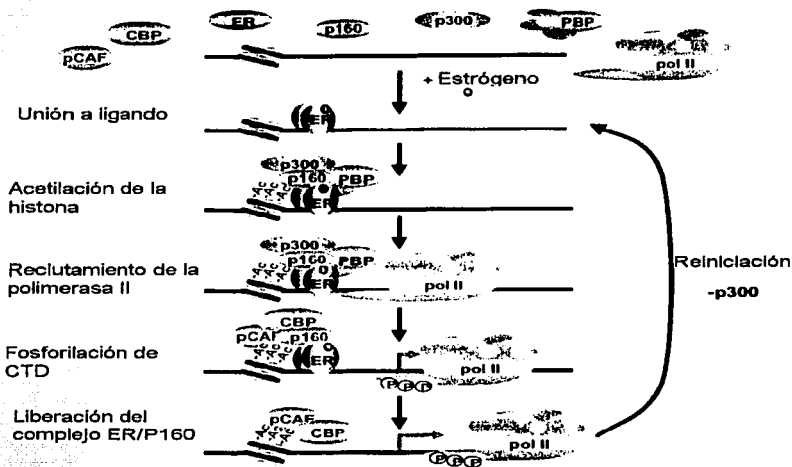


Figura 3. Este esquema muestra la regulación de la transcripción, mediada por el receptor de estrógenos, los distintos coactivadores y la polimerasa II (tomado de Shang, et al 2000).

El ciclo de activación de la transcripción mediado por los ERs propuesto por Shang, Hu, et al. 2000, se considera únicamente sobre secuencias de DNA llamadas elementos responsivos de estrógenos (EREs) con los que el receptor interactúa directamente mediante el sitio de unión a DNA del receptor, mientras que existen otras vías, por las cuales, los ERs no se unen al DNA (Kushner y Agard, 2000). La influencia de los receptores de estrógenos, sobre genes como el de la ovoalbúmina, la collagenasa y el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), se da mediante la interacción con un sitio del promotor; la acción de los ERs sobre la ciclina D se da mediante la

unión a un elemento tipo CRE, al que también se une directamente un dímero de Jun y ATF. Los receptores de estrógenos también pueden favorecer la actividad de promotores que son ricos en motivos GC, en cajas CCAAT y en sitios SP-1 y NF-Y, sin embargo a la fecha no son conocidos con precisión los factores de transcripción, que pueden mediar la acción de los receptores de estrógenos sobre estos promotores (Kushner, et al 2000). Estos hallazgos, elevan la posible influencia de los receptores de estrógenos sobre un gen dado, como en el caso de este trabajo es el TRH, ya que se muestra la participación de los receptores de estrógenos activados, a través de otros factores y no mediante la influencia directa sobre un elemento responsivo del DNA, con el que muchos genes no cuentan (Kushner y Agard, 2000) la posible participación de los receptores de estrógenos en la transcripción del gen de la TRH, se discutirá en un capítulo posterior.

La activación ligando-independiente del ER α

Estudios recientes, proponen que el ER α puede ser activado por vías diferentes a la activación clásica por medio de un estrógeno (Hart y Davie, 2002; Cenni y Picard, 1999). Un estudio *in vitro* con células HeLa, mostró que en ausencia de E₂, con un medio que contenía factor de crecimiento epidermal (EGF) y monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), se expresaban significativamente genes reporteros estrógeno responsivos, sin embargo, su expresión era inhibida por la presencia del antagonista del receptor de estrógenos ICI164384, ya que mediante su interferencia con los dominios de activación, no es posible su correcto acoplamiento con los coactivadores (El-Tanani y Greene, 1997). Estos experimentos, muestran que el ER puede ser activado por fosforilación, mediada por la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) y por medio de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). De este modo, se puede concluir que receptores de neurotransmisores activados por proteínas G, como el de dopamina, y receptores de factores de crecimiento, que activan la vía de señalización de las MAP, pueden activar el receptor de estrógenos (Hart y Davie, 2002; Cenni y Picard, 1999).

Activación dependiente de hormonas

Activación independiente de hormonas

Hormonas esteroideas

Factores de crecimiento peptídicos

Dopamina

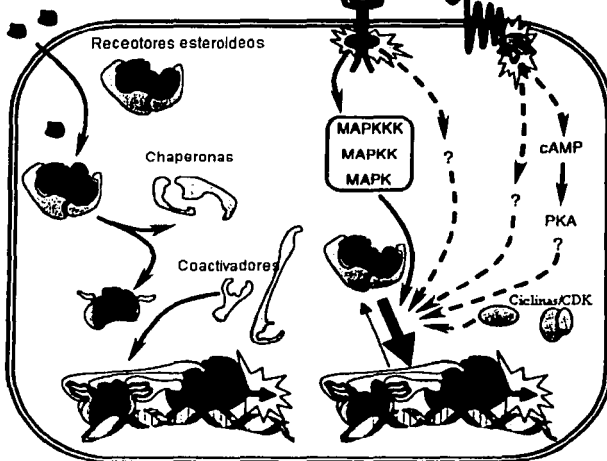


Figura 4. Esquema de la vía de activación de los receptores esteroideos por medio de ligandos, del lado izquierdo, y por medio de factores de crecimiento, neurotransmisores y ciclinas, del lado izquierdo (Cenni, Picard, 1999).

- Activación independiente de ligando.

Estudios preliminares, reportaron que la administración de dibutilil-cAMP, podía mimetizar la actividad de la progesterona, induciendo el comportamiento sexual y reproductivo en ratas hembras ovariectomizadas, indicando que agentes que elevan la cantidad intracelular de cAMP y activadores de la PKA, pueden afectar la actividad de los receptores esteroideos (Cenni y Picard, 1997; Mani, 1994; Mani, et al 1997). Incluso se encontró más adelante, que la dopamina (DA) puede activar respuestas dependientes de receptores esteroideos, tanto en cultivo de células y tejidos, como en modelos *in vivo* (Power, et al 1991). También se ha mostrado notoriamente, que antagonistas de receptores esteroideos, como el RU406 o el tamoxifén, actúan como agonistas en presencia de DA, tanto en los GRs, como en los ERs. Existe algún debate sobre la naturaleza de esta activación, algunos investigadores consideran que el mecanismo por el cual se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

da este cambio, es todavía elusivo, aunque los receptores esteroideos son fosfoproteínas y la vía de la PKA produce la activación de los receptores, lo que hace hipotetizar que se da un proceso de activación, similar al de otros factores de transcripción como CREB mediante fosforilación (Aronica, et al 1993; Mani, 1994; Mani, et al 1997). En otros reportes, estas vías no afectan el estado de fosforilación de los receptores, argumentando que la mutación de los sitios de fosforilación de los receptores esteroideos, solo afectan su respuesta al cAMP de forma parcial (Cenni y Picard, 1999; El-Tanni y Green, 1997). Otros autores, consideran que la fosforilación de los AF-1 de los receptores mediante estas vías, puede activar la transcripción (Kato, et al 1995; Mani, et al 1997; Mani, 2001). En el caso concreto de los ERs, se ha demostrado que el cAMP puede activar su función transcripcional en presencia de antagonistas como el tamoxifen, lo que ha causado serios problemas para las quimioterapias basadas en antagonistas de estrógenos (Fujimoto, Katzenellenbogen, 1994). Los datos disponibles, muestran que el posible blanco de la señalización por DA, está en el dominio de unión a ligando de los receptores, dentro de la zona AF-2 de los mismos (Cenni y Picard, 1999).

Finalmente, también se ha discutido la posible activación dopaminérgica por medio de las vías dependientes de Ca^{++} , mediante la activación de la PLC (fosfolipasa C) membranar se producen DAG(Diacil glicerol) e Inositol-1,4-5-trifosfato que abren canales de Ca^{++} , tanto membranales, como del retículo endoplásmico y la mitocondria, aumentando considerablemente la concentración de iones de Ca^{++} citoplásmicos, activando la proteína reguladora Calmodulina, que activa cinasas que fosforilan al factor transcripcional CREB, por lo que se piensa que también pueden activar los receptores esteroideos por medio de fosforilación (Power y Mani, et al 1991). Un experimento que muestra el posible rol del cAMP y la fosforilación en los receptores de estrógenos, se realizó tomando cultivos primarios de células uterinas, a las cuales se aplicaron E_2 , toxina colérica y cAMP en cada caso. La expresión de un gen reportero que cuenta con un promotor con el sitio de respuesta a receptores de estrógenos, se elevó considerablemente, concluyendo que el cAMP, induce la activación de los receptores de estrógenos. Al añadirse un antagonista de estrógenos a estas pruebas, los efectos positivos se revirtieron, lo mismo ocurrió con un inhibidor de cinasas, estos resultados, implicarían que el gen reportero realmente estaba respondiendo a ERs activados y que esta respuesta era por medio de una cinasa, presumiblemente por la PKA (Aronica y Katzenellenbogen, 1993). De ser correcto este experimento, se muestra claramente la sensibilidad de los ERs a la vía de transducción de la dopamina y de otros

neurotransmisores, como la serotonina (5-HT) y la acetilcolina (ACh), lo cual es de fundamental importancia, para explicar las posibles implicaciones fisiológicas en el cerebro, de los receptores de estrógenos en ausencia de ligandos.

Activación mediada por factores de crecimiento peptídicos

Las interacciones entre las vías de señalización de los factores de crecimiento peptídicos y los receptores esteroideos, se mostraron evidentes con la descripción del efecto estimulatorio del factor tipo insulina 1 (IGF-1) en los ERs, en ausencia de hormonas, incluso se han descrito muchas poblaciones neuronales, que coexpresan ERs y el receptor de IGF-1 (Cardona-Gómez, 2000). Los ERs, son blanco de fosforilación de las MAP cinasas, *in vitro*, y son activados por varios factores de crecimiento que activan la vía de las MAP (Aronica, et al. 1993; Cenni y Picard, 1999). Se ha determinado que factores de crecimiento como IGF y EGF, pueden desencadenar una vía de transducción mediada por la activación de Ras, Raf, MAPK y MAPKK, que tiene como consecuencia la fosforilación de la serina 118, que se encuentra en la zona amino terminal, en el dominio AF-1, activando de esa manera el ER. Esta fosforilación, es indispensable para esta vía de activación ligando-independiente, ya que cuando este residuo es sustituido por alanina, se anula dicho efecto- α (Kato y Endoh, et al 1995).

Aunque la dependencia del dominio AF-1 para que se de la activación, está demostrada, reportes recientes, indican que el proceso es probablemente más complejo de lo que se pensaba, ya que en células de neuroblastoma de ratón, esto no aplica, mientras que en las líneas COS-1 sí lo hace, incluso se ha encontrado que en células endoteliales de pulmón de rata, el ER- α es activado por el EGF, sin embargo, el proceso parece ser independiente de MAP cinasas, y de la fosforilación de la serina 118 (Aronica, 1993). Estos reportes, muestran que aunque existe una activación ligando-independiente de los ERs por medio de factores de crecimiento, los mecanismos y vías por los que se da el fenómeno, son tejido dependientes. La relevancia fisiológica de la activación ligando independiente por este medio, se pone de manifiesto cuando se denota que de esta forma, se imitan los efectos fisiológicos de los estrógenos, a lo largo de todos los tejidos donde se encuentran los receptores, en ausencia de ligandos (El-Tanani y Grenn, 1997).

3.- La distribución de la TRH y su regulación génica.

La TRH (hormona liberadora de tirotrópina) es un tripéptido, conformado por un piroglutamil, histidina y prolina amida (pGlu-His-ProNH₂). La TRH se aisló en 1965 a partir del cerebro de cerdos y ovejas (Guillemin, 1965). La TRH se ha descrito en toda la escala de los vertebrados y se ha encontrado en diversos tejidos. Originalmente se le describió como una hormona que podía estimular la liberación de la tirotrópina (TSH) en la hipófisis, en donde se le han detectado gran cantidad de receptores, en las células que secretan tirotrópina. Sin embargo, con el tiempo se le ha detectado en diversos sitios del sistema nervioso central y se le ha relacionado con distintas funciones fisiológicas, y distintos patrones de comportamiento (Metcalf y Jackson, 1989).

Hasta el momento se ha encontrado sólo un gen de TRH en el genoma de la rata y del humano. La unidad transcripcional de la TRH de la rata, se extiende 2.6 kilobases, e incluye tres exones interrumpidos por dos intrones. El primer exón codifica para la región no traducida del mRNA en el extremo 5', el exón 2 codifica para el péptido señal, y la mayoría del péptido aminoterminal, el exón 3 codifica lo que queda de la secuencia no traducida del proTRH (Lee, 1988).

El desarrollo de antisueros específicos contra la proTRH, formas extendidas de TRH y un número de secuencias de péptidos intermedios que no tienen TRH, han permitido dilucidar el procesamiento de la proTRH (Lechan y Jackson, 1982). El procesamiento de la proTRH es tejido específico, en el NPV hipotalámico de la rata, ocurre rápidamente en el soma de las neuronas, esto es evidenciado por la no detección de inmunoreactividad para péptidos extendidos. Por otro lado en el bulbo olfatorio se puede detectar inmunoreactividad para varios de los péptidos extendidos e intermedios (Lechan, 1986).

Mediante diversas técnicas, se ha descrito la existencia de neuronas TRHérgicas a lo largo de todo el sistema nervioso central; este se encuentra especialmente en el bulbo olfatorio, en el tálamo, en el cerebelo, en los núcleos de rafe y en la zona dorsal de la médula espinal (Sgerson, 1987). La más conocida y estudiada zona de distribución de la TRH, es el hipotálamo, donde se ha detectado en el área preóptica, en el hipotálamo anterior, en el núcleo arqueado, en el núcleo dorsomedial hipotalámico y en el núcleo lateral hipotalámico (Lechan y Jackson, 1982).

La TRH está presente en gran abundancia en axones que terminan en la eminencia media hipotalámica, en la zona de contacto neurohemal del sistema tuberoinfundibular. Las terminales axónicas inmunoreactivas se encuentran primariamente en la región medial de la zona externa de la eminencia media, y en una cercana aposición a los vasos capilares del sistema portal. Algunos axones se extienden más allá distalmente, terminando en la hipófisis posterior, mostrando un característico patrón de inmunoreactividad tipo racimo (Lechan y Jackson, 1982).

Los somas neuronales que originan los axones terminales de la eminencia media, se encuentran mayoritariamente en el núcleo paraventricular hipotalámico, que está compuesto por dos grandes zonas, las divisiones magno y parvocelulares. La división magnocelular, se divide a su vez en tres subdivisiones, y la parvocelular en cinco subdivisiones (Akil, 1999). Algunas neuronas magnocelulares que muestran inmunoreactividad de proTRH, proyectan sobre la eminencia media y la hipófisis posterior, mientras que la mayoría de los axones con inmunoreactividad de TRH encontrados en la eminencia media, mediante marcajes retrógados, han encontrado sus somas en las divisiones parvocelulares del núcleo paraventricular hipotalámico. Mediante esta tecnología, se ha detectado que en la zona anterior casi no se encuentran células TRHérgicas que proyecten hacia la eminencia media, estas células se encuentran esencialmente en las células parvocelulares mediales y periventriculares, de la zona media y la zona posterior del NPV (Lechan, et al 1980).

A pesar de que muchas células en el NPV han mostrado que contienen más de un neuropéptido, las neuronas que sintetizan TRH, no expresan otro péptido. Sólo en algunos raros casos, se ha mostrado que coexisten la TRH y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la neurotensina (NT) (Lechan, et al 1983) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) (Fekete, 2000). El núcleo paraventricular, está poblado con neuronas adyacentes a las células TRHérgicas, que producen otros neuropéptidos, además de que el NPV recibe numerosas aferencias de otras regiones del diencefalo, del telencéfalo y del tallo cerebral. Se conoce evidencia morfológica de la presencia de axones catecolaminérgicos en asociación sináptica con neuronas TRHérgicas en el NPV. Utilizando antisueros contra las enzimas que sintetizan las catecolaminas, especialmente contra las que sintetizan epinefrina y norepinefrina. El NPV recibe una fuerte invasión de

estos axones en su parte medial y periventricular. El origen de los axones que forman sinapsis con las neuronas TRHérgicas neuroendócrinas, es en las poblaciones catecolaminérgicas del bulbo raquídeo, lo que ha sido confirmado mediante estudios electrofisiológicos (Metcalf y Jackson, 1989).

En el núcleo medial preóptico, se ha descrito que las neuronas TRHérgicas, pueden contribuir a la regulación de la temperatura corporal (Choi, et al 2002). La TRH atenúa el efecto hipotérmico del pentobarbital, del etanol y de otros péptidos, además de inducir el aumento en la temperatura corporal tras su administración a nivel central. Particularmente, cuando es inyectado en el área preóptica, decrementa la actividad de las neuronas sensibles al calor e incrementa la actividad de las neuronas sensibles al frío. Parte de la respuesta de la TRH a la hipotermia, sin duda se debe a su papel en la liberación de la TSH, mediada por las neuronas del NPV, aunque la mediación catecolaminérgica sobre el núcleo medial preóptico puede ser de suma importancia, dado que la inyección de pirógenos en el hipotálamo puede provocar elevaciones en los niveles de TRH preóptica (Hori, et al 1988).

La retroalimentación negativa de las hormonas tiroideas sobre la TRH del hipotálamo, ha sido el punto de inicio del estudio del promotor del gen de la TRH (Burbach y Peter, 2002). Se ha identificado que el gen de la TRH es responsivo a otros receptores nucleares distintos al de hormonas tiroideas (THR), el efecto del receptor del ácido retinóico se ha investigado en el gen de la TRH de ratón, encontrándose que mantiene una regulación en la expresión de la TRH (Burbach y Peter, 2002). Los receptores de glucocorticoides pueden inhibir la expresión de la TRH *in vivo*, aunque *in vitro* la incrementan, el sitio de unión al receptor de glucocorticoides, es importante para la modulación del gen de TRH por medio de el receptor GR y una serie de cofactores no identificados. Se ha observado que los GRs, pueden de manera importante activar el gen de la TRH *in vitro*, así como el factor CRE y el complejo AP-1. El AMPc puede sustancialmente aumentar la actividad del promotor de la TRH, mediante la vía de la PKA, y activación del factor de transcripción CREB (Luo y Wang, et al 1999). El sitio de respuesta CRE se sobrelapa con el sitio de respuesta a hormonas tiroideas, por esta razón se ha sugerido que la inhibición de CREB para unirse con esta región por medio de las hormonas tiroideas, puede ser el mecanismo de la regulación negativa dependiente de la T₃ del gen de la TRH (Wilber y Xu, 1998). El promotor del TRH tiene a su vez un sitio de

unión a proteínas de tipo STAT, y un sitio de unión llamado SP-1, que también responde a las proteínas STAT, estas proteínas pertenecen a una vía de transducción, que responden a receptores de tirosina cinasas, como los de varios factores de crecimiento peptídicos (Harris, et al. 2001). A la fecha no se ha detectado ningún sitio de respuesta específico para el receptor de estrógenos, pero todavía no se descarta esa posibilidad. De cualquier manera, el receptor cuenta con cajas CG y con el sitio AP-1, que son sitios donde pueden interaccionar los receptores de estrógenos.

4.- Participación del ER α en procesos conductuales asociados a la lactancia.

Mediante una combinación de técnicas moleculares y de observación etológica en situaciones controladas, se ha determinado que los receptores α de estrógenos, tienen un relevante papel en el establecimiento y continuidad de la conducta maternal en los roedores. Estudios llevados a cabo en ratas, muestran que en ciertas áreas del cerebro, como en el área preóptica medial, el núcleo basal de la estria terminal, el septum lateral, la amígdala medial posterior y la hipófisis lateral, hay una trascendente coexpresión de la proteína de expresión temprana c-Fos, y el ER α cuando las ratas lactantes hembras son estimuladas por las crías, mientras que los niveles de coexpresión sin la estimulación de las crías, son muy bajos. Por otra parte, los niveles de expresión del ER α , no muestran cambios significativos con y sin estimulación de las crías, mientras que la expresión de c-Fos, aumenta significativamente cuando hay estimulación de las ratas madres, por parte de las crías (Lonstein y Greco, 2000). En otro experimento, llevado a cabo con ratones "knockout" en el ER α (ERaKO), se ha mostrado, entre otras alteraciones del comportamiento, en las hembras se afecta el comportamiento sexual, y el comportamiento maternal. Entre otros parámetros medidos, se ha encontrado un alto índice de infanticidio, y entre las hembras que no lo mostraron, se muestran conductas maternas deficientes, como la imposibilidad de regresar las crías al nido (Ogawa, et al 1998).

Los patrones conductuales maternos en las ratas, se manifiestan por una serie de comportamientos bien caracterizados y medibles (Lonstein, et al 2000). Los comportamientos son la postura de amamantamiento *Crouching* que provee de calor a las crías, y una posición adecuada para alimentarse, es importante decir que las crías en sus primeros días de nacidas, no tienen un control muy eficiente sobre su temperatura corporal, por lo que este comportamiento de la madre es esencial para su supervivencia. Otro comportamiento es el de limpieza exhaustiva con la lengua *Licking* que es importante por razones higiénicas del nido, aparte de que estimula la actividad secretoria, excretoria y favorece el desarrollo de los órganos sexuales de las crías. En este comportamiento también trasciende que la madre bebe la orina de las crías, lo que se considera como reciclaje de agua, dados los altos niveles de líquido que las ratas invierten en la producción de leche. El transporte y regreso de las crías al nido, se aprecia también importante para mantener a las

crías bajo la protección de la madre, cerca de su fuente de alimentación y cerca de su fuente de calor. Endocrinológicamente se dan algunos cambios importantes, la madre comienza a emitir feromonas que son detectadas por las crías y las atraen hacia ella. Las madres presentan una hiperfagia de sales de sodio y un continuo lamerse las glándulas probablemente para mantener la estimulación de estas y por autoaseo (Numan, 1988)

Se considera que las hormonas esteroideas sexuales, estrógenos y progesterona, así las hormonas lactogénicas, como los lactógenos placentarios y la prolactina, que se incrementan fuertemente durante el embarazo, se encuentran involucradas en el establecimiento de la conducta maternal (Mann, Bridges, 2001). La concentración de estrógenos se va incrementando durante los primeros días de la preñez, llegando a un pico en el día del parto, la progesterona por otra parte, tiene un fuerte incremento durante los primeros días de la preñez, pero se mantiene estable hasta los últimos días del proceso, cuando sufre una vertiginosa caída, que es necesaria para que se pueda llevar a cabo el parto, y para que la conducta maternal pueda expresarse (Mann y Bridges, 2001). Si posteriormente al parto, se restituyen los niveles de progesterona (P_2), la conducta maternal es inhibida, pero si se bloquean sus receptores con el antagonista RU406, entonces la conducta maternal se expresa normalmente (Numan, et al 1999).

Los experimentos clásicos sobre la implantación de la conducta maternal, reportan consistentemente, que las hembras vírgenes expuestas a crías, durante siete días, comienzan a desarrollar conductas maternas bien desarrolladas, aunque sin producción de leche (Numan, 1988). Incluso los machos pueden llegar a desarrollar estas conductas, aunque la latencia de sensibilización dura el doble y sus conductas no son tan logradas. La estimulación de la conducta mediante métodos hormonales, se ha logrado con bastante éxito. Primero se consiguió utilizando un tratamiento a base de E_2 con ratas ovariectomizadas e histerectomizadas, la explicación de esto, es que el útero no presentará una competencia a la unión de estrógenos frente al cerebro (Siegel, et al 1978). La manera óptima encontrada, ha sido mediante el tratamiento con E_2 y P_2 durante unos días, y después, retirando la progesterona y dejando únicamente el estradiol, en ese momento, las ratas comienzan a expresar la conducta maternal, esto es similar a lo que ocurre durante el final del parto, y el establecimiento de la lactancia (Bridges, 1984). Inmediatamente después de estos experimentos, se mostró que la técnica no funcionaba con ratas

hipofisectomizadas, lo que ampliamente sugiere la participación de la PRL, y la OT, estimuladas por E₂ (Bridges, 1985).

Una vez determinado que los estrógenos podían mediar el establecimiento de la conducta maternal en sinergia con la prolactina, los lactógenos placentarios, la oxitocina, y la ausencia de progesterona, se presenta la cuestión de cual es el mecanismo por el cual los estrógenos, se encuentran mediando esa conducta. Una de las áreas que se han propuesto como altamente receptivas a hormonas esteroideas, que además se encuentra fuertemente implicada en el comportamiento maternal, es el área preóptica medial (MPA) El tratamiento sistémico con estrógenos, induce efectivamente la implantación de la conducta en hembras y machos, aunque con una diferencia de 20 a 1, en las dosis de E₂ necesarias para la implantación de la conducta en cada caso, poniendo de relieve que el cerebro de los machos, tiene importantes diferencias en su organización celular, frente al cerebro de las hembras, y que este último es mucho más adecuado para el cuidado materno (Roseblatt, Hazelwood, et al. 1996). Otro experimento que consiste en introducir los estrógenos directamente, mediante una cánula en el MPA ha mostrado resultados similares, aunque en menor magnitud, lo que muestra que no sólo el área preóptica está involucrada en la conducta maternal mediante estimulación esteroidea, sin embargo la conducta sigue siendo expresada tanto en hembras como en machos, aunque en diferentes dosis-respuesta (Rosenblatt, 1996). Otro experimento, muestra que las lesiones citotóxicas en el MPA, afectan claramente la conducta maternal en las hembras adultas, sin embargo, las mismas lesiones en ratas en la pubertad, no son efectivas en la disrupción de la conducta maternal (Olazábal, Kalinicheb, et al. 2002). Estos resultados ayudan a concluir, que el MPA, tiene un marcado dimorfismo sexual, en su arquitectura y biología celular, que aparentemente se delimita durante el desarrollo, por medio de la influencia de las hormonas esteroideas.

En la aproximación a la morfología de las células del área preóptica medial, se ha observado mediante tinciones argénticas, que el tamaño y los somas son significativamente mayores en ratas ovariectomizadas tratadas con E₂ Y P₂, y en ratas preñadas, respecto a ratas ovariectomizadas sin restitución, ratas en diestro o lactantes. Sin embargo, se ha observado que la cantidad y longitud de las proyecciones dendríticas, se mantiene en altos niveles, en ratas ovariectomizadas sin restitución y restituidas con E₂, en las ratas preñadas y en las ratas lactantes. La diferencia entre patrones de crecimiento somático y dendrítico que

se observa en ratas lactantes, se atribuyen a las cualidades tróficas de las hormonas de la lactancia, como la PRL (Keyser-Marcus, Stafisso-Sandoz, et al. 2001).

Consideremos entonces que el área preóptica medial, es un blanco muy importante para las hormonas esteroideas, el que según todas las evidencias, controla en gran medida la conducta maternal. De cualquier forma, no son comunes los procesos neurobiológicos que sólo implican una zona del cerebro, por eso se han realizado estudios que buscan dilucidar la relación del área preóptica con otras zonas del cerebro, que pudieran tener relevancia en la expresión de la conducta maternal, y que pudieran actuar como relevos de la estimulación estrogénica sufrida por el MPA. Se han desarrollado experimentos en los que se aplican lesiones citotóxicas en algunos núcleos y cortes de las vías que los comunican. Los resultados muestran que cuando existen lesiones en el MPA se reduce la expresión de c-Fos y Fos B en la estría terminal basal (BST), además de interrumpir el comportamiento maternal. A su vez, lesiones en la BST, han hecho que se reduzca sustancialmente la expresión de las proteínas Fos en el MPA, además de bloquear la conducta maternal. La interrupción de las vías entre ambas estructuras, resulta en la inactivación de Fos y la interrupción de la conducta. Esto muestra que las neuronas del MPA receptoras de estrógenos, pueden mantener proyecciones sobre una o más áreas del cerebro, siendo fundamentales en el control de la conducta maternal (Stack, Balakrishnan, et al. 2002).

Otra serie de experimentos, muestra la expresión diferencial de c-Fos en diferentes paradigmas hormonales en el MPA y otras zonas. En ratas vírgenes tratadas con E₂, se encontró una significativa elevación de la inmunoreactividad de c-Fos en el MPA, sin embargo, se encontró que en ratas después del parto, esa respuesta de c-Fos, se incrementaba todavía más. El tratamiento de ratas después del parto con P₂ y E₂, en cambio provocó una caída significativa de la inmunoreactividad de c-Fos, en el MPA, el BST y el septum lateral dorsal (LSd) y ninguna expresión de la conducta maternal; las ratas tratadas sólo con el estrógeno mostraron conducta maternal y elevados niveles de inmunoreactividad para c-Fos, finalmente, los animales tratados exclusivamente con P₂, no expresaron conducta maternal y también mostraron bajos niveles de inmunoreactividad de c-Fos (Sheehan y Numan, 2002).

En resumen los estudios más antiguos que relacionan a los esteroides sexuales femeninos con el establecimiento de las conductas maternas, se apoyan directamente con experimentos sobre las áreas del cerebro afectadas por los mismos y sobre los que se cree, radica parte del control de la conducta maternal. Con la irrupción de los animales genéticamente modificados *knockout*, se ha mostrado una serie de genes de los cuales la implantación y desarrollo de la conducta maternal, depende completamente. Estos son: algunos factores de transcripción, que incluyen la proteína Fos, algunas enzimas, que incluyen la dopamina beta hidroxilasa y la óxido nítrico sintasa, dos receptores que son el ER α y el PRL-R, y la OT (Leckman y Herman, 2002).

5.- Introducción a la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*.

a.- Inmunohistoquímica en el sistema nervioso central.

La técnica de inmunohistoquímica, busca identificar constituyentes de un tejido o una célula, por medio de las interacciones anticuerpo-antígeno. El sitio en el cual el anticuerpo se une al tejido o célula, es identificado tanto por marcado directo, como por el uso de un sistema de marcado secundario. Los antígenos blanco de la técnica, pueden ser proteínas, lípidos, carbohidratos y otras moléculas biológicas, que pueden tener uno o más sitios de unión a anticuerpos. Estas son zonas altamente específicas en su secuencia y topografía, compuestas por un número pequeño de aminoácidos o monosacáridos, conocidas como grupos determinantes antigénicos, o epítopes (Miller, 1999).

Los anticuerpos pertenecen al tipo de proteínas séricas, conocidas como inmunoglobulinas. La IgG es el tipo de anticuerpo más utilizado para la inmunohistoquímica. La molécula de IgG, está compuesta por dos pares de polipéptidos, dos cadenas ligeras y dos pesadas, unidas mediante puentes disulfuro, formando una estructura en forma de Y. Las regiones terminales de cada brazo, varían de secuencia de aminoácidos, y son conocidas como dominios variables, esta variabilidad, provee especificidad para un epítope particular, y facilita la unión con el antígeno contra el que fue originado (Boenish, 2001). Las cadenas laterales de aminoácidos, del dominio variable del anticuerpo, forman una cavidad que es geométrica y químicamente complementaria a un tipo de epítope. La forma precisa en la que el anticuerpo se adapta al epítope, explica el alto grado de especificidad que muestran las interacciones antígeno-anticuerpo. La unión del anticuerpo y el antígeno, se mantiene mediante una combinación de puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas y fuerzas de Van der Waals (Miller, 1999).

Los anticuerpos llamados policlonales, se producen inmunizando un animal con una molécula específica purificada, conocida como inmunógeno, llevando el antígeno de interés. El animal tendrá una respuesta humoral al inmunógeno, y los anticuerpos así producidos, se obtienen del suero del animal. El animal inmunizado, producirá muchas clonas de anticuerpos, provenientes de diferentes células plasmáticas, cada una producirá un tipo de anticuerpo, con una ligera diferencia en especificidad a la variedad de epítopes

presentes en un inmunógeno. Algunos de estos anticuerpos, pueden hacer una reacción cruzada con otras moléculas que no son de interés, y necesitan ser removidos (Boenish, 2001). Los anticuerpos monoclonales, se comenzaron a fabricar tras el desarrollo de la técnica del hibridoma, en este caso, los linfocitos B que producen los anticuerpos y los mielomas neoplásicos, que pueden constituir líneas celulares "inmortales", pueden producir un híbrido, con posibilidades de ser clonado indefinidamente. Si se logra que los híbridos produzcan los anticuerpos de interés, cada línea producirá anticuerpos idénticos, indefinidamente (Boenish, 2001). La ventaja de utilizar anticuerpos monoclonales, reside en la alta especificidad de estos, y que además se podrá contar con el mismo anticuerpo de forma indefinida, haciendo que cualquier prueba realizada con ellos, sea completamente reproducible. La desventaja de los anticuerpos monoclonales, es que requieren condiciones de incubación muy específicas para lograr la detección adecuada, además de que es difícil utilizarlos en tejidos de rata ya que están fabricados con células de ratón, siendo estos dos animales muy cercanos filogenéticamente. La ventaja de los anticuerpos policlonales, es que son muy versátiles de fabricar y de utilizar, ya que aceptan un amplio rango de condiciones de incubación, la desventaja principal, es que las proteínas que los constituyen, pueden variar con el tiempo, ya que lo que los define, es el inmunógeno utilizado para fabricarlos.

Dentro de los sistemas de detección, los enzimáticos son los más utilizados en la inmunohistoquímica. Y la incubación de la enzima con un cromógeno, usando un método de histoquímica estándar, produce una reacción coloreada y estable, visible con el microscopio óptico. Las peroxidasas pueden reaccionar con el cromógeno tetrahidrocloruro de 3'-Diaminobenzidina, que genera un precipitado color café oscuro, que es permanente, ya que no es removido por ningún solvente como el alcohol. Existen otros cromógenos más sensibles, pero tienen la desventaja de que pueden ser fácilmente lavados con solventes como el alcohol y el xileno (Happerfield, 1993). Aparte de los cromógenos, se pueden utilizar otras técnicas, como la de marcados fluorescentes, que normalmente utilizan un anticuerpo secundario, que se une al primario y lleva un fluoróforo, que se excita tras la emisión de ciertas longitudes de onda y emite luz en longitudes de onda específicas, método muy importante para marcajes múltiples en una sola célula (Carlton, 2002). También se pueden utilizar radioisótopos, conjugados con los anticuerpos, para lo cual los

tejidos son tratados con una emulsión fotográfica, las radiaciones pueden velarla y mostrar la localización de los anticuerpos, mediante la precipitación de los granos de plata de la emulsión (Hunt, 1986). Una técnica ampliamente utilizada, que es la que seguimos en este trabajo, es la del complejo ABC. Esta técnica parte de la unión de un anticuerpo primario a su epítome, la unión a este de un anticuerpo secundario unido a la vitamina biotina, y finalmente la adición del complejo ABC (avidin biotin complex) que consta de unidades de la proteína avidina, y del complejo biotina-peroxidasa. La avidina tiene cuatro sitios de alta afinidad hacia la biotina, por lo cual se forman largas cadenas de este complejo sobre el anticuerpo secundario, que concentran gran cantidad de actividad peroxidasa sobre el anticuerpo primario. Al añadirse el sustrato H_2O_2 , las especies reactivas de oxígeno liberadas, oxidan el fuertemente reducido DAB, formando un precipitado café sobre la zona de interés (Happerfield, 1993).

La inmunohistoquímica en el sistema nervioso central, normalmente se realiza sobre cortes de tejido previamente fijados, con aldehídos generalmente, y pueden mostrar con gran detalle, la morfología del área, donde se encuentra la proteína de interés (Cuello, 1983). Existen algunos métodos de inmunohistoquímica que pueden ser cuantitativos, pudiendo mostrar por densidad óptica, la cantidad de moléculas blanco que se encuentran en una zona, como en el caso de la fluorescencia. Sin embargo, el principal uso de la inmunohistoquímica, ha sido la descripción de distribuciones anatómicas y celulares, de las moléculas que se sintetizan en el sistema nervioso central, así como de receptores para miles de moléculas provenientes de diferentes órganos (Cuello, 1983). Los controles más comúnmente utilizados para verificar la especificidad de las señales obtenidas, son, primero la realización de la prueba, sin usar el anticuerpo primario, esto puede mostrar problemas de tinción inespecífica del anticuerpo secundario, o del sistema de amplificación. Otro control común, es la utilización de anticuerpos primarios, incubados en tejidos, donde se sabe que existen grandes cantidades de epítomes del anticuerpo, después utilizando el anticuerpo para la prueba de interés, lo cual debe de mostrar una tinción menor a la que se obtiene con el anticuerpo primario "fresco". Uno de los controles más efectivo, es la prueba de competitividad, es decir, la incubación del anticuerpo primario junto con la molécula que se utilizó como inmunógeno. Esta técnica bloquea el anticuerpo primario, y si la tinción es desplazada, entonces se demuestra que la tinción es específica (Miller, 2002).

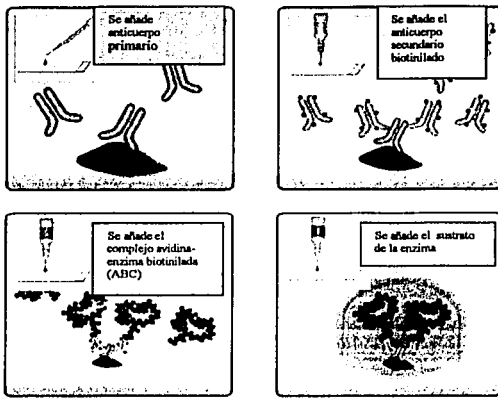


Figura 5. El método de tinción ABC. Las moléculas blanco son detectadas por las cadenas cortas del anticuerpo primario, un anticuerpo secundario que detecta al primario se une a su cadena larga, a su vez está unido a moléculas de biotina, que interaccionan con la avidina, formando un largo complejo en el que también están las enzimas peroxidadas. Tomado de Vector labs

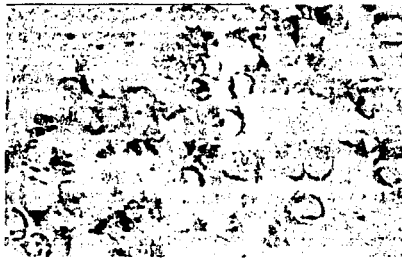


Figura 6. Fotomicrografía de la inmunohistoquímica del receptor de prolactina, tomada con el objetivo de 40x. La técnica se llevó a cabo utilizando el método de detección y amplificación, del complejo Avidina biotina peroxidasa (Vector). En la imagen se muestran células inmunoreactivas en el giro dentado del hipocampo, nótese que la tinción es membranar y citoplásmica. Tinción e imagen del autor.

b.-Hibridación *in situ* en el sistema nervioso central.

La histoquímica de hibridación *in situ*, es una técnica anatómica y molecular, que se utiliza para la localización de secuencias específicas de RNA mensajero, en células individuales, o secciones de tejido. Esto da una indicación semicuantitativa del nivel de expresión del gen buscado en una célula. El método de hibridación *in situ*, fue introducido en 1969 y es ampliamente usado en neurobiología hoy en día, para determinar en qué

células y bajo que circunstancias, se transcriben los genes de interés (Henderson, 1996 ver referencias). La base de esta técnica, es la posibilidad que tienen los oligonucleótidos, tanto de RNA como de DNA, de penetrar e interactuar con secuencias blanco, estos últimos pueden detectarse en el mismo lugar de los tejidos y las células en los cuales se encuentran (Polak, 1990).

Las sondas más comúnmente utilizadas, son los oligonucleótidos sintéticos y las sondas de cRNAs preparadas mediante transcripción *in vitro*, las sondas de los oligonucleótidos, son cadenas sencillas de DNA de 30 a 50 bases, y son preparadas mediante un sintetizador de DNA (Wilcox, 1993). Las sondas de RNA, son sintetizadas mediante un sistema de transcripción *in vitro*, usando plantillas de cDNA, que puede tener una kilobase de largo (Wilcox, 1993). La diferencia principal entre ambos métodos, es que la sonda de cRNA es más sensible, es más accesible y tiene mayor capacidad de retención que el oligonucleótido. La utilización de un oligonucleótido es mucho más sencilla que la sonda de RNA ya que la sonda de DNA es más estable (Wilcox, 1993). Una de las ventajas principales de los oligonucleótidos de DNA, es que nos permite discriminar fácilmente entre dos secuencias parecidas de mRNA blanco, lo que es difícil con las sondas de cRNA, que suelen ser mucho más largas. Es evidente que las sondas de cRNA resultan mejores cuando se trata de detectar mRNAs en baja proporción (Mansour, et al. 1994).

Los marcajes comúnmente utilizados para las pruebas de hibridación *in situ*, son nucleótidos marcados con la vitamina biotina, la proteína digoxigenina, y algunos radioisótopos, el ^{32}S , el ^{32}P , el ^{125}I y el ^3H (Henderson, 1996). Cuando el oligonucleótido o sonda de cRNA son marcados con biotina, a esta se puede acoplar un sistema de amplificación ABC, como el que se utiliza en la inmunohistoquímica, utilizando la enzima peroxidasa, que al digerir su sustrato, provoca la precipitación del DAB (Happerfield, 1993; Bloch, 1993). El sistema de marcaje mediante digoxigenina, permite que esta proteína sea reconocida mediante un anticuerpo contra la misma y que de ese modo, se puede seguir un procedimiento de inmunohistoquímica estándar; el que normalmente se utiliza en este caso, es el de la fosfatasa alcalina (Bloch, 1993). En el caso del marcaje mediante radioisótopos, se utilizan nucleótidos que contienen el radioisótopo. Para el caso de oligonucleótidos de DNA, estos se marcan mediante la enzima transferasa terminal de DNA, añadiéndose al extremo 3' de la cadena, nucleótidos marcados, tales como el dATP[^{35}S]. En el caso de las

sondas de cRNA, durante la transcripción *in vitro*, se pueden usar nucleótidos marcados, como el UTP [^{33}P] (Henderson, 1996). Los radioisótopos, son utilizados como marcajes, cuando las pruebas necesitan tener una alta sensibilidad, y cuando se requiere utilizar análisis cuantitativos, con los que se pueda estimar la cantidad de mRNA que se encuentra en cierta célula o tejido (Henderson, 1996). En el caso de los oligonucleótidos de DNA, normalmente se marcan con radioisótopos, para ofrecer resultados satisfactorios (Henderson, 1996). Normalmente, se evita el uso de los radioisótopos más peligrosos, como el ^{125}I , a pesar de que ofrece rápidos resultados, no puede obtenerse una resolución celular adecuada. Los más utilizados en hibridaciones *in situ*, son los nucleótidos marcados con el ^{35}S y el ^{33}P , que tienen características similares, aunque el ^{33}P tiene una vida media menor, el tritio (^3H) otorga una alta resolución, pero requiere de largos tiempos de exposición, y normalmente no se utiliza con neuronas, aunque se propone su uso, para el estudio de células gliales (Kitamura, et al 1987).

La sonda es colocada en la sección de tejido junto con una mezcla de hibridación, que determina la temperatura media, que es la temperatura a la cual el 50% de las población de moléculas dúplex se disocia en hebras sencillas (Henderson, 1996). Los dúplex de RNA-RNA son más estables que los de RNA-DNA, la unión entre la citosina y la guanina, se da mediante un triple puente de hidrógeno, por lo cual tiene más estabilidad que la interacción entre A-T/U que solo tiene dos, así que la proporción de las bases de la sonda o el oligonucleótido, son determinantes para el cálculo de la temperatura media (Shirihari, 1999). Con unas condiciones más astringentes, altas temperaturas, bajas concentraciones salinas y altas concentraciones de formamida, se forman hélices estables entre secuencias homólogas, de lo contrario, pueden formarse híbridos entre secuencias que no corresponden (Henderson, 1996). La formamida, es utilizada como un desestabilizador de hélices, lo que permite que la temperatura media baje sustancialmente, mientras que las concentraciones de NaCl, estabilizan los híbridos, aunque por arriba de 0.4M, esta relación se rompe. En las soluciones de hibridación, también se utiliza el dextran sulfato, que acelera la tasa de hibridación, el ditiotreitól (DTT), que previene la oxidación de los grupos tioles, cuando se utilizan isótopos como el S^{35} . También se utilizan varios ácidos nucleicos, que reducen la unión inespecífica de la sonda (Henderson, 1996). Posteriormente a la hibridación, se requieren una serie de lavados, lo común son los lavados con soluciones con alta

concentración salina y temperatura ambiente, con el fin de remover un exceso de prueba, después se utilizan temperaturas elevadas y cada vez más bajas concentraciones salinas, para eliminar los posibles errores de apareamiento (Tecott, 1994). Si el revelado es mediante métodos cromogénicos, entonces se procede al desarrollo del color (Bloch, 1993). Si en cambio, son utilizadas marcas radioactivas, las muestras deben de ser expuestas a una emulsión fotográfica compuesta de haluros de plata, que en los sitios expuestos a radiaciones se reducen, y mediante un revelado con hiposulfitos, se precipitan granos de plata, revelando el sitio exacto de la radiación; el resto de la emulsión es destruida. Este proceso, se conoce como microautoradiografía, y así se visualiza, en que sitios las sondas radioactivas, encontraron su hebra complementaria (Henderson, 1996 ver referencias). Existen paquetes informáticos, que cuantifican la cantidad de granos de plata precipitados y así se obtienen datos cuantitativos, sobre la cantidad del mRNA blanco que existe en la muestra (Henderson, 1996; Sánchez, et al 1997, Sánchez, et al 2001).

Los controles que pueden utilizarse en la hibridación *in situ*, son la utilización de sondas sentido, y las sondas aleatorias, que son diseñadas agregando bases al azar, y evitando que sus secuencias coincidan con alguna cadena nucleotídica conocida, así como el tratamiento con RNAsas, en caso de utilizar sondas de DNA (Tecott, 1994).



Figura 7. Aquí se muestra la hibridación *in situ* para detectar el mRNA de TRH en el núcleo paraventricular hipotalámico. Los cúmulos brillantes, son granos de plata precipitados, que indican los lugares detectados por el oligonucleótido, marcado con ^{35}S . La parte más oscura al

centro es el tercer ventrículo. La imagen fue capturada con el objetivo de 5x, utilizando el campo oscuro sin filtros. Laboratorio de neurobiología celular y molecular, del Instituto de Biotecnología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Antecedentes directos

Al confirmarse el importante papel de la TRH como factor liberador de prolactina, así como la inhibición del tono dopaminérgico que ocurre durante la lactancia, queda de manifiesto que la TRH debe tener un papel importante en la fisiología de la lactancia, que debe ser regulado multifactorialmente, presumiblemente por varios de los factores fisiológicos que ocurren durante la lactancia. Desde hace una década, se mostró que en diferentes estados fisiológicos propios de las ratas hembras, se daban cambios importantes en la fisiología de la TRH, estos desde la última etapa del embarazo hasta el final de la lactancia y durante el ciclo estral, en estos experimentos también se mostraban coincidencias entre las cantidades de péptido de TRH encontrado en la eminencia media y las concentraciones de prolactina sérica, lo que apuntaba a un papel importante de la TRH, en cuanto a la regulación de la prolactina durante la lactancia (Uribe, et al 1991).

En años posteriores, se demostró que en respuesta al estímulo de succión, los niveles de mRNA de TRH se incrementaban consistente y transitoriamente en el núcleo paraventricular hipotalámico (Uribe, et al 1993), al observarse que un efecto similar se producía frente a la exposición aguda al frío, se intentó determinar si había diferentes poblaciones de neuronas TRHérgicas, aquellas que podrían responder al frío, y aquellas que lo hacían a la succión, aunque se encontraron ciertos patrones, como la particularidad de que la proteína c-Fos únicamente se expresaban en las neuronas que respondían al frío, no se encontraron distintas poblaciones de manera concluyente (Sánchez, et al 2001). De ahí la importancia de la búsqueda sistemática de factores que en las distintas etapas y situaciones fisiológicas, pudieran estar regulando la biosíntesis de la TRH.

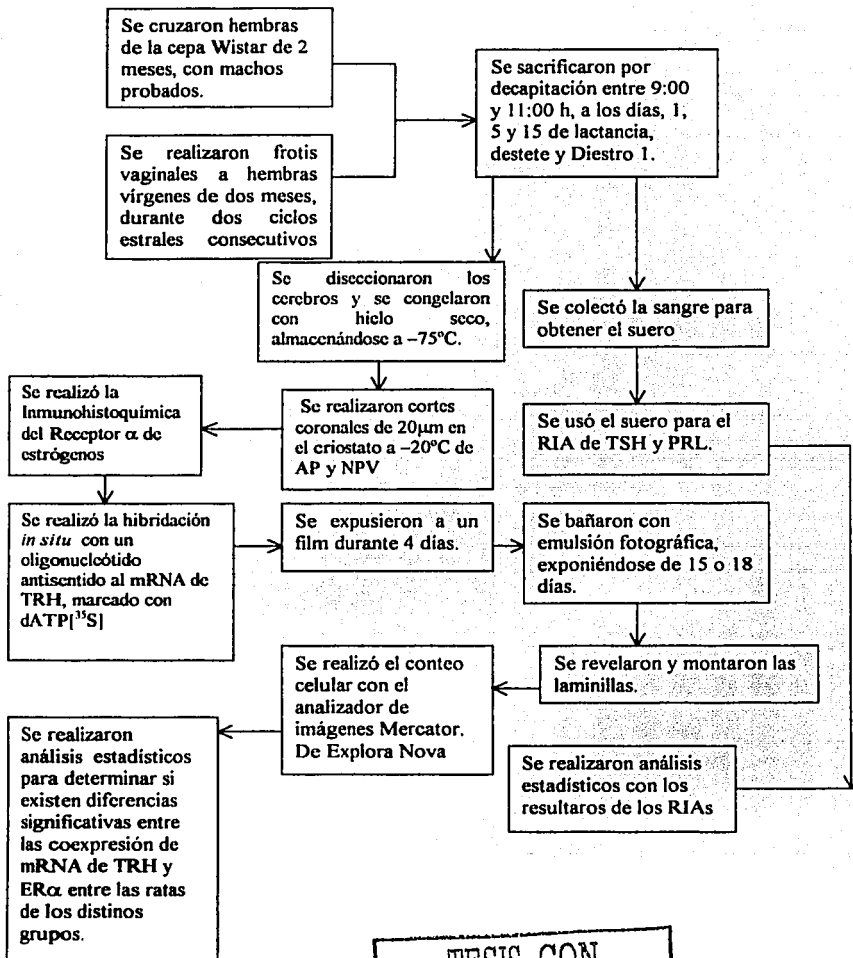
En el trabajo de Lonstein, 1996, se pone de manifiesto que existen en el hipotálamo poblaciones de neuronas que responden a los receptores α de estrógenos, aún durante la lactancia, y por su coexpresión con la proteína c-Fos en el área preóptica, se considera que estas neuronas pueden estar regulando de cierta forma las conductas maternas. Sin embargo, no es claro cual puede ser el fenotipo de estas neuronas, que coinciden en las mismas zonas de las neuronas TRHérgicas preópticas. Aunque frente a este trabajo y la posibilidad de que el metabolismo del TRH tenga algún tipo de regulación por parte de los receptores de estrógenos, se presenta la cuestión de que durante la lactancia existen

bajísimos niveles de estrógenos, ya que la actividad folicular y gonadotrópica es inhibida por la prolactina. Entonces ¿por qué puede haber expresión de receptores en ausencia de ligandos? En especial cuando estos receptores regulan positivamente su propia expresión. La respuesta puede estar en los interesantes descubrimientos que se han llevado a cabo durante la última década, en los que se propone que los receptores esteroideos, pueden ser activados por una amplia cantidad de vías, no sólo por medio de sus ligandos. ¿Es posible que en ausencia de estrógenos circulantes, los receptores de estrógenos puedan modular el metabolismo de la TRH? ¿Es posible que algunas neuronas preópticas que contienen receptores de estrógenos y participan en el establecimiento de la conducta maternal sean TRHérgicas? Una buena forma de aproximarse a esas cuestiones, es determinando si en el área preóptica y el núcleo paraventricular hipotalámico, existe coexpresión del mRNA de TRH y la proteína de el receptor α de estrógenos, durante la lactancia.

Objetivo

El objetivo de este proyecto, consistió en determinar si durante la lactancia, existe coexpresión del receptor alfa de estrógenos y el mRNA mensajero de la hormona liberadora de tiotropina, en el núcleo paraventricular hipotalámico y el área preóptica, para determinar si este receptor puede tener una influencia directa en la biosíntesis del TRH.

Estrategia experimental



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Material y métodos

Para todos los procesos detallados a continuación, se utilizaron guantes de latex estériles libres de talco marca Diamond Grip. Para esterilizar, se utilizó una autoclave marca Arévalo a 120°C y 20psi durante 20 min.

a.- Grupos experimentales

Se utilizaron ratas hembras Wistar de dos meses de edad, manipuladas diariamente, con iluminación de tubos de neón de luz de día, encendidas a las 7:00 AM y apagadas a las 7:00 PM. Se colocaron cuatro ratas por caja de polipropileno, con agua y alimento *Rat Chow* de Purina, *ad libitum*. Las ratas de los grupos de día de parto y lactancia, fueron puestas con machos probados, tres hembras y un macho por caja, durante siete días, después se colocaron nuevamente cuatro ratas por caja durante diecisiete días, y las que estaban claramente preñadas, se colocaron solas en cajas individuales, diez días después del apareamiento, fueron manipuladas diariamente hasta el día del sacrificio. Un día después del trabajo de parto, se ajustó la camada a ocho crías. Las ratas de día uno de lactancia, fueron las del día siguiente al parto, y a partir de ahí, se contaron los cinco días (LV), quince días (LV), al grupo de destete (Dc), se les retiraron las crías a los 20 días, y fueron sacrificadas las madres a los 21 días de iniciada la lactancia (Theodosis y Poulain, 1984; Uribe, et al 1991; Pape y Tramu, 1996; Pi y Grattan 1999; Kornblatt y Grattan, 2001).

Para el grupo de diestro (Di), fueron utilizadas ratas hembras de 2 meses de edad, a las cuales se les realizó durante un mínimo de 10 días, un frotis vaginal diario. Para este fin, se utilizó un asa bacteriológica, puesta al rojo vivo con una lámpara de alcohol, y posteriormente se cubrió con agua destilada. El frotis se realizó raspando suavemente las paredes vaginales, evitando tocar el cuello del útero, para prevenir un scudoembarazo. Las muestras fueron colectadas sobre un portaobjetos, se dejaron secar al aire, y posteriormente fueron teñidas con Hematoxilina de Harris (Hycel, sin ácido acético) durante 4 min, agua destilada durante 4min, eosina durante 1 min. y etanol al 70% durante 2 min (Presnell, 1997). Se observaron los frotis diariamente en un microscopio óptico a 10x, considerando las células nucleadas como referentes del diestro1, la consecutividad de un diestro con otro, se considera diestro2, la combinación de pequeñas células nucleadas y grandes células nucleadas como proestro y únicamente células anucleadas, como determinante de estro. Tras presentar dos ciclos

consecutivos de Diestro1, Diestro2, proestro y estro, fueron sacrificadas al siguiente Diestro1 (Norris, 1997).

Todos los animales fueron sacrificadas entre 9:00 y 11:00 am, por la misma persona que las manipuló. La sangre fue colectada con embudos en tubos falcon de 15ml (Corning) permaneciendo a 4°C hasta su centrifugación. La obtención del suero se realizó por centrifugación durante 20 min a 3000 rpm, a 4°C en la centrifuga Beckman modelo TJ-6, éste se guardó en tubos para microcentrifuga Eppendorf de 1.5 ml. En el caso de quedar algún color rojo en los sueros, fueron nuevamente centrifugados durante 5 min en la misma centrifuga y se congelaron a -20°C. Los cerebros fueron extraídos con equipo de disección estándar, cortando los huesos occipitales por el foramen magno hasta los huesos frontales, quitando las meninges, cortando los bulbos olfatorios, cortando los nervios ópticos y retirados de la cavidad craneal. Los cerebros así preparados, fueron congelados colocándose dorsalmente sobre hielo seco en polvo, hasta su completa congelación. Posteriormente fueron envueltos en parafilm (laboratory film de American National Can.), y después envueltos en un papel aluminio, adecuadamente rotulado. Los cerebros fueron guardados a -70°C en un ultracongelador (Forma Scientific Biofreezer Ult-700), (Sánchez, 2001).

b.- Cortes histológicos

Preparación de laminillas gelatinizadas

Los portaobjetos (Forma Scientific) fueron colocados en rejillas estériles para 50 portaobjetos; estas fueron enjuagadas en agua MilliQ durante 10 minutos, en otra caja Koplín, se enjuagaron con veinte baños de alcohol etílico absoluto (J.T Baker) durante un segundo, se envolvieron en papel aluminio, y se pusieron a secar durante tres horas a 180°C. La gelatina fue preparada utilizando 13 g de gelatina (Sigma, de piel de cisne), 1 g de Sulfato de Cromo y potasio (Sigma) y 2 L de agua MilliQ filtrada y esterilizada. Una vez disuelta la gelatina a 42°C, se agregó el sulfato y se filtró en un filtro de celulosa con baja afinidad protéica con poro de 0.45µm (Millipore). Los portaobjetos se sumergieron durante 15 min en la gelatina en Baño María a 45°C. Se sacaron de la gelatina, suavemente para evitar la formación de burbujas y se escurrieron en servitoallas. Una vez secas, se metieron a la incubadora (Thermolyne 41900) durante toda la noche a 37°C, envueltas en papel aluminio, y se guardaron en cajas hasta su uso.

Cortes en el criostato

Los cerebros, se retiraron de -70°C en hielo seco y se colocaron durante una hora, a -20°C dentro del Criostato OTA (Bright Instrumenta) para equilibrar la temperatura. Entonces los cerebros fueron sacados de sus cubiertas, y se les cortó a la altura del cerebelo, colocándolos en posición vertical sobre una platina, utilizando un medio de montaje (Cryo-M-Bed, Bright Instumets) y se puso a enfriar a -30°C para montar el cerebro sobre la platina. La platina se colocó en posición para realizar los cortes. Se llevan a cabo múltiples cortes de $30\mu\text{m}$ en las áreas más frontales, para rebajar y orientar el tejido y llegar a las zonas de interés. Se monitorea constantemente el progreso de los cortes tiñendo y observando al microscopio cortes de prueba, para constatar la orientación de la muestra y la calidad de los cortes.

Se colectaron alrededor de 40 cortes de $20\mu\text{m}$ de área preóptica, colocándose dos secciones en cada portaobjeto gelatinizado, se adhirieron con calor y posteriormente se congelaron a -70°C . Los cortes se realizaron a partir de la unión de las comisuras anteriores, de Bregma -0.26 mm, hasta -1.0 mm e interaural de 8.74 mm hasta 8.1 mm (Fig8). Después de doscientas micras, o 0.2 mm aproximadamente, se comenzaron a colectar del principio al final de Núcleo Paraventricular hipotalámico, que va de -1.30 mm a -2.12 mm de Bregma, y de 7.70 hasta 6.88 mm interaural (Paxinos, 1986).

Figura 8 A)



B)

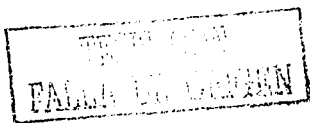
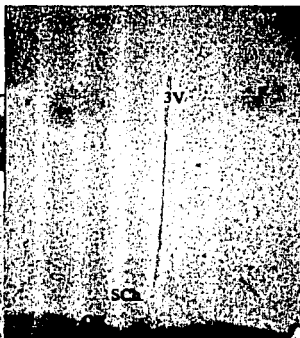


Figura 8. A) Primer corte de área preóptica, se nota que las comisuras (CA) ya se han juntado, aparece claramente el tercer ventrículo (3V) y junto al tercer ventrículo se aprecian los núcleos periventriculares preópticos (PePO) (Objetivo de 1.25x) teñido con hematoxilina-eosina. B) Este es el último corte de área preóptica, abajo se aprecia el quiasma óptico(OX) sobre este los núcleos supraquiasmáticos(SCh) arriba se puede ver la formación de los fornix(F) y verticalmente se aprecia el tercer ventrículo.

Figura 9

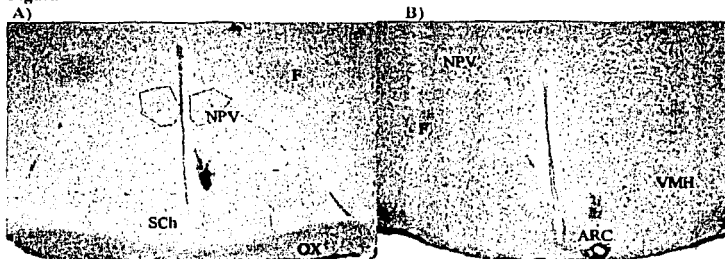


Figura 9. A) Primer corte del núcleo Paraventricular. En el corte se aprecian las primeras células magnocelulares, de la parte anterior del núcleo paraventricular (NPV)(objetivo de 1.25x) Teñido con hematoxilina-eosina. B) Último corte del NPV, donde se aprecian las últimas células del núcleo, que se encuentra en la parte superior del 3er ventrículo formando un largo triángulo.

Figura 10

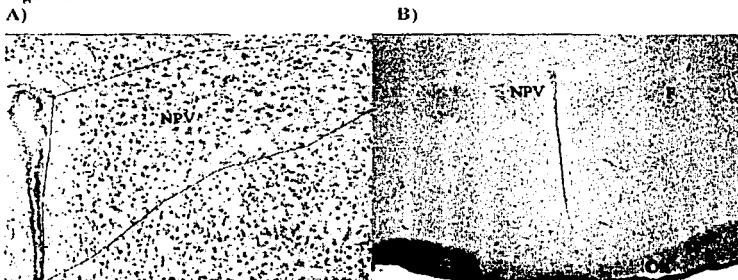


Figura 11. A) Imagen del mismo corte que la figura 9, con el objetivo de 5x, marcando la zona donde se encuentran las últimas células del NPV. Teñido con hematoxilina-eosina. B) Imagen de uno de los últimos cortes del núcleo paraventricular anterior. Donde ya se muestra su alta densidad celular característica (Objetivo de 1.5x). Teñido con hematoxilina-eosina

c.- Inmunohistoquímica del receptor α de estrógenos

Todo el material de vidrio Pyrex y de metal, fue horneado durante toda la noche a 180°C, las cajas Koplin y las barras magnéticas, fueron esterilizados. Para la fijación se preparó paraformaldehído al 4%, para lo cual, en un matraz de Erlenmeyer se calentó agua en agitación hasta llegar a los 60°C, a esa temperatura se agregó paraformaldehído (Sigma), a PBS 1x, una vez disuelto el paraformaldehído, la solución se filtró con un filtro millipore de 0.45µm.

Una vez seleccionadas las laminillas, se colocaron en una rejilla sobre hielo seco para transportarlas, y una vez retiradas del hielo, se secaron utilizando una secadora de pelo a calor y potencia moderados, hasta que estuvieron completamente secas. Una vez secas, se introdujeron en el fijador previamente preparado y puesto dentro de una caja Koplin, donde se dejó durante 10 min a temperatura ambiente. Después se hicieron dos lavados con PBS 1x en agitación continua durante cinco minutos cada uno. Se procedió a la permeabilización, que se llevó a cabo durante 10 min en PBS 1x con 0.2% de Tritón X-100 (Sigma) en agitación continua. Posteriormente, las laminillas fueron colocadas en vasos Koplin en la solución de bloqueo, compuesta por 5% de Albúmina Sérica Bovina grado RIA (Sigma), 0.25% de Heparina (Sigma) en PBS 1x durante 45 min en agitación suave. Una vez terminado el bloqueo, se colocó el anticuerpo primario (ERα MC-20 de Santa Cruz Biotechnology) a 2µg/ml en un buffer compuesto de 2% BSA, 0.25% de Heparina (Sigma) y 0.1% Tritón x-100 en PBS 1x. El anticuerpo se colocó sobre los tejidos, que fueron cubiertos con un parafilm, y puestos en una caja húmeda durante 48 hrs a 4°C. Posteriormente, se dejaron durante 1 hr a temperatura ambiente, el parafilm se retiró por flotación en PBS 1x y se realizaron dos lavados en PBS 1x durante cinco minutos cada uno. Posteriormente, se incubó durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti IgG de conejo biotinilado producido en cabra (Vector) en PBS1x a una concentración de 1:200. Tras dos lavados de PBS 1x se les colocó el Complejo ABC (Vector), preparado media hora antes para que comience a polimerizarse, en PBS 1x a una concentración de 1:50, durante 45 min a temperatura ambiente. Después se realizaron dos lavados en PBS1x y uno en Solución A (100mM TRIS pH 7.6 y 100mM NaCl), después se procedió al revelado, con una solución compuesta de 5mg/ml de Tetrahidrocloruro de 3,3'-Diaminobenzidina (Sigma), 0.03% de H₂O₂ (Sigma) en TRIS.HCl 0.1M, pH 7.6, durante 30 min. La reacción fue monitoreada constantemente en el microscopio para definir la mejor relación señal/ruido. La reacción se detuvo con TRIS·HCl 0.1M, pH 7.6, durante breves momentos, y después las laminillas se colocaron en etanol 70% durante 3 min y se dejaron secar al aire. Una vez completamente secas, se guardaron a -70°C envueltas en una bolsa de plástico con sílica gel (Sigma) hasta su procesamiento para hibridación in situ.

d.- Hibridación in situ

Marcaje del oligonucleótido

Con la pipeta Eppendorf de 10 μ l, se colocan en un tubo para microcentrífuga de 500 μ l, los siguientes elementos, 2 picomolas de oligonucleótido previamente desnaturalizado 5 min a 65°C, 3 μ l de buffer para terminal transferasa 5x, 4.5 μ l de CoCl₂ 5mM, 2 μ l de dATP-S³⁵ (1000ci/ μ mol) (20 μ Ci) (NEN), 3 μ l de H₂O MilliQ y 1.5 μ l de terminal transferasa (25U/ml)(Roche). Se mezcla suavemente con el dedo y se coloca durante 30 min a 37°C. La reacción se detiene con 1 μ l de EDTA 0.5M pH 8.0 (Sigma). Se toman 0.5 μ l de la mezcla de reacción para determinar el porcentaje de incorporación, se agregan 25 μ l de solución acarreadora, compuesta de 10mM de EDTA, 0.1% de SDS, 0.5 MG/ml de tRNA de levadura. El porcentaje de incorporación, se determina colocando 5 μ l de esta mezcla sobre 1cm² de papel de intercambio iónico DEAE 81 (Whatman) por cuadruplicado, dos de estos papeles se utilizan para determinar las cpm totales, y dos se lavan cinco veces con una solución 0.5M de Na₂HPO₄ (Baker), posteriormente lavando 1 min con agua MilliQ 5 min y dos minutos con una solución de etanol al 70%, después se dejan secar en la incubadora a 37°C durante 20 minutos. Finalmente, los cuatro papeles se colocaron individualmente en viales y se le adicionaron 5 ml de líquido de centelleo, compuesto de 0.8% de PPO (Aldrich) en Tolueno (Baker). Los viales se colocan en el contador de centelleo (Beckman LS 6000IC), para medir las cpm en los papeles. Considerando los papeles no lavados como el 100%, se determina el porcentaje de incorporación del dATP-S³⁵ al oligonucleótido. Si la incorporación se da por encima del 70% se considera una buena reacción y se procede a la siguiente etapa.

La recuperación del oligonucleótido marcado se realizó por precipitación, para lo cual se le adicionó a la mezcla de reacción 1 μ l de tRNA de levadura (10 mg/ml), 1.5 μ l de acetato de sodio 3M pH 7.0, y 37 μ l de etanol absoluto. Se mezcla suavemente y se coloca por lo menos una hora a -70°C en el ultracongelador. Después se centrifuga durante 30 min a 15,000 rpm a 4°C en la centrifuga Jouan MRI822. Se descarta el sobrenadante y se deja secar la pastilla durante 20 minutos al aire libre. La pastilla se resuspende en 50 μ l de TE que contienen 10mMDTT. Se toman 0.5 μ l por duplicado y se colocan nuevamente en el contador de centelleo, para determinar la actividad específica, antes de

proceder a la hibridación, la actividad específica de los oligonucleótidos fue de 6.9×10^8 cpm/ μ g de DNA.

Fijación

Para todo el procedimiento, de fijación y lavado, se utilizaron cajas Koplin y gradillas esterilizadas. Las laminillas se sacaron de -70°C y se secaron con una secadora de pelo con calor y potencia moderada. Inmediatamente se utilizó paraformaldehído-PBS al 4% durante 10min, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1x para remover el fijador, procediendo a la acetilación, en SSC 4x con 0.1M de Trietanolamina (Sigma) y 0.25% de anhídrido acético(Sigma) pH 8.0 durante 10 min, un lavado con SSC 2x durante 3 min y se procede a la deshidratación con los siguientes alcoholes durante 2min cada uno 75%, 80%, 95%, 100%. Se hace una deslipidación con Cloroformo(Baker) durante 5 min y se vuelven a usar los alcoholes de 100% y 95% durante 2min. Posteriormente, se dejan secar al aire y se procede a la hibridación.

Hibridación

La mezcla de hibridación está compuesta de 1 pmol/ml de oligonucleótido marcado, desnaturalizado durante 5 minutos a 65°C , 4xSSC, 50% de Formamida, 10% de Dextran sulfato, 10% de Buffer de fosfatos, 1% de Sarcosil fosfato de sodio, 1x Denhart, DNA de esperma de salmón 0.25mg/ml, tRNA de levadura 0.25mg/ml; 10% de Ditioneitol (DTT) 5M en acetato de sodio 0.001M; y Poli A 0.25mg/ml. Una vez agregados todos los componentes, se mezcla en el vórtex vigorosamente.

La hibridación se lleva a cabo colocando 50 μ l de solución por cada laminilla, cubriéndola con un pedazo adecuado de parafilm. Las laminillas se colocan en una cámara húmeda y se dejan a 37°C durante 12 hrs.

Lavados

Se quita el parafilm por flotación en SSC 1x y se colocan las laminillas nuevamente en las gradillas. Para proseguir con los lavados con las siguiente soluciones precalentadas, se llevan a 45°C en un baño: 1xSSC+50% de formamida, dos lavados durante 30min; 0.1x SSC+ 0.02% SDS cuatro lavados durante 30 minutos. Posteriormente se deshidratan con alcoholes, 75%, 80% y 95% dejándose secar durante varias horas.

Macroautoradiografía

Las laminillas se exponen al film Biomax en un cassette durante 4 días. El film, se revela con luz de seguridad Kodak GBX, colocándola 2 min en el revelador GBX, 1 minuto en agua destilada y 4 min en Fijador GBX nuevamente en agua destilada. Con ayuda de un transiluminador de luz blanca se analiza la señal autoradiográfica, y si la relación señal/ruido es buena, se procede a emulsionar las laminillas.

Microautoradiografía

La emulsión fotográfica (Kodak) se funde en baño María a 45°C en el cuarto oscuro sin luz de seguridad. Cuando la emulsión se ha derretido totalmente, lo cual es revisado con un pequeño agitador y una pequeña luz de seguridad (Amersham), se sumergen las laminillas una por una y se cuelgan para secarse al aire durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, las laminillas se guardaron en cajas negras con desecante, se guardaron a su vez en bolsas oscuras con desecante y se guardaron en un refrigerador a 4°C durante 15 o 18 días, según la intensidad de la señal en el film. Transcurrido este periodo, se procedió al revelado en el cuarto oscuro, las laminillas se sacaron del refrigerador y se mantuvieron 2hrs a TA y se colocaron en gradillas, el revelado se lleva a cabo, introduciendo las laminillas en las siguientes soluciones a 15°C, el revelador Kodak D-19 durante 2 min. Después se pasan a agua bidestilada a durante un minuto, y en fijador GBX durante 4 minutos, otros cuatro minutos con luz de seguridad. Finalmente, se hacen dos lavados con agua de 15 minutos cada uno en agitación y se dejan secar al aire. Para realizar el montaje de las laminillas, se introdujeron en los siguiente alcoholes durante 2min. Etanol 70%, 80%, 95%, 100% y dos veces durante 5 min en Xileno. Se sacaron de los xilenos y evitando que se secan, se agregó una gota de resina de montaje Cytoseal 60 (Stephens Scientifics), y se colocó un cubreobjetos sobre la muestra, dejándola secar al aire, procediendo a su observación y análisis al microscopio (Sánchez, et al1997; Sánchez, et al 2001).

e.- Conteo de células

Se utilizó un microscopio marca Zeiss, modelo Axioskop, con diafragma de pie y de campo, se utilizaron los filtros azul, verde y neutro de pie, así como objetivos de 1.25x, 5x, 10x, 20x y 40x y binocular de 10x. La luz del microscopio se controló con un No-brake (Patriot) y un regulador de corriente (Sola). La platina del microscopio está motorizada con tres ejes y los movimientos regulados por un Joystick y una interfase con la computadora, este sistema completo, se llama MC-2000. El Microscopio tiene una cámara acoplada, Sony CCD, que captura señal dentro de la computadora. La

computadora tiene un procesador Pentium III y una memoria RAM de 220MB. El programa mediante el cual son analizadas las imágenes, es el mercator de la compañía Exploranova. Para el análisis, se traza el área de interés sobre la pantalla, según el atlas de Paxinos, se marcan una cuadrícula que puede variar en sus dimensiones, sobre las áreas a analizar, en general se utilizan rectángulos de 110 x 80 μm . El operador analiza cuadro por cuadro, mientras el usuario va marcando las células. Se pueden seleccionar diferentes categorías, en este caso se utilizaron tres, la cat1 marcó cúmulos de granos que corresponden a las neuronas TRHérgicas, la cat2 marcó los núcleos de color café que corresponden a las células teñidas con el anticuerpo contra el ER α , la cat3, englobó a los núcleos teñidos de color café, que tenían más de veinte granos de plata encima, considerando así, células que coexpresaban mRNA de TRH y ER α . finalmente, en una hoja de cálculo de Microsoft Excel, el programa otorga los resultados finales del conteo, listos para su análisis estadístico. Del área preóptica anterior, se contabilizaron los núcleos periventriculares (PePO), los núcleos anteromediales (AMPO), los núcleos anteroventrales (AVPO) y el área medial preóptica (MPA). 200 μ después en sentido antero posterior, se contabilizaron los siguientes núcleos, medial preóptico (MPO), periventricular preóptico (PePO) y el área preóptica medial (MPA) (Paxinos, 1986).

Figura 11

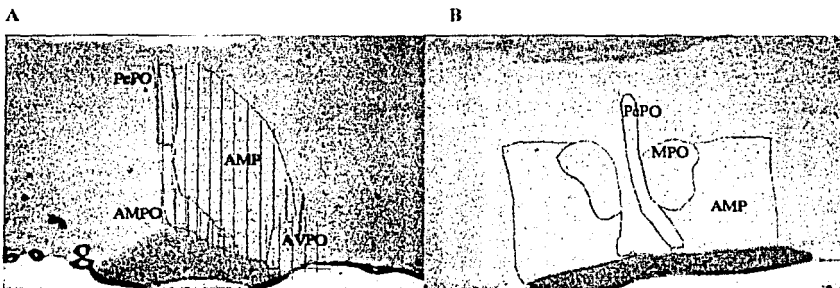


Figura 11. A) Aquí se muestra el área preóptica en uno de sus primeros cortes. En el lado derecho del corte se muestra el mapa y su respectiva cuadrícula de conteo, llevada a cabo con el programa mercator, se muestran en el mapa el núcleo periventricular preóptico (PePO) el núcleo anteromedial preóptico (AMPO) el área preóptica medial (MPA) y el núcleo anteroventral preóptico (AVPO). B) Aquí se muestra el área preóptica aproximadamente 200 μm después de su comienzo, mostrando el PePO, el núcleo medial preóptico (MPO) y el MPA.

El núcleo paraventricular, se divide en tres partes, el tercio anterior, el medio y el posterior, de cada uno se traza el mapa y la cuadrícula.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12

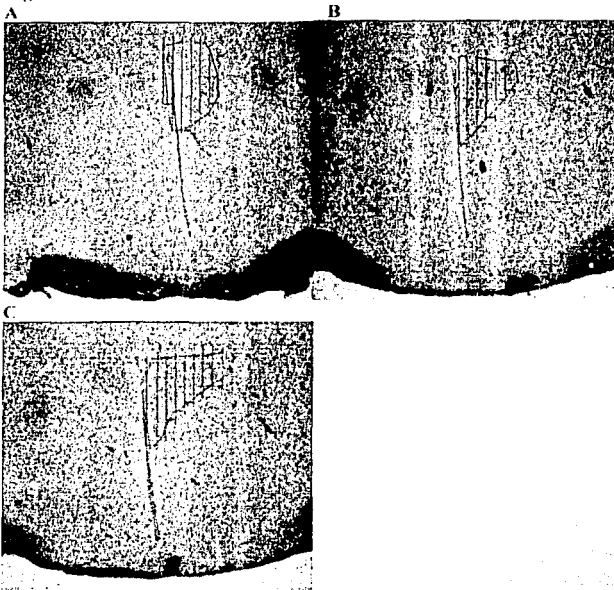


Figura 12. Imágenes del núcleo paraventricular capturadas a diferentes niveles del NPV con su cuadrícula, objetivo de 1.25x A) Anterior, B) Medio, C) Posterior.

f.-Radioinmunoensayos

De las alícuotas de sueros obtenidas, se cuantificaron por RIA los niveles de PRL, y el de TSH, mediante el método estandarizado de NIIDDK (Sánchez, et al 2001).

g.- Pruebas estadísticas

Tanto los resultados de los conteos celulares como las mediciones de los radioinmunoensayos, fueron analizados con el programa StatView para Macintosh. Se utilizó para el análisis una ANOVA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

factorial, y si la probabilidad era menor de 0.05, se procedió a realizar una prueba de comparación múltiple de Scheffé.

Resultados

1. Detección del RNAm de TRH por hibridación *in situ*

La señal del RNAm de TRH en los tejidos previamente cubiertos con emulsión fotográfica, fue observada en un microscopio Axioskop. En campo claro, se apreciaron con el objetivo de 20x los precipitados de plata (puntos negros). Se consideraron células positivas aquellas que presentaron por lo menos veinte granos de plata. En campo oscuro con el objetivo de 10x la señal autoradiográfica se observó como cúmulos de granos brillantes que corresponden a los precipitados de plata. En general la señal fue específica y se delimitó a las zonas donde previamente se había reportado que se expresa el RNAm de TRH. Detectamos señal en los núcleos del área preóptica, la mayor densidad se observó en el núcleo anteroventral preóptico, preóptico medial, preóptico lateral y menor densidad en los núcleos periventricular preóptico y en anteromedial preóptico. En los cortes que contienen el núcleo paraventricular hipotalámico, observamos mayor densidad en la zona parvocelular del núcleo, en estos cortes se observó señal en el núcleo hipotalámico lateral, el reticular talámico, el núcleo periventricular (Figura 17). La señal fue específica, debido a que se observó en proporción similar a lo reportado previamente (Sánchez, et al 1997; Sánchez, et al 2001). Reportes previos de nuestro grupo de trabajo, demostraron la especificidad de la señal utilizando como controles, el desplazamiento de la señal agregando a la mezcla de hibridación 10 veces en exceso de oligonucleótido frío o eliminando la señal con pretratamiento con RNAsas. Además, se utilizó en las hibridaciones *in situ* un oligonucleótido sintetizado al azar, en el cual se mantuvo la proporción de GC y AT que contiene la sonda utilizada para detectar el RNA mensajero para la TRH y no se detectó señal alguna (González, 2001; Sánchez, et al 1997; Sánchez, et al 2001).

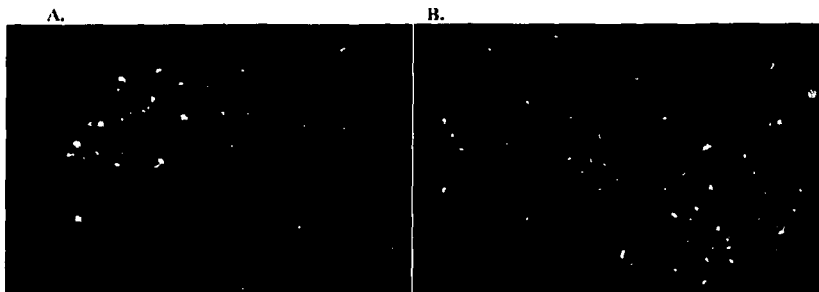


Figura 13. Imagen captada en campo oscuro de la expresión del RNAm de TRH en el núcleo paraventricular hipotalámico(A) y área preóptica (B). La hibridación in situ se realizó en rebanadas de cerebro de rata hembra de 20 μm en diestro 1 hibridadas con una sonda específica contra el RNAm de TRH marcada con $[S^{35}]dATP$. Los cúmulos brillantes corresponden a los precipitados de plata sobre las neuronas positivas al mRNA de TRH.

2. Detección inmunológica del receptor α de estrógenos en el cerebro de la rata.

La presencia de células positivas al receptor α de estrógenos (ER α) se consideró cuando los núcleos se tiñeron de un café oscuro. La distribución observada correspondió a la reportada en la literatura Laflamme, Nappi, et al. (1998). Un gran número de núcleos teñidos con un color café muy intenso fueron observados en los núcleos del área preóptica, principalmente en el PePO, el MPO, el AVPO y la MPA. En el núcleo POL se detectaron niveles bajos de núcleos teñidos con el anticuerpo contra el ER α . En los cortes procesados también logramos observar una gran cantidad de células positivas en la estría basal terminal (BST). En el NPV se observaron núcleos claramente positivos, si bien, de color menos intenso que el obtenido en el área preóptica. La mayoría de las neuronas positivas en el NPV se concentraron en la región periventricular y media del núcleo. Prácticamente no se observaron neuronas positivas en la región magnocelular. Utilizamos dos controles que nos permitió determinar la especificidad de la señal. El primero fue la omisión del anticuerpo primario durante el proceso, esto evitó que se obtuviera señal. La señal positiva también se eliminó al preincubar el anticuerpo primario en una relación de 1:5 con el péptido (sc-542p) inmunógeno con el cual fue obtenido el antisuero (figura no mostrada).

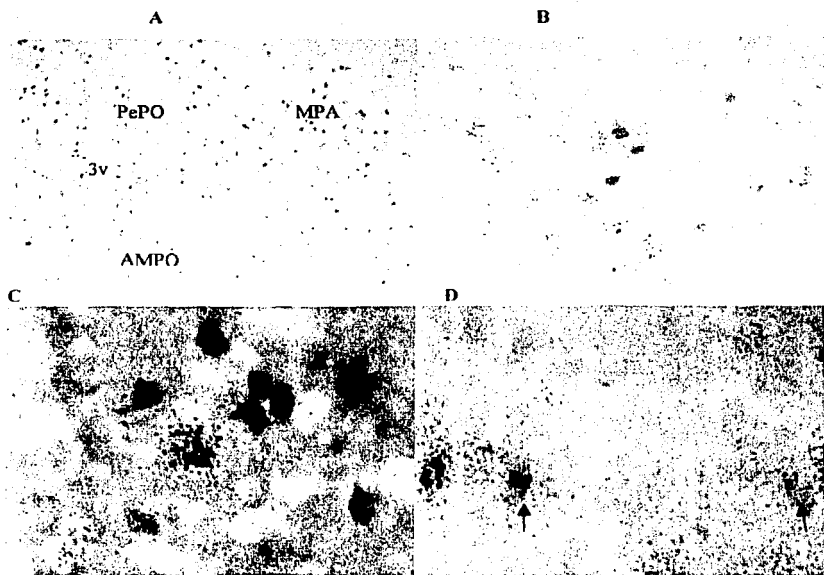


Figura 14. En el panel A se observan células positivas al receptor α de estrógenos en campo claro en los núcleos del área preóptica a 10x. En el panel B, se observan células positivas al receptor α y al mRNA de TRH en campo claro en el núcleo paraventricular a 20x. La señal para el receptor α de estrógenos se reveló al incubar rebanadas de 20 μ m con una dilución de 1:100 del anticuerpo primario, posterior revelado con peroxidasa y diaminobenzidina, generándose un precipitado café sobre los núcleos de las células. El mRNA de TRH se reveló por la exposición y revelado de la emulsión fotográfica con la que se cubrieron las laminillas; esta corresponde a los cúmulos de granos negros. En el panel C, se observa con más detalle un área donde se encuentran varias células positivas a mRNA de TRH y ER α en el núcleo periventricular preóptico. En el panel D, se observan en la zona media de NPV, cúmulos de granos precipitados en el mismo sitio que la DAB, esto muestra células que expresan tanto ER α como mRNA de TRH (40x). PePO: Núcleo periventricular preóptico. MPA: Área preóptica medial. AMPO núcleo anteromedial preóptico. 3v: Tercer ventrículo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Niveles circulantes de prolactina y tirotropina durante la lactancia

En la figura 15A se puede apreciar una tendencia a la alza en el nivel sérico de PRL desde el primer día de lactancia con respecto al grupo de diestro, este aumento se mantiene hasta el día 15 de lactancia. De acuerdo a lo reportado, la PRL en suero disminuye al destete (Uribe, et al 1991).

La tirotropina circulante, que se muestra en la figura 19B, mostró un patrón diferente al de la PRL. Se observaron variaciones no significativas, encontrándose un pico en el día 15 de lactancia con respecto al diestro 1 y lactancia 1 y 5.

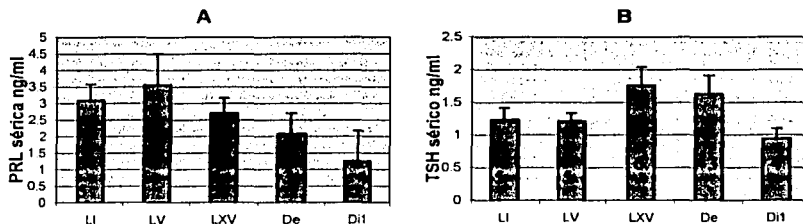


Figura 15. Niveles séricos de PRL (A), y TSH (B) cuantificados mediante radioinmunoensayo durante diferentes días de la lactancia y diestro I.

4. Cuantificación de la coexpresión del RNAm de TRH y el receptor α de estrógenos en el área preóptica durante la lactancia.

Como se muestra en las figuras 16 y 17, el número de neuronas TRHérgicas que expresan a los receptores α de estrógenos fue bajo. El núcleo PePO fue la región del área preóptica en donde se observó únicamente un 1% de coexpresión y fue similar en todas las etapas de lactancia y el diestro. El porcentaje de colocalización fue mayor en el MPA detectándose un pico de colocalización al destete con respecto a los diferentes días. En el núcleo AMPO se observó una fluctuación no significativa entre 2 y 7% de colocalización durante la lactancia y el diestro. No se observaron variaciones significativas en el número de neuronas que expresan el ER α entre los diferentes días de la lactancia y el diestro, en ninguna de las zonas del área preóptica, salvo en el MPA anterior donde observa un incremento significativo de 4 veces entre el día 1 y el día 5 y una disminución significativa entre el día

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5 y el día 15 (fig 17). En cuanto al número de neuronas TRHérgicas en el área preóptica no encontramos variaciones significativas en las diferentes etapas (fig 16 y 17)

5. Colocalización del RNAm de TRH y el ER α en el NPV del hipotálamo.

La colocalización fue muy baja a todo lo largo del NPV y no se observaron variaciones significativas (fig 18). En cuanto al número de neuronas positivas al receptor de estrógenos el número detectado fue muy bajo con respecto a lo observado en el área preóptica. En el NPV anterior, observamos un incremento significativo del 37% en la cantidad de células positivas para mRNA de TRH en el día 5 respecto al día 1 de lactancia. Un decremento en el día 15 respecto al día 5 de lactancia $p < 0.05$, un aumento en el destete respecto al día 15 de lactancia $p < 0.05$. En la zona media del NPV el número de células de TRH se mantuvo similar en las diferentes etapas. En la zona posterior del NPV, observamos una tendencia a la baja en el número de neuronas TRHérgicas, el efecto fue mayor en el día 5 y al destete (49 y 47% respectivamente; $p < 0.05$). Entre el día 5 y el destete observamos un incremento de 32%.

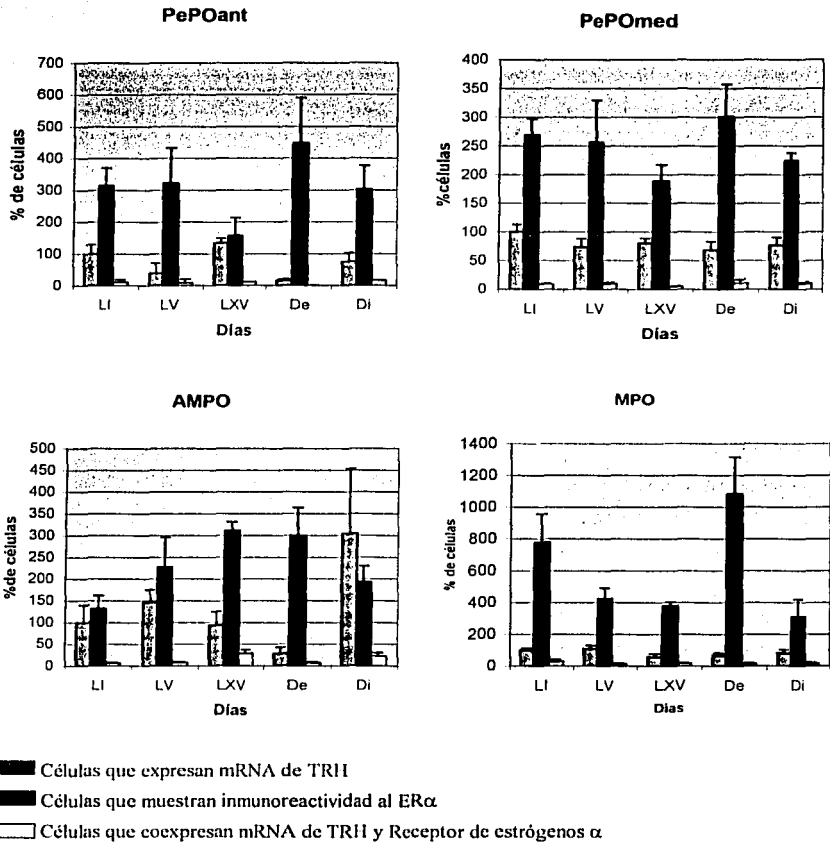


Figura 16. Los histogramas corresponden al porcentaje de células positivas al mRNA de TRH, al receptor α de estrógenos, y a la colocalización durante la lactancia y el diestrus. Se utilizó como 100% al grupo de células TRHérgicas del día 1 de lactancia. El número de animales analizados fue de 6 en el grupo LI y de 3 en el resto. PePO: Núcleo periventricular preóptico anterior y medio. AMPO: Núcleo anteromedial preóptico. MPO: Núcleo medial preóptico.

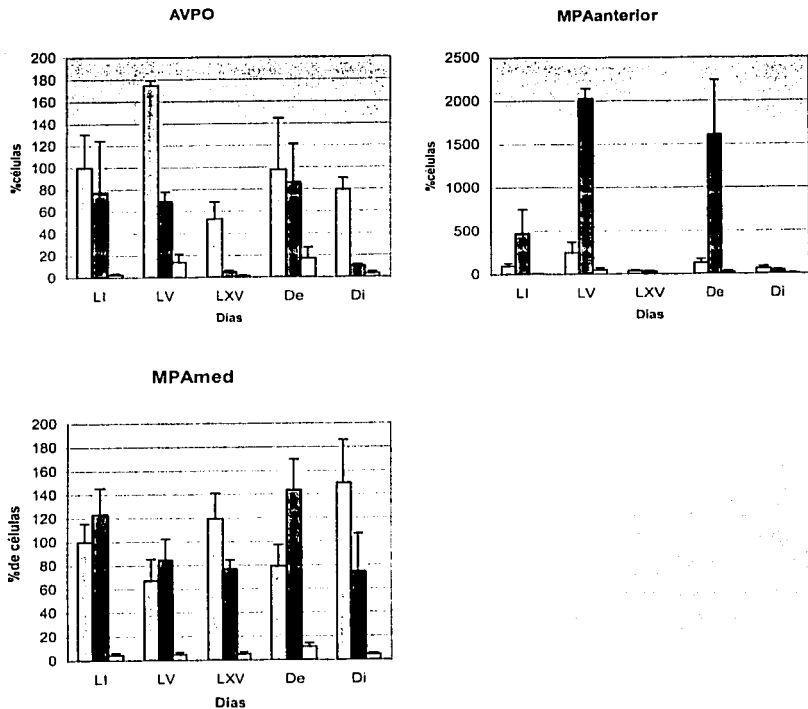


Figura 17. Los histogramas corresponden al porcentaje de células positivas al mRNA de TRH, al receptor Δ de estrógenos, y a ambos durante la lactancia y el destete. Se utilizó como 100% al grupo de células TRHérgicas del día 1 de lactancia. El número de animales analizados fue de 6 en el grupo LI y de 3 en el resto. *: $p < 0.01$ con respecto al grupo LI. $\&$ $p < 0.002$ y $\&\&$ $p < 0.04$ con respecto al grupo LV.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

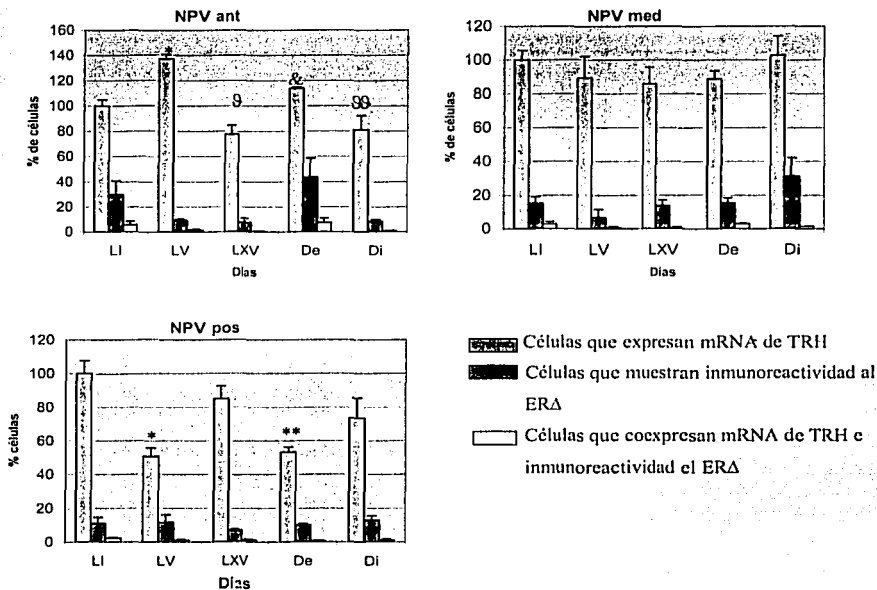


Figura 18. Los histogramas corresponden al promedio \pm error estándar de la media del porcentaje de células positivas al mRNA de TRH, al receptor Δ de estrógenos, y a la colocalización durante la lactancia y el diestrus. Se utilizó como 100% al grupo de células TRHérgicas del día 1 de lactancia. El número de animales analizados fue de 6 en el grupo LI y de 3 en el resto. Diferencias significativas en el NPVant *: $p < 0.01$ con respecto al grupo LI. $\text{\textcircled{9}}$ $p < 0.001$ y $\text{\textcircled{99}}$ $p < 0.008$ con el grupo LV, &: $p < 0.03$ con el grupo LXV y con el grupo De. Diferencias significativas en el NPVpos *: $p < 0.01$ con respecto al grupo LI y **: $p < 0.01$ con respecto al mismo grupo.

Discusión

Durante el proceso de lactancia, la TRH es liberada en la eminencia media y se ha demostrado consistentemente que el péptido se encuentra en los vasos portales hipofisarios. En resultados publicados previos, se ha mostrado que durante la lactancia, existe un incremento constante en los niveles del péptido en la eminencia media. Algo distinto ocurre cuando se mide el mRNA total del núcleo paraventricular hipotalámico en los mismos días, ya que los niveles de mRNA de TRH se mantienen bajos durante prácticamente toda la lactancia, recuperándose hasta el reinicio del ciclo estral, en el caso de la rata (Uribe, et al 1991). Sin embargo, estas mediciones son de todo el NPV, sin considerar sus diferentes áreas y zonas, cuyas neuronas TRHérgicas tienen roles fisiológicos distintos. A la fecha no existe ningún reporte detallado en la literatura, sobre la expresión del mRNA de TRH a lo largo de la lactancia, en las tres diferentes zonas del NPV y las diferentes regiones del mismo.

Lo que podemos inferir de los datos presentados es qué porcentaje de células, expresan niveles significativos del mensajero de TRH a lo largo de la lactancia, de esta forma podemos inferir si hay una mayor cantidad de estímulos que induzcan la transcripción TRHérgica consistente, en las diferentes zonas y si estos pueden estar relacionados con la etapa de la lactancia estudiada. En la zona anterior, existen básicamente poblaciones magnocelulares, las neuronas TRHérgicas emiten aferencias hacia otros núcleos hipotalámicos trascendentes para la lactancia y muy poco hacia la eminencia media (Lechan, et al 1980). En la zona anterior, existen aferencias estimulatorias hacia las neuronas tuberoinfundibulares del núcleo arqueado (ARC), lo que puede estimular el tono inhibitorio sobre la liberación de Prolactina (Freemann, et al 2000). En los resultados no hay una tendencia clara de expresión en este núcleo, aunque se aprecia un aumento significativo en el día 5, que corresponde con un fuerte aumento en la prolactina sérica (Uribe, et al 1991). Respecto al aumento de la expresión TRHérgica en la zona anterior, se puede proponer que en parte, puede manifestar la existencia de un asa de retroalimentación negativa sobre la expresión de PRL hipofisiaria.

En la zona media del paraventricular, tenemos una expresión similar a lo largo de la lactancia, en esta zona observamos también una disminución no significativa de la

expresión a lo largo de la lactancia respecto al diestro, lo que hace pensar que en efecto la expresión TRHérgica de las neuronas que se encuentran en esta área, puede ser mayor durante la parte del ciclo estral contra el que la comparamos. En esta zona, la mayor cantidad de células TRHérgicas, fue encontrada en las divisiones periventriculares y ventrales, que son las divisiones que más se han identificado como hipofisiotrópicas (Lechan et al, 1980). Esto puede significar que existe una continua expresión TRHérgica, en las células que se encuentran directamente implicadas en la liberación de Prolactina.

En la zona posterior del NPV, observamos un decremento significativo de la expresión de mRNA de TRH en el día 5 respecto al día del parto, una recuperación significativa en el día 15, una nueva disminución significativa en el destete y un nuevo repunte significativo en el diestro1. Esta observación es consistente en cierta medida con los datos de mRNA de TRH medidos en todo el NPV, que observan una disminución hacia el día 5 (Uribe, et al 1991), aunque en este caso, los niveles se recuperan en el día15 y vuelven a disminuir en el destete. Podemos proponer que hay una mayor expresión significativa de mRNA de TRH en la zona posterior durante el día del parto, probablemente obedeciendo a los considerables cambios hormonales que se producen en ese día, en los cuales, están claramente involucrados las neuronas hipofisiotrópicas del NPV, especialmente la oxitocina y la vasopresina. Es notable sin embargo, que los niveles de expresión en el diestro1, disminuyan apenas un poco respecto a los días 1 y 15 de lactancia, y que incluso se incrementen respecto al día5, ya que el diestro es un estado fisiológico en el que no se le ha determinado ningún papel específico a la TRH como liberador de Prolactina, aunque no se debe olvidar, que las mediciones de mRNA, no necesariamente deben concordar con las del péptido liberado. De confirmarse las tendencias observadas en este trabajo, parecería que las células TRHérgicas del NPV posterior, experimentan constantes cambios de expresión de mRNA de TRH durante la lactancia, esto podría implicar un rol adaptativo de control del estado fisiológico, o por lo menos, puede mostrar una alta susceptibilidad a este.

En la zona del NPV anterior, observamos el mayor nivel de expresión del receptor α de estrógenos, en el día del parto y en el día del destete, aunque no significativos. Esto podría obedecer a los altos niveles de estrógenos circulantes durante el día del parto, lo que podría indicar la existencia de receptores en esta zona a niveles basales y prácticamente

indetectables en muchas células, que sin embargo pueden responder a los altos contenidos de estrógenos expresando más receptores. En el caso del destete, tras la caída de los niveles de prolactina, esta puede dejar de inhibir la actividad GnRHérgica en el hipotálamo y la actividad folicular en los ovarios, y propicia un aumento de los estrógenos circulantes respecto a la lactancia (Tucker, 1988). También en los núcleos preópticos observados, vemos este patrón de mayor expresión de receptores el día del parto y en el destete, con niveles bajos en la lactancia y en el diestro, característicos por sus bajos niveles de estrógenos. En las zonas media y posterior del núcleo paraventricular, no observamos cambios notorios en la expresión de receptores de estrógenos durante la lactancia y el diestro, en todos los grupos se mantienen niveles muy bajos, respecto a lo observado en el NPV anterior y en los núcleos preópticos.

En ninguno de los núcleos estudiados, tanto paraventricular como preópticos, encontramos niveles importantes de colocalización del fenotipo TRHérgico, con la expresión de receptores α de estrógenos, en la mayoría de los núcleos se alcanzan valores alrededor del 1% de coexpresión, por lo que podemos aventurar que los estrógenos a través de este receptor, no tienen una influencia directa sobre el metabolismo de la TRH en ninguna de las zonas estudiadas. Eso reduce en gran medida, las posibilidades de que los estrógenos estén teniendo un papel en la regulación de la TRH cuando menos durante la lactancia, ya que se ha observado un incremento de las cantidades de mRNA de TRH mediante hibridación *in situ*, en ratas ovariectomizadas restituidas con estrógenos (Zacarias et al, 1998) aunque queda abierta la posibilidad de que ésta se de, a través de la expresión del receptor β . Aunque la expresión del receptor β es ampliamente distribuida como la del α en el hipotálamo y zonas circundantes, incluso mayor en el NPV (Laflamme, et al 1988), los niveles de proteína del receptor β detectados en el hipotálamo mediante western blot, son muy menores a los del α , lo que invita a pensar que tiene menor influencia en la regulación estrogénica del hipotálamo. Otra posibilidad, es que neuronas receptoras a los estrógenos, tengan aferencias importantes sobre las neuronas TRHérgicas, y los estrógenos, puedan provocar en esas neuronas presinápticas, mayor frecuencia de potenciales de acción o mayor cantidad de neurotransmisores o neuromoduladores, se ha considerado por ejemplo, una importante influencia de péptidos opioides que durante la lactancia responden a la prolactina y en ovariectomía a los estrógenos, aumentando su expresión como la

propiomelanocortina (POMC), o disminuyéndola como el neuropéptido Y (Pape y Tramu, 1996).

Otro núcleo con importantes aferencias sobre el paraventricular, es el núcleo arqueado, que presenta gran cantidad de receptores de estrógenos, que han sido colocalizados tanto con el fenotipo dopaminérgico, como con el opiodérgico (Soaje y De Dinasso, 2002). Sabemos que existen aferencias opiodérgicas sobre el núcleo paraventricular y que los péptidos opioides de este núcleo se ven aumentados por los estrógenos en el día del parto, por lo que posiblemente exista una influencia de los estrógenos por medio de estas vías durante cuando menos el principio de la lactancia. De demostrarse que estas vías pueden ser influenciadas por la activación de los receptores de estrógenos y tienen una incidencia importante sobre la expresión de la TRH, entonces la activación ligando independiente de los receptores de estrógenos, podría ser importante para la regulación indirecta del metabolismo de la TRH durante la lactancia.

Tanto reportes antiguos como nuevos, sugieren que en el área preóptica, los receptores α de estrógenos pueden ser marcadores importantes de la participación de esas células en conductas maternas (Lonstein, et al 2000), de hecho en el área preóptica medial, observamos cambios muy importantes en la expresión del ER α , entre el día 5 y el 15, que pueden estar relacionados con algún cambio conductual. Sin embargo, la interpretación de lo que ocurre en esta zona, no deja de ser una tarea compleja, dado su gran tamaño y heterogeneidad. Lo observado en los núcleos preópticos, sugiere que las neuronas que expresan receptores de estrógenos que pueden estar implicadas en la conducta materna, no son TRHérgicas. Sin embargo, si consideramos el área preóptica, especialmente el núcleo y la zona medial, como una intrincada red neural, no se puede descartar la posibilidad de que las neuronas TRHérgicas tengan un rol en las conductas maternas, ya que tienen un nivel importante de expresión en esta zona. Sobre la importancia que pueda tener la TRH en los circuitos neurales del comportamiento maternal, es necesario recabar mucha información, en el contexto de experimentos específicos que recaben tanto material fisiológico y molecular, como conductual. Los resultados de este trabajo sólo muestran la existencia de células TRHérgicas expresadas durante la lactancia en núcleos considerados importantes para la conducta maternal y la coexistencia con

neuronas que presentan inmunoreactividad, para el importante regulador de conducta maternal que es el ER α .

Perspectivas

- Tras estos experimentos, se abren varias incógnitas de interés. Quedan muchas investigaciones por delante, que permitan mostrar poco a poco cual puede ser la relevancia fisiológica de la TRH en el área preóptica durante la lactancia, aunque se cuenta con muy poca información a este respecto. Es un hecho que existe una fuerte expresión, pero no parece tener relación con la conducta materna aunque de cualquier manera es una cuestión de la que no se han reportado experimentos específicos hasta este momento, y en mi opinión valdría la pena realizarlos.
- En la misma área preóptica, hoy sabemos que a lo largo del desarrollo, se da el desarrollo específico de ciertos circuitos en los núcleos mediales, que tienen un papel fundamental en el desarrollo de la conducta materna. Ya que encontramos una fuerte expresión de TRH en esta área durante la lactancia, valdría la pena hacer un estudio detallado sobre estas neuronas en su contexto social, en su morfología y en su situación electrofisiológica, que pudieran mostrar, si las neuronas TRHérgicas preópticas, participan en los circuitos del comportamiento materno, aunque no estén expresando receptores de estrógenos.
- Estos mismos experimentos podrían realizarse para el núcleo paraventricular hipotalámico, en donde todavía no se ha descrito si existen cambios morfológicos y estructurales en las neuronas TRHérgicas durante la lactancia, aunque ya se conocen estos datos de las neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas. En el núcleo paraventricular hipotalámico, no se sabe si hay cambios en la estructura de los circuitos durante la lactancia, el entendimiento de los circuitos TRHérgicos del NPV y su relación precisa con las estructuras sobre las cuales pueden ser aferentes, se podría abordar el problema que se da con la paradójica disminución de los niveles de mRNA de TRH durante la lactancia, y la subida en las concentraciones del péptido en la eminencia media durante el proceso.
- Respecto a la situación que se abre sobre los receptores de estrógenos, queda claro que si durante la lactancia tienen un papel, este puede ser mediado de forma ligando independiente, sin embargo, la forma en que esta activación puede darse en cada

tejido, requiere investigaciones muy específicas a este respecto. Mediante metodologías moleculares *in vivo*, sería importante verificar si los receptores de estrógenos en el área preóptica y el núcleo paraventricular, están siendo activados en algún momento, y están modulando las células que los contienen.

- Aunque el área de investigación sobre la acción directa de los estrógenos sobre las neuronas TRHérgicas parezca cada vez tener menos perspectivas, por lo menos respecto al receptor α , no es descartable algún mecanismo de acción, que sea indirecto pero sea importante en la modulación de la biosíntesis del TRH. La estrategia para esto es continuar buscando las vías aferentes que involucran directamente a las neuronas TRHérgicas, y contemplar si en sus núcleos o glándulas de origen en el caso de ser hormonas, hay una regulación directa de los estrógenos.
- Finalmente, dentro del estudio de los receptores que pueden modular el TRH, muchas vías de investigación quedan abiertas y se plantean como muy interesantes. En el propio contexto de la lactancia, quedan por averiguar por ejemplo los receptores de prolactina, de oxitocina, y de vasopresina, lo cual también puede ayudar a entender las relaciones parácrinas que se dan en el núcleo paraventricular en el periodo de lactancia, y por supuesto de los receptores opioidérgicos, recordando lo que pasa en el núcleo arqueado, que por esa vía los estrógenos parecen modular las neuronas TIDA.

Conclusión

- No encontramos ninguna región donde la colocalización de mRNA de TRH y receptores α de estrógenos, fuera importante para inferir que los estrógenos pudieran modular la biosíntesis de TRH en forma directa.

Bibliografía referida

1. Akil H., 1999, *Neuroendocrine System I: Overview-Thyroid and Adrenal Axes*, pp 1127-1150, de *Fundamental Neuroscience de Zigmond et al*, Academic Press, N.Y. USA.
2. Amenomori Y.C. Chen CL, Meites J,1970, *Serum Prolactin levels in rats during different reproductive states*, *Endocrinology*, 86:506-510.
3. Apfelbaum M.E.,1998, *Role of vasoactive intestinal peptide and 5-HT2 receptor subtype in serotonin stimulation of basal and thyrotropin-releasing-hormone-induced prolactin release in vitro from rat pituitary cells*, *Neuroendocrinology*, 67:45-50.
4. Arbogast L.A., Voogt JL,1996, *The Responsiveness of Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons to Prolactin Feedback Is Diminished between Early Lactation and Midlactation in the Rat*, *Endocrinology*, 137:47-54.
5. Aronica S.M. Katzenellenbogen B.S, 1993, *Stimulation of Estrogen Receptor-mediated Transcription and Alteration in the Phosphorylation State of the Rat Uterine Estrogen Receptor By Estrogen, Cyclic Adenosine Monophosphate, and Insulin-Like growth Factor-I*, *Molecular Endocrinology*, 7, 6:743-752.
6. Ben-Jonathan N, Hnasko R., 2001, *Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor*, *Endocrinology Reviews*, 22:724-63.
7. Bines J.A., Hart, I.C., 1982, *Metabolic limits to milk production, especially roles of growth hormone and insuli*, *Journal Dairy Scientific*, 65:1375-1389.
8. Blake, C.A, 1974, *Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrus rats*, *Endocrinology*, 94:503-508.
9. Bloch B., 1993, *Biotynilated probes for in situ hibridization histochemistry: use for mRNA detection*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*,41, 1751-1754.
10. Bishop N., Kalra PS, Fawcett CP, Krulich L, McCann SM, 1972, *Acute and chronic effects of hypothalamic lesions on the release of FSH, LH and prolactin in intact and castrated rats*, *Endocrinology* 91:1404-1411.
11. Bringes R.S., 1984, *A cuantitative Analysis of the roles of dosage, secuencia, and duration of Estradiol and Progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat*. *Endocrinology* 114:930-940.

12. Boenisch T.,2001, *Antibodies*, Handbook of Immunohistochemistry, edited By Dako.
13. Bringes R.S, 1985, *Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats*. Science, 227:782-784.
14. Brownstein M.J, 1982, *Thyrotropin releasing hormone in the median eminence is in processes of paraventricular nucleolus neurons*, Neuropeptides, 2:197-201.
15. Burbach J.P.H, Peter J.,2002, *Regulation of gene promoters of hypothalamic peptides*, Frontiers in Neuroendocrinology, 23:342-369.
16. Cardona-Gómez G.P., DonCarlos L. and Garcia-Segura L.M., 2000, *Insulin-like, growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain*, Neuroscience, 99, 4:751-760.
17. Carlton S.,2002, *Immunofluorescent Techniques*, Theory and Practice of Histological techniques, edited By Bancroft and Gamble, Ed. Churchill Livingstone, 5thedition, USA:579-593.
18. Cenni B., Picard D.,1999, *Ligand-independent Activation of Steroid Receptors: New Roles for old players*, Trends in endocrinology and Metabolism,10,2:41-46.
19. Chen H., Lin R.J., Xie W., Wilpitz D., Evans R.M., 1999, *Regulation of hormone-induced Histone Hyperacetylation and gene Activation via Acetylation of an Acetylase*, Cell, 98:675-686.
20. Choi Y.,Hartzell D., Azain M.J.,Baile C.A.,2002, *TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats*, Physiology and Behavior, 77:1-4.
21. Clark T., 1983, *Gene Regulation by Steroid Hormones II*:61-79, Springer-Verlag, New York, USA, Editor Roy A.K.
22. Close F.T., Freeman M.E., 1997, *Effects of Ovarian Steroid Hormones on Dopamine-Controlled Prolactin Secretory Responses in vitro*, Neuroendocrinology, 65:430-435.
23. Cuellar A.C, 1993, *Immunohistochemistry*, Handbook Series, Methodes in the Neurosciences. Ed Wiley, Cap 9:289.
24. Day T.A., Ferguson A.V., Renaud L.P.,1985, *Noradrenergic afferents facilitate the activity of tuberoinfundibular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus*. Neuroendocrinology. 1985;41(1):17-22.
25. De Greef, Voogt J.L., Visser T.J., Lamberts S.W., van der Schoot P., 1987, *Control of prolactin release induced by suckling*, Endocrinology, 121:316-322.

26. Donaghue C., Westley B.R., May F.E.B., *Selective Promoter Usage of the Human Estrogen Receptor- α Gene and Its Regulation by Estrogen*, *Molecular Endocrinology*, 13:1934-1950.
27. El-Tanani M.K.K., Green D., 1997, *Two separate mechanisms for ligand-independent Activation of the Estrogen Receptor*, *Molecular Endocrinology*, 11:7:928-937.
28. Escriva H., Safi R., Hänni C., Langlois M., Saumitou-Laprade P., Stehelin D., Capron A., Pierce R., Laudet V., 1997, *Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 94:6803-6808.
29. Evans R.M., 1998, *The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily*, *Science*, 240:889-895.
30. Fekete C., Mihaly E., Luo L.G., Kelly J., Clausen J.T., Mao Q., Rand W.M., Moss L.G., Kuhar M., Emerson C.H., Jackson I.M., Lechan R.M., 2000, *Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting*, *Journal of Neuroscience*, 20(24):9224-34.
31. Fink G., Koch Y., Ben Aroya N., 1982, *Release of thyrotropin releasing hormone into hypophyseal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion*, *Brain Research*, 243:186-189.
32. Fomina A.F., Levitan E.S., 1995, *Three phases of TRH-induced facilitation of exocytosis by single lactotrophs*, *J. Neuroscience*, 15:4982-4991.
33. Fremann E.M., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G., 2000, *Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion*, *Physiological Reviews*, 80:1523-1631.
34. Fujimoto N., Katzenellenbogen B.S., 1994, *Alteration in the agonist/antagonist balance of antiestrogens by activation of protein kinase A signaling pathways in breast cancer cells: antiestrogen selectivity and promoter dependence*, *Molecular Endocrinology*, 8:296-304.
35. González J.A., 2001, *Expresión del mRNA que codifica al receptor de neurotrofinas TrkB en el NPV de rata durante el desarrollo y su relación con la expresión del mRNA de la TRH*. Tesis de Maestría, Cuernavaca, Instituto de Biotecnología, dirección de Jean Louis Charli.
36. González-Mariscal G., 2001, *Neuroendocrinology of Maternal Behavior in the Rabbit*, *Hormones and Behavior*, 40:125-132.

37. Grosvenor C.E., Mena F.,1982, *Regulating mechanisms for oxytocin and Prolactin secretion during lactation*, Neuroendocrine perspectives,1:69-110. Elsevier, Amsterdam.
38. Guillemin R. 1965, *A proposal for a reference standard preparation for the hypothalamic thyrotrophic hormone releasing factor*, Nature 207:297-299.
39. Haisendeder, D.J., Ortolano G.A., Dalkin A.C., Yasin M., Marshall J.C., 1992, *Differential actions of Thyrotropin releasing hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro*, Endocrinology, 130:2917-2923.
40. Happerfield L.C.,1993, *Peroxidase labelling immunocytochemistry: a comparison of eleven commercially available avidin-biotin systems*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 14:291-302.
41. Harris M., Aschenkasi C., Elias C.F., Chandrankunnel A., Nillni E.A., Bjørback C.,Elmqvist J.K, Flier J.S., Hollenberg A.N, 2001, *Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling*, Journal of Clinical Investigation, 2001, 107(1):111-20.
42. Hart L.L., Davie J.R, 2002, *The estrogen receptor: more than the average transcription factor*, Biochemical cell biology, 80:335-341.
43. Henderson Z., 1996, *A survey of the in situ hybridization technique*, In situ hybridization techniques for the brain, ed by Z. Henderson, John Wiley and Sons, New York:2-24.
44. Heuer H.,Schäfer H.,O'Donnell D.,Walker P.,Bauer K., 2000, *Expression of Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor 2(TRH-R2) in the Central Nervous System of Rats*, The Journal of Comparative Neurology 428:319-336.
45. Hinkle PM. Tashjian A.H.,1973, *Receptors for thyrotropin-releasing hormone in prolactin producing rat pituitary cells in culture*, Journal of Biological Chemistry, 248:6180-6186.
46. Hori T., Yamasaki M., Asami T., Koga H. Kiyohara T.,1988, *Responses of anterior hypothalamic-preoptic thermosensitive neurons to thyrotropin releasing hormone and cyclo(His-Pro)*. Neuropharmacology, 27(9):895-901.
47. Hunt S.P, 1986, *Radioimmunochemistry*, Immunocytochemistry, modern methods and Applications 2nd Edn. Polak, J.M& Van Noorden, S. Bristol:99-114.
48. Hsieh K-P., Martin T.F.,1992, *Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors, activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate binding proteins G_q and G₁₁*, Molecular Endocrinology, 6:1673-1681.

49. Jarry H., Heuer H; Schomburg L; Bauer K, 2000, *Prolactin-Releasing Peptides Do Not Stimulate Prolactin Release in vivo*, *Neuroendocrinology*, 71:262-267.
50. Johnston C.A., Negro-Vilar A., 1988, *Role of Oxytocin on prolactin secretion during proestrus and in different physiological or pharmacological paradigms*, *Endocrinology*, 122:341-350.
51. Kato S., Endoh H., Masuhiro Y., Kitamoto T., Uchiyama S., Sasaki H., Masushige S., Gotoh Y., Nishida E., Kawashima H., Metzger D., Chambon P., 1996, *Activation of the Estrogen Receptor Through Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein Kinase*, *Science*, 270:1491-1494.
52. Keyser-Marcus L., Stafisso-Sandoz G., Gerecke K., Jasnow A., Nightingale L., Lambert K., Gatewood J., Kinsley C.H., 2001, *Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat*, *Brain Research Bulletin*, 55,6:737-745.
53. Kitamura T., Nakanishi K., Watanabe S., Endo Y., Fujita S., 1987, *GFA-protein gene expression on the astroglia in cow and rat brains*, *Brain Research*, 423(1-2):189-95.
54. Kornblatt J.J., Grattan D.R.; 2001, *Lactation Alters γ -Aminobutyric Acid Neuronal Activity in the Hypothalamus and Cerebral Cortex in the Rat*, *Neuroendocrinology*, 73:175-184.
55. Kruijver F.P.M., Swaab D.F., 2002, *Sex Hormone Receptors Are Present in the Human Suprachiasmatic Nucleus*, *Neuroendocrinology*, 75:296-305.
56. Kushner J.P., Agard D.A., Greene G.L., Scanlan T.S., Shiau A.K., Uht R.M. Webb P., 2000, *Estrogen receptor pathways to AP-1*, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74:311-317.
57. Laflamme, N., Nappi R.E., Drolet G., Labric C, Rivest S., 1998, *Expression and Neuropeptidergic Characterization of Estrogen Receptors (ER α and ER β) throughout the Rat Brain: Anatomical Evidence of Distinct Roles of Each Subtype*, *Journal of Neurobiology*, 36:357-378.
58. Lee Y.J., *Characterization and expression of the gene-encoding rat thyrotropin-releasing hormone (TRH)*, *Annals of the New York Academy of Science*. 1989;553:14-28.
59. Leckman J.F., Herman A.E., 2002, *Maternal behavior and developmental psychopathology*, *Biological Psychiatry* 2002,1;51(1):27-43.

60. Lechan RM, Nestler JL, Jacobson S, Reichlin S., 1980, *The hypothalamic 'tuberoinfundibular' system of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase (HRP)microiontophoresis*, Brain Research, 195:13-27.
61. Lechan R.M., Jackson I.M.,1982, *Immunohistochemical Localization of Thyrotropin-Releasing Hormone in the Rat Hypothalamus and Pituitary*, Endocrinology,111,1:55.
62. Lechan R.M., Molitch M.E, Jackson I.M., 1983, *Distribution of immunoreactive human growth hormone-like material and thyrotropin-releasing hormone in the rat central nervous system: evidence for their coexistence in the same neurons*. Endocrinology, 112(3):877-84.
63. Lechan R.M.,1986, *Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain*, Science. 1986 10;231(4734):159-61.
64. Leung B.S., Jack. M., Reiney,C.G., 1976, *Estrogen receptor in mammary glands and uterus of rats during pregnancy and lactation*, Journal of Steroid Biochemistry, 7:89-95.
65. Li X., Schwartz P.E, Rissman E.F., 1997, *Distribution of Estrogen Receptor- β -like immunoreactivity in Rat Forebrain*, Neuroendocrinology, 66:63-67.
66. Lonstein, J.S, Greco B; De Vries G.J., Stern J.M. ,Blaustein J.D., 2000, *Maternal Behavior Stimulates c-fos Activity within Estrogen Receptor Alpha-Containing Neurons in Lactating Rats*, Neuroendocrinology, 72:91-101.
67. Luo L.G., Wang S., Su E., Jackson I. M. D., 1999, *Evidence from studies with N-ethyl-meileimide and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate that AP-1 and CREB are involved in the glucocorticoid activation of TRH gene expression in hypothalamic cultures*, Brain Research, 841:189-192.
68. Mani, S., 1994, *Convergent Pathways for Steroid Hormone- and Neurotransmitter-Induced Rat Sexual Behavior*, Science,265:1246-1248.
69. Mani, S., Blaustein J.D., O'malley B.W.,1997, *Progesterone Receptor Funtion from a Behavioral Perspective*, Hormones and Behavior,31:244-255.
70. Mani, S., 2001, *Ligand-Independent Activation of progestin Receptores in Sexual Receptivity*, Hormones and Behavior, 40:183-190.
71. Mann PE, Bridges RS., 2001, *Lactogenic hormone regulation of maternal behavior*, Progressive Brain Research. 2001;133:251-62.
72. Mansour, A., Burke S., Meng F., Thompson R.C., Akil H., Watson S.J.,1994, *Mu, delta and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: and in situ hibridization study*, Journal of Comparative Neurology, 350, 412-438.

73. Mephan T.B, *Physiology of Lactation*, Open university Press, 1987
74. Metcalf G., Jackson I.V.(editors), 1989, *Thyrotropin-Releasing Hormone: Biomedical Significance*, Annals of the New York Academy of Sciences, Vol 553.
75. McEwen B.S, Alves S.E, 1999, *Estrogen actions in the central nervous System*, *Endocrine Reviews*,20(3):279-307.
76. McKenna N.J., O'Malley B.W., 2002, *Combinatorial Control of gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators*, *Cell*,108:465-474.
77. Miller K.D, 1999, *Modern methods in immunocytochemistry: getting them to work*, Royal college of Pathologists CPD bulletin-Cell. Pathol.
78. Mills E.S., Topper Y.J., 1970, *Some ultrastructural effects of insulin, hydrocortisone and prolactin on mammary gland explants*. *Journal of Cell Chemistry.*, 44:310-328.
79. Numan M.,1988, *Maternal Behavior*, Ch.43, pp 1569-1546, *The physiology of Reproduction*, edited by Knobil E. and Neill J, Raven Press, New York.
80. Numan M., Roach J.K., del Cerro M.C., Guillamon A., Segovia S., Sheehan T.P., Numan M.J., 1999, *Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior*, *Brain Research* 830:358-71.
81. Norris D.O, 1997, *The Endocrinology of Mammalian Reproduction, The Endocrinology of Vertebrates*, 3rdEd, Academic Press, San Diego, USA:358-406.
82. Ogawa S., Eng V., Taylor J., Lubahn D.B., Korach K.S., Pfaff D.W.,1998 , *Roles of estrogen receptor- α Gene Expression in Reproduction-Related Behaviors in Female Mice*, *Endocrinology*,139,12:5070-5081.
83. Ohta H., 1985, *Central inhibitory action of TRH on prolactin secretion in the rat*, *Proceedings of the Society of Experimental Biological Medicine*, 1979:9-12.
84. Olazabal DE, Kalinichev M, Morrell JI, Rosenblatt JS, 2002, *MPOA cytotoxic lesions and maternal behavior in the rat: effects of midpubertal lesions on maternal behavior and the role of ovarian hormones in maturation of MPOA control of maternal behavior*. *Hormones and Behavior*, 41(2):126-38
85. Paech K., Webb P.; Kuiper G.G.J.M., Nilsson S., 1997, *Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER α and ER β at AP-1 Sites*, *Science*, Vol. 277:1508-1510.

86. Pape J, Tramu G. 1996, *Suckling-induced Changes in Neuropeptide Y and Proopiomelanocortin Gene Expression in the Arcuate Nucleus of the Rat: Evaluation of a Putative Intervention of Prolactin*, *Neuroendocrinology*, 63:540-549.
87. Paxinos G. 1986, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2^a ed. Academic press, London, UK.
88. Pettersson K., 2001, *Role of Estrogen Receptor Beta in Estrogen Action*, *Annual Review Physiology*, 63:165-192.
89. Pi X.J., Grattan DR. 1999, *Increased Prolactin Receptor Immunoreactivity in the Hypothalamus of Lactating Rats*, *Journal of Neuroendocrinology*, 11:693-705.
90. Pike, C.W., Brozowski A.M.; Hubbard R.R., 2000, *A structural biologist's view of the oestrogen receptor*, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular biology*, 74:261-268.
91. Pin Y. 2000, *Diferential Regulation of Prolactin Release and Lactotrope Proliferation during Pregnancy, Lactation and the Estrous Cycle*, *Neuroendocrinology*, 72:72-79.
92. Polak J.M., McGee J. (Editors), 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford Medical Publications, 1^a Edition, Oxford U.K., 224pp.
93. Power R., Mani S.K., Codina J., Conneely O.M., O'Malley B.W., 1991, *Dopaminergic and Ligand-Independent Activation of Steroid Hormone Receptors*, *Science*, 254:1636-1639.
94. Presnell J, *Animal Tissue Techniques*, 5^a edición, The John Hopkins University Press, Sn. Francisco, USA, 1997.
95. Rinskid P.N., Millard W.J., Martin J.B. 1984, *Evidence that Thyrotropin-releasing hormone is not a major prolactin-releasing factor during suckling in the rat*, *Endocrinology*, 115:312-316.
96. Roseblatt J.S., Hazelwood S. Poole J., 1996, *Maternal Behavior in male rats: Effects of medial preoptic area lesions and presence of maternal aggression*, *Hormones and Behavior*, 30:201-215.
97. Saiardi A. Bozzi Y., Baik J., Borrelli E., 1997, *Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia*, *Neuron* 19:115-126.
98. Sánchez E., Charli JL, Morales C, Corkidi G, Seidah NG, Joseph-Bravo P, Uribe RM. 1997, *Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in*

thyrotropin releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus, Brain Research 761, 77-86.

99. Sánchez E. Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacarias M, Morales-Chapa C, Charli JL, Joseph-Bravo P. 2001, *Differential Responses of Thyrotropin-Releasing hormone (TRH) Neurons to cold exposure or Suckling Indicate Functional Heterogeneity of the TRH System in the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus*, Neuroendocrinology, 74:407-422.
100. Sar M., Meites J., 1969, *Effects of suckling on pituitary release of prolactin, GH and TSH in postpartum lactating rats*, Neuroendocrinology, 4:25-31.
101. Saunders P.T.K., 1997, *Expression of oestrogen receptor beta (ER β) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry*, Journal of Endocrinology, 154, R13-R16.
102. Shang Y., Hu X., DiRenzo J., Lazar M.A., Brown M., 2000, *Cofactor Dynamics and Sufficiency in Estrogen Receptor-Regulated Transcription*, Cell, 103:843-852.
103. Shiao A.K., Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL., 1998, *The Structural basis of estrogen receptor/coactivator Recognition and the Antagonism of this Interaction by Tamoxifen*, Cell, 95:927-937.
104. Shirihari S.K., 1999, *In Situ Hybridation-Theory and Practice*, Molecular Diagnosis, 4,3:169-182.
105. Shughrue P.J., Lane MV, Merchenthaler I., 1997, *Comparative Distribution of Estrogen Receptor- α and β mRNA in the Rat Central Nervous System*, The Journal of Comparative Neurology, 388:507-525.
106. Siegel H.I., Doerr H.K, Rosenblatt J.S., 1978, *Further studies on estrogen induced maternal behavior in hysterectomized-ovariectomized virgin rats*, Hormones and Behavior, 6:223-230.
107. Segerson T.P., Hoefler H., Childers H., Wolfe H.J., Wu P., Jackson I.M., Lechan R.M., 1987, *Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain in situ hybridization*, Endocrinology, 121(1):98-107.
108. Sheehan T., Numan M., 2002, *Estrogen, progesterone, and pregnancy termination alter neural activity in brain regions that control maternal behavior in rats*, Neuroendocrinology, 75(1):12-23.
109. Soaje M., de Di Nasso EG, Deis RP., 2002, *Regulation by endogenous opioids of suckling-induced prolactin secretion in pregnant and lactating rats: role of ovarian steroids*, Journal of Endocrinology, vol. 172, 255-261.

110. Stack, E.C., Balakrishnan R., Numan MJ., Numan M., 2002, *A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior*, Behavioural Brain Research, 131, 17-36.
111. Swanson, E.W., Miller JK., 1973, *Restoration of normal lactation in hypothyroid cows*, Journal Dairy Science., 56: 92-97.
112. Tecott, L.H., 1994, *Methodological considerations in the utilization of in situ hybridization*. In: *In situ hybridization in neurobiology*, ed by Eberwine et al, Oxford University Press, New York, pp.3-23.
113. Theodosios D.T., Poulain D.A., 1984, *Evidence for structural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus in relation to gestation and lactation*, Neuroscience, 11, 1:183-193.
114. Thornton J.W., 2001, *Evolution of Vertebrate steroid receptors from ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions*, Proceedings of National Academy of Sciences USA, vol. 98, may, pp 5671-5676.
115. Tucker, H.A., 1988, *Lactation and Its Hormonal Control*, Ch.56, pp 2235-2264, *The physiology of Reproduction*, edited by E. Knobil and J Neill, Raven Press, New York.
116. Uribe R.M., Joseph-Bravo P., Pasten J., Ponce G., Mendez M., Covarrubias L., Charli J.L., 1991., *Some Events of Thyrotropin-Releasing Hormone Metabolism Are Regulated in Lactating and Cycling Rats*, Neuroendocrinology, 54: 493-498.
117. Uribe R.M. Redondo J.L., Charli J.L., Joseph-Bravo P., 1993, *Suckling and Cold Stress Rapidly and Transiently Increase TRH mRNA in the Paraventricular Nucleus.*, Neuroendocrinology, 58:140-145.
118. Voogt J.L., Lee Y., Yang S., Arbogast L., 2001, *Regulation of prolactin secretion during pregnancy and lactation*, Progress in Brain Research, vol. 133.
119. Weigel N.L. 1996, *Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation*, Biochemical Journal, vol. 319, pp 657-667.
120. Wilber J.F., Xu AH., 1998, *The Thyrotropin-releasing hormone gene 1998: cloning, characterization, and transcriptional regulation in the central nervous system, heart, and testis*. Thyroid, vol. 8, pp 897-901.
121. Wilcox J.N. 1993, *Fundamental principles of in situ hybridization*, Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 41, 1725-1733.
122. Yin P., Arita J., 2000, *Differential Regulation of Prolactin Release and Lactotrope Proliferation during Pregnancy, Lactation and the Estrous Cycle*, Neuroendocrinology, 72:72-79.

123. Yu R., Ashworth R., Hinkle P.M., 1998, *Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotropes and thyrotropes*, *Thyroid* 8:887-894.

Índice de abreviaturas

1. **5-HT_{2A}**- Receptor 2A de serotonina
2. **ABC** - Complejo de avidina biotina (Vector)
3. **ACTH**- Hormona adrenocorticotropica o Corticotropina
4. **AF1**- Función de activación 1
5. **AF2**- Función de activación 2
6. **ARC**- Núcleo arqueado
7. **ARs**- Receptores de andrógenos
8. **BST** - Estria terminal basal
9. **cAMP**- Monofosfato de adenosina cíclico
10. **CDK7**- Cinasa dependiente de ciclina 7
11. **CDK9** - Cinasa dependiente de ciclina 9
12. **cDNA**- Ácido desoxiribonucleico complementario
13. **CREB** - Proteína de unión al sitio responsivo de monofosfato de adenosina cíclico
14. **CRH**- Hormona liberadora de corticotropina
15. **DA**- Dopamina
16. **DAB**- Tetrahidrocloruro de 3'3-Diaminobenzidina
17. **DAG** - Diacil glicerol
18. **E₁**- Estriol
19. **E₂**- 17β-Estradiol
20. **E₃**- Estrona
21. **EGF**- Factor de crecimiento epidermal
22. **ERs**- Receptores de estrógenos
23. **ERα** - Receptor de estrógenos α
24. **ERαKO**- Ratón Knockout de receptor de estrógenos α
25. **ERβ** - Receptor de estrógenos β
26. **FIP** - Factor inhibidor de prolactina
27. **FLP** - Factor liberador de prolactina
28. **GABA**- Ácido γ-aminobutírico
29. **GC** - Glucocorticoides
30. **GnRH**- Hormona liberadora de gonadotropinas
31. **GRs**- Receptores de glucocorticoides
32. **hPL**- Lactógeno placentario humano
33. **Hsp70** - Proteína de choque calórico de 70 daltons
34. **Hsp90** - Proteína de choque calórico de 90 daltons
35. **IGF-1** - Factor de crecimiento tipo insulina I
36. **IgG** - Inmunoglobulina G
37. **Kd** - Constante de disociación
38. **LBD** - Dominio de unión a ligando
39. **LS** - Séptum lateral

- 40. **MAP** - Proteína activada por mitógenos
- 41. **MAPK**- Cinasa de la proteína activada por mitógenos
- 42. **MPA** – Área preóptica medial
- 43. **mRNA**- Ácido ribonucleico mensajero
- 44. **MRs**- Receptores de mineralocorticoides
- 45. **NPV** - Núcleo paraventricular hipotalámico
- 46. **NR-box** – Caja de receptor nuclear
- 47. **OT**- Oxitocina
- 48. **OT-R**- Receptor de Oxitocina
- 49. **P₂**- Progesterona
- 50. **PKA** -Proteína cinasa A
- 51. **PL₁**- Lactógeno placentario 1
- 52. **PL₂**- Lactógeno placentario 2
- 53. **PLC** – Fosfolipasa C
- 54. **PRL**- Prolactina
- 55. **PRL-R**- Receptores de prolactina
- 56. **PRs**- Receptor de progestinas
- 57. **SNC**- Sistema nervioso central
- 58. **TIDA**- Neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas
- 59. **TRH** - Hormona liberadora de tirotropina
- 60. **TRH-R1**- Receptor 1 de TRH
- 61. **TRs** - Receptores tiroideos
- 62. **TSH** - Hormona estimulante de la tiroides o Tirotropina
- 63. **VIP** - Péptido vasointestinal
- 64. **VP** - Vasopresina
- 65. **XR_s**- Receptores del ácido retinóico

Anexo I, Tinciones histológicas

a) Tinción rápida de azul de Toluidina, para verificar la orientación de los cortes.

Para este fin, se recuperaron cortes, colocándolos sobre un portaobjetos, y pegándolos utilizando el calor del dedo. Después, los tejidos son puestos sobre una plancha caliente para deshidratarse completamente y posteriormente se colocan sobre los tejidos, algunas gotas de azul de toluidina al 0.5% en alcohol etílico al 20% (Sigma) son lavados con alcohol etílico al 70% y una vez secos, se observaron al microscopio a 1.25x, 5x y 10x, el azul de toluidina, crea una tinción nuclear brillante morado oscuro, y tinte la materia gris con un violeta claro, contrastando claramente las estructuras cerebrales.

b) Tinción con Hematoxilina Eosina

1. Se sacan las laminillas del ultracongelador con hielo seco,
2. Con calor moderado, se secan con la secadora de pelo hasta que estén completamente secas.
3. Sumergir las laminillas en paraformaldehído-PBS al 4% durante 10 minutos.
4. hacer tres lavados de 2 minutos en PBS.
5. se sumergen 10 veces en etanol 70%
6. se sumergen 10 veces en etanol 80%
7. se dejan en etanol 95% durante 2 minutos.
8. Se dejan en etanol 100% durante 4 minutos.
9. Se dejan en etanol 95% durante 2 minutos.
10. Se dejan en etanol 80% durante 2 minutos.
11. Se dejan e alcohol 70% durante 2 minutos.
12. Se ponen en agua destilada durante 2 minutos.
13. Se ponen en hematoxilina de Harris durante 4 minutos.
14. Se enjuagan en agua destilada, cambiando esta hasta que no esté roja ni morada, entonces se dejan en el agua 4 minutos en agitación.
15. Se sumergen 30 segundos en eosina amarillenta de base acuosa.
16. Se vuelve a repetir el paso 14, hasta que el agua deje de salir rosa y amarilla.
17. se sumergen etanol 70% diez veces
18. Se repite el paso anterior con el etanol 80%
19. Se sumergen 2 minutos en etanol 95%
20. Se sumergen 2 minutos en etanol 100%.
21. Se sumergen en xilenos 5 minutos.
22. Se procede al montaje.

Anexo II, Preparación de soluciones

PBS 10x

40g	NaCl (Baker)
2g	KH ₂ PO ₄
11.44g	Na ₂ HPO ₄
2g	KCl

Se disuelve a temperatura ambiente en un agitador magnético dentro de un vaso de precipitado, se ajusta el pH utilizando un potenciómetro (Beckman selection 2000) hasta alcanzar pH 7.4 agregando pequeñas cantidades de NaOH 4M (Baker), se afora a 1L con una probeta graduada y se filtra con un filtro de celulosa de 0.5 µm (Millipore) en un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío (Millipore). Posteriormente se esteriliza y se guarda a temperatura ambiente.

SSC 20x

175.32g	Cloruro de Sodio
88.23g	Citrato de disódico dihidratado

se ajusta el pH a 7.0 con HCl

TRIS-HCL 1M

Se pesan 6.055g de Trizma base (Sigma), se disuelven en agua MilliQ y se ajusta el pH a 7.6 utilizando la cantidad necesaria de HCl (Merck) concentrado, se afora a 50 ml, se filtra y se esteriliza.

0.5M EDTA pH 8.0

EDTA (Sigma) disódica dihidratada 9.505g

Se agregan poco a poco lentejas de NaOH y cuando empiezan a disolverse se ajusta el pH a 8.0, se afora a 50 ml se filtra y se esteriliza.

100x Denhardts

Ficoll (Sigma)	1 g
Polivinil piroolidona (Sigma)	1g
Albumina sérica bovina grado RIA	1g

Se afora a 50 ml, se filtra y se esteriliza. Se hacen alícuotas pequeñas con tubos para microcentrifuga de 0.5 ml y se guardan a -20°C.

Poli A 10mg/ml

Se disuelve 100mg de Poli A (Sigma) en 10ml de agua filtrada y esterilizada. Se hacen alícuotas pequeñas y se guardan a -20°C.

tRNA de levadura 10mg/ml

Se disuelve todo el contenido del frasco de tRNA (Sigma) en la cantidad necesaria de agua filtrada y esterilizada, se hacen alícuotas pequeñas y se guardan a -20°C

Formamida desionizada

Se mezclan 5 g de resina Bio Rad 501-X8 con 50ml de formamida pura (BRL) y se mantienen con agitación por inversión por 30 min. Se hacen alícuotas de 2ml y se guardan a -20°C .

DNA de espermatozoos de salmón 10mg/ml sonificado

Se prepara la solución de DNA de espermatozoos de salmón (Sigma) con agua y se sonica durante 60 segundos 5 veces, ó hasta que la viscosidad se reduzca ; antes de sonicar, se lava el sonificador con SDS 0.2%, alcohol industrial y finalmente con agua MilliQ. Se preparan alícuotas pequeñas y se guardan a -20°C .

Buffer TE

10mM Tris pH 8.0
1mM EDTA

Amortiguador de fosfatos

NaI_2PO_4 6.9g
 Na_2HPO_4 7.1g

Se preparan 50ml de cada fosfato, después con el potenciómetro se van mezclando (primero se coloca el Fosfato dibásico) hasta alcanzar el pH 7.4, se filtra y esteriliza.

Fe de erratas: En las páginas 63 y 64, deben leerse las siguientes gráficas y pies de figura.

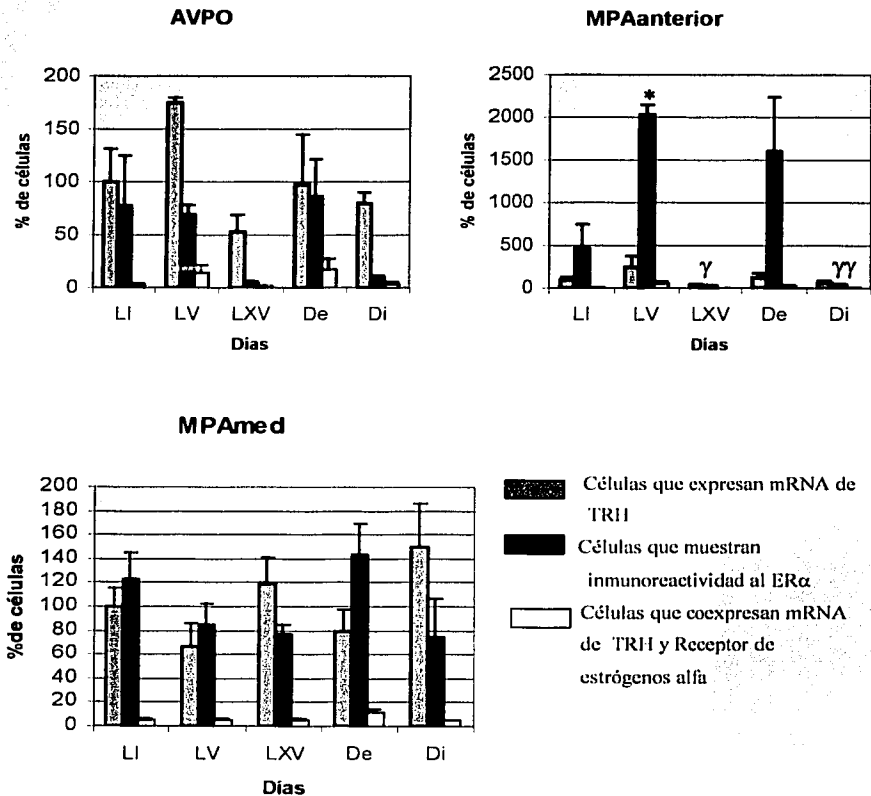
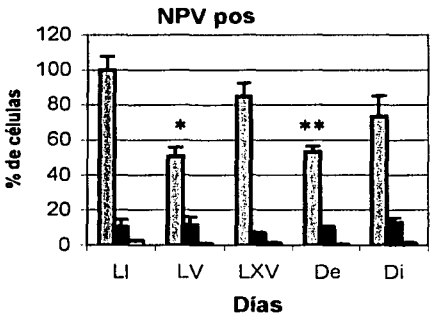
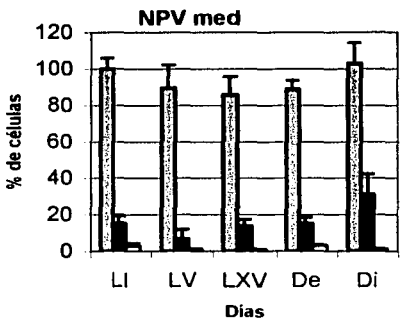
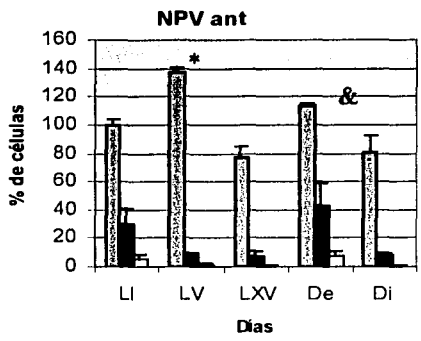


Figura 17. Los histogramas corresponden al promedio \pm error estándar de la media, del porcentaje de células positivas al mRNA de TRH, al receptor α de estrógenos, y a ambos durante la lactancia y el destete. Se utilizó como 100% al grupo de células TRHérgicas del día 1 de lactancia. El número de animales analizados fue de 6 en el grupo LI y de 3 en el resto. *: $p < 0.01$ con respecto al grupo LI. γ : $p < 0.002$ y $\gamma\gamma$: $p < 0.04$ con respecto al grupo LV.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Células que expresan mRNA de TRH

 Células que muestran inmunoreactividad al ERα

 Células que coexpresan mRNA de TRH y receptor de estrógenos alfa

Figura 18. Los histogramas corresponden al promedio \pm error estándar de la media, del porcentaje de células positivas al mRNA de TRH, al receptor α de estrógenos, y a la colocación durante la lactancia y el diestro. Se utilizó como 100% al grupo de células TRHérgicas del día 1 de lactancia. El número de animales analizados fue de 6 en el grupo LI y de 3 en el resto. Diferencias significativas en el NPVant *: $p < 0.01$ con respecto al grupo LI. γ : $p < 0.001$ y $\gamma\gamma$: $p < 0.008$ con el grupo LV, &: $p < 0.03$ con el grupo LXV y con el grupo De. Diferencias significativas en el NPVpos *: $p < 0.01$ con respecto al grupo LI y **: $p < 0.01$ con respecto al mismo grupo.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN