



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH),
SOBRE LA CICLOOXIGENASA 2 (COX-2) EN EL
HIPOCAMPO, EN RATAS EXPUESTAS A ESTRES
OXIDATIVO POR OZONO

T E S I S

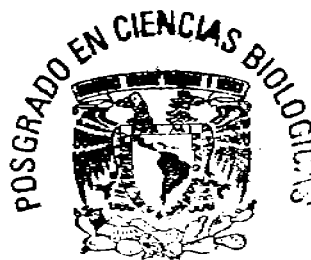
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (EXPERIMENTAL)

PRESENTA

BIOL. ALONSO MARTINEZ CANABAL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA

MEXICO, D. F.



COORDINACIÓN

ENERO, 2006



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.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de septiembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno **MARTÍNEZ CANABAL ALONSO**, con número de cuenta **98534968** con la tesis titulada: "Efecto de la hormona de crecimiento (GH), sobre la Ciclooxigenasa 2 (COX-2) en el hipocampo, en ratas expuestas a estrés oxidativo por ozono", bajo la dirección de la Dra. Selva Rivas Arancibia.

Presidente:	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Vocal:	Dr. Julio Morán Andrade
Secretario:	Dra. Selva Rivas Arancibia
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dra. María Luisa Fanjul Peña

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria D.F., a 10 de enero del 2006



Dr. Juan Nunez Macian
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Apoyos recibidos

Beca de posgrado nacional otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) con el número de becario 182682, entre 2003 y 2005.

PAPIIT (Programa de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica) IX231204 e IN231204 otorgados a Dra. Selva Rivas Arancibia.

Comité tutorial

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Dra. Selva Rivas Arancibia

Agradecimientos

Debo agradecer de manera muy especial, la colaboración del Sr. Gabino Borgonio Pérez por todo su apoyo técnico y logístico a lo largo del desarrollo de esta tesis, cuyo trabajo siempre fue realizado con prontitud y profesionalismo y sobre todo, con mucho entusiasmo y ánimo de apoyo.

Agradezco así mismo el apoyo otorgado por la Maestra Concepción Rugerio, por su apoyo técnico y académico en cuanto a la parte de histología se refiere y por su gran soporte en conocimientos y sabiduría en nuestra área de trabajo. Así como a la Sra. Yolanda Quintana, por su apoyo técnico y logístico en la misma área.

Es también importante mencionar el invaluable apoyo otorgado por mis compañeras de laboratorio, sin cuya ayuda y apoyo, hubiera sido difícil lograr con éxito la realización de esta tesis. Biol. Mariana Angoa Pérez, M.C Ivette Gutiérrez Moreno y M.C Eugenia Campos Barrera.

Y el mayor de mis agradecimientos, es sin duda para mi tutora la Dra. Selva Rivas Arancibia por toda su dedicación y esfuerzo en el desarrollo y éxito de sus proyectos y alumnos, especialmente por todo el apoyo recibido desde 2003 a la fecha, en los ámbitos profesional y personal.

A los miembros de mi comité tutorial

Dra. María Luisa Fanjul Peña, quién me ha dejado un gran legado en cuanto al entendimiento de la fisiología desde una perspectiva biológica, aportando importantes comentarios y sugerencias, pero a su vez mucho apoyo a mi desarrollo académico y personal.

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez de quién fue un honor estar cerca estos años, siempre compartiendo sus conocimientos, siempre dando opiniones ingeniosas y críticas constructivas, dejando también un legado invaluable en mi concepción de la bioquímica desde la perspectiva funcional fisiológica y en cuanto a mi formación científica en general.

En lo personal, guardo un gran agradecimiento con la Dra. Rosa María Uribe, quién años atrás me dejó un invaluable legado, que sin duda me permitió salir adelante en mi desempeño diario en la investigación, tanto en la práctica como en lo teórico. Por supuesto, debo recordar a mis maestros: Dr. Jean Louis Charli, Dr. Roberto Domínguez Casalá, Dra. Sofía Díaz Miranda, Dr. Ruy Pérez Tamayo, Dr Luis Felipe Jiménez, Dr Julio Morán, de quienes he aprendido a lo largo de estos años, mucho más que solo ciencia. También quiero agradecer a mis alumnos de preparatorio y facultad, de quienes a veces se aprende más que de los maestros.

Y por supuesto a mis grandes amigos, Paula, Diego, Gloria Alcocer, Gloria Caballero, Leonora y Maite, así como a Ek, Rodrigo, Sol, Ian, Jimena, Sara, Guillermina, Guadalupe y la abuela Guadalupe. Sin el apoyo de todos ellos y sobre todo con toda la compañía, paciencia y amor de Élika y Talula, esta tesis no hubiera podido ser escrita. Finalmente, debo agradecer a mis Padres Beatriz y Carlos, y a mi abuela Carmen. A ellos tres quiero dedicar esta tesis.

ÍNDICE

Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
Prólogo	7
Los radicales libres en la fisiología	8
Eicosanoides, el papel de la Ciclooxygenasa 2	12
Fisiología de la hormona de crecimiento y su efecto en el SNC	26
Anatomía del hipocampo	30
El hipocampo y la adquisición de la memoria	31
La COX-2 y las enfermedades neurodegenerativas	36
Hipótesis	43
Objetivos generales:	43
Estrategia experimental	44
Grupos experimentales, curva dosis respuesta para determinar dosis	45
Grupos experimentales, experimento crónico	45
Inmunohistoquímica	46
Método de Kluver-Barrera para tefir neuronas selectivamente	47
Cuantificación de lípidos peroxidados	47
Laberinto de Morris	48
Prueba para determinar si la GH tiene efecto antioxidante intrínseco	49
Resultados	50
Curvas dosis respuesta de peroxidación de lípidos	50
El tratamiento con GH modifica la cantidad de lípidos peroxidados en el hipocampo, a los quince días de exposición a 0.25ppm de O ₃	52
Modificaciones en la adquisición de memoria espacial, causadas por la exposición a ozono y el tratamiento con GH	54
Expresión de la COX-2 en el hipocampo, en ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono y expuestas a ozono con tratamiento de GH.	55
Expresión de COX-2 sólo en neuronas?	61
Conteo y observación de neuronas, utilizando la técnica de Kluver-Barrera	62
Inmunohistoquímica de iNOS	65
Prueba para determinar si la molécula de GH, muestra actividad antioxidante en un sistema in vitro	67
Discusión	69
Conclusiones	75
Bibliografía	76
Apéndice I, índice de abreviaturas	88

Resumen

Introducción. La hormona de crecimiento (GH) causa neuroprotección en el envejecimiento y en condiciones patológicas. La administración crónica de ozono en ratas, causa estrés oxidativo y neurodegeneración progresiva en ciertas áreas cerebrales. El estrés oxidativo, induce la sobreexpresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) causando inflamación y daño tisular.

Objetivo. El objetivo general de este trabajo fue determinar el efecto de la GH sobre la expresión de COX-2 y las alteraciones hipocampales, causadas por la exposición a ozono.

Métodos. Setenta ratas macho fueron divididas en los siguientes grupos: 1) control; 2) tres grupos expuestos a ozono (0.25ppm) 4h diariamente 7, 15 y 30 días respectivamente; 3) tres grupos iguales que los anteriores, tratados con GH *s.c.* (0.08U) tras cada exposición a ozono. En todos los grupos se midió la adquisición de memoria espacial, en un laberinto acuático. Después de cada tratamiento 6 ratas fueron sacrificadas y los hipocampos homogenizados para cuantificar los niveles de lipoperóxidos (LPO). Otras 4 ratas fueron perfundidas y sus cerebros utilizados para inmunohistoquímica de COX-2 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), así como para la tinción de Kluver-Barrera. También se incubaron homogenados de hipocampo en un medio oxidante con presencia de GH y ácido ascórbico, en los cuales se cuantificó LPO.

Resultados. La memoria mostró una disminución en los grupos de ozono; el tratamiento con GH causó protección a los 30d. Los niveles de LPO se incrementaron en todos los grupos respecto al control; el grupo tratado con GH 15d, tuvo menos LPO que el de sólo ozono. El número de células positivas a COX-2, se incrementó en cada tratamiento respecto al control; en los grupos con GH, disminuyeron a los 7d y 15d respecto a ozono solo. Se observó también que la inmunoreactividad de iNOS se incrementó en la exposición a ozono, sin efectos de la GH. El conteo de células mostró un decremento a los 15d y a los 30d respecto al control, con un efecto protector en los tratamientos con GH. La cuantificación de LPO en los homogenados de hipocampo, no mostró ningún efecto antioxidante de la GH, lo que si ocurrió con el ácido ascórbico.

Conclusión. El ozono causó daño oxidativo sobre el hipocampo, lo cual pudo ser contrarrestado parcialmente por la administración de GH. Sin embargo, esta protección no es consecuencia de un efecto antioxidante directo.

Abstract

Introduction. Growth Hormone (GH) causes neuroprotection in aging and pathological conditions. The chronic administration of ozone in rats causes oxidative stress and progressive neurodegeneration in some brain areas. Oxidative stress induces overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) producing inflammation and tissular damage.

Objective. The main objective of this work was to determine the effects of GH over the expression of COX-2 and the hippocampus alterations, caused by ozone exposure.

Methods. Seventy male rats were divided in the following groups: 1) control; 2) three groups exposed to ozone (0.25ppm) 4h daily 7, 15 and 30 days respectively; 3) three similar groups, treated with GH *s.c* (0.08U) after each ozone exposure. In all groups spatial memory acquisition was measured in a water maze. After each treatment, 6 rats were sacrificed and the hippocampus homogenized to measure the lipoperoxides (LPO) levels. Other 4 rats were perfused and their brains used for immunohistochemistry of COX-2 and inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), as well as for Kluver-Barrera dye. Also control hippocampus homogenates were incubated in an oxidant medium, with the presence of GH or ascorbic acid, the LPO were measured.

Results. Memory showed a diminution in the ozone groups, GH treatment caused protection at 30d. The levels of LPO increased in all groups respect control; the groups treated with GH 15d, had less LPO than only ozone group. The number of COX-2-positive cells, was increased in each treatment respect the control; in the GH groups the cell number decreased respect the only ozone groups. Also was observed that immunoreactivity to iNOS was incremented with the ozone exposure, without effects of GH. The cell counterering showed a decrease in 15d and 30d respect control group, with a little protective effect of GH. In the incubation prove, quantification of LPO in hippocampus homogenized, did not show any antioxidant effect of the GH, contrary to the ascorbic acid effect.

Conclusion. Ozone caused oxidative damage on the hippocampus, which could be reduced by the administration of GH. However, that protection is not the consequence of a direct antioxidant effect.

Introducción

Prólogo

El hipocampo es una estructura de organización cortical, presente en el cerebro de los vertebrados, que ha sido asociada directamente con memoria espacial, tanto anterógrada como retrógrada. Las poblaciones celulares del hipocampo, muestran fragilidad ante varios factores estresantes externos, como el estrés emocional crónico, la ausencia de hormonas esteroideas sexuales y el estrés oxidativo (Joels y *col.*, 2004). En humanos y animales de edad avanzada, el hipocampo presenta marañas neurofibrilares de sustancias como el péptido β amiloide, el que pueden formarse como consecuencia del estrés oxidativo (Suh y Checker, 2002; Li y *col.*, 2003). Ante la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) acumuladas con la edad, se presenta expresión de citoquinas, que estimulan la activación de la microglía y los astrocitos, lo que promueve un estado reostático inflamatorio, cuyo efecto es particularmente dañino en el hipocampo (Butterfield y *col.*, 2001; Gebicke-Haerter, 2001; Floyd y Hensley, 2002; Hensley y Floyd, 2002). El estado de inflamación en el hipocampo, provoca muerte celular, mediada por la activación de varias vías de señalización. Estas vías incluyen a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la activación de lípidos de membrana como el Inositol-3-fosfato (IP_3), que regulan los niveles de Ca^{++} intracelular (Li y *col.*, 2002). La muerte celular por apoptosis, se lleva a cabo por medio de caspasas, que destruyen de manera controlada el material celular, evitando de esa forma, daño al resto del tejido (Jellinger y Stadelmann, 2000; Gebicke-Haerter, 2001). El estrés oxidativo también puede causar un déficit energético por daño y pérdida de mitocondrias, lo que en ciertos casos desencadena la muerte por necrosis, debido al desbalance osmótico.

Los radicales libres en la fisiología

Los radicales libres, fueron descritos en sistemas vivos hace ya más de cincuenta años, en trabajos clásicos como el de Commoner y Townsed publicado en Nature (1954). Posteriormente, se propuso que los radicales libres de oxígeno, podían ser formados como productos de las reacciones enzimáticas en el metabolismo celular. En ese momento se consideró que las especies reactivas de oxígeno (ROS) podían ser la causa directa de muchos males, entre ellos el cáncer y casi cualquier proceso neurodegenerativo (Harman, 1956). Hacia la década de los sesenta y setenta, los radicales libres se empezaron a considerar como elementos importantes para los sistemas biológicos. Entre otros hallazgos, se descubrió la enzima superóxido dismutasa (SOD) que convierte el radical libre superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (McCord y Fridovich, 1969a, 1969b). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una molécula altamente oxidante no radical que las células fácilmente pueden degradar en agua, mediante enzimas como la catalasa o el sistema de glutatión peroxidasa (GPx) (Mills, 1957; Dringen *y col.*, 2005). Posteriormente muchos científicos se dieron a la tarea de estudiar el daño oxidativo sobre DNA, proteínas, lípidos y otros componentes de la célula (Beckman y Ames, 1998).

Tiempo después, se encontró que además de los daños causados por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, existen mecanismos fisiológicos que requieren de éstas. Por ejemplo, se ha descrito de que un derivado el anión superóxido, el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), estimula la activación de la guanilato ciclasa y la formación del segundo mensajero monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) (Mittal y Murad, 1977). Otro ejemplo, es que el óxido nítrico (NO), es una especie de nitrógeno altamente reactiva e inestable, y se encuentra regulando la contracción del músculo liso endotelial y la agregación plaquetaria (Roth y Droge, 1987). Uno de los descubrimientos más importantes, es que las especies reactivas de oxígeno pueden regular la expresión génica, varios genes bacterianos son inducidos por H_2O_2 (Christman *y col.*, 1985). En el caso de los mamíferos, se encontró que pequeñas cantidades de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 incrementan la producción de la interleucina 2 (IL-2), la cual es un importante factor de crecimiento linfocitario, posiblemente como respuesta a la

activación del factor nuclear κB ($\text{NF}\kappa\text{B}$) la cual se da en presencia de especies reactivas de oxígeno (Schreck y col., 1992).

En los animales las especies reactivas están regulando distintas funciones fisiológicas. Entre éstas se encuentran la regulación del tono vascular, el monitoreo de la presión de oxígeno y la ampliación de la transducción de señales. La transducción de señales mediada por especies reactivas, puede regular la respuesta al propio estrés oxidativo, que mantiene el balance redox dentro de parámetros homeostáticos (Droge, 2002). Por todo esto, la regulación homeostática del balance de óxido reducción, ha tenido una especial importancia, ya que se debe mantener el delicado equilibrio, entre las ventajas adaptativas del uso biológico de los radicales libres y sus efectos dañinos. El término de señales oxidativas, es comúnmente utilizado para describir procesos reguladores en los cuales la señal es derivada del balance redox. Las señales redox, son utilizadas por una amplia gama de organismos, incluyendo bacterias, y su utilización más común, es la inducción de defensas antioxidantes que reestablecen el estado original de homeostasis redox, tras una exposición temporal a ROS (Droge, 2002). Los radicales libres, las ROS y las NRS, se encuentran en células y tejidos en concentraciones bajas pero cuantificables. Sus concentraciones son determinadas mediante el balance entre sus tasas de producción y sus tasas de desactivación por las defensas antioxidantes (Gutteridge y Halliwell, 1989).

El O_2^- se forma por la reducción univalente del oxígeno molecular en estado triplete. Este proceso catalizado por enzimas como las NAD(P)H oxidasas y la xantina oxidasa, también se da espontáneamente por compuestos reactivos como la semiubiquinona, compuesto de la cadena de electrones mitocondrial. Las enzimas SOD convierten los O_2^- en H_2O_2 . En los tejidos, el O_2^- también se transforma en H_2O_2 mediante un proceso que no involucra enzimas. En la presencia de metales de transición reducidos, como el ion ferroso y el ion cuproso, el H_2O_2 puede ser convertido en el altamente reactivo OH^\bullet . Por otra parte, el H_2O_2 puede ser convertido en agua por las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). En la reacción de la GPx, el tripéptido glutatión es oxidado a disulfuro de glutatión, que puede ser convertido de nuevo en glutatión, por la enzima glutatión reductasa, en un proceso dependiente de NADPH (Shull y col., 1991).

El NO \cdot es un radical libre de nitrógeno, que es producido en muchos organismos mediante la oxidación de uno de los átomos de L-arginina, este proceso es catalizado por el grupo de enzimas oxido nítrico sintasas, dentro de las que se encuentran la Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS), la Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) y la Óxido Nítrico Sintasa Neural (nNOS). Las tres enzimas son homólogas y se diferencian por su sitio de expresión. La iNOS es una enzima no constitutiva que puede presentarse en muchos tejidos, entre los que se encuentra el tejido nervioso, en respuesta a señales inflamatorias y a la activación del factor NF κ B (Pagliaro, 2003). Dependiendo del microambiente, el NO \cdot puede ser convertido en otras especies reactivas de nitrógeno como el radical nitrosomio (NO $^+$) el anión nitroxilo (NO $^-$) y el peroxinitrito (ONOO $^-$). Algunos de sus efectos biológicos, pueden ser mediados por la formación intermedia de S-nitroso-cisteína, o el S-nitroso-glutatión. Debido a que el NO es rápidamente convertido por reacciones químicas no enzimáticas (Palmer y col., 1998).

Los ROS causan modificaciones en las proteínas. Estas modificaciones oxidativas pueden llevar a cambios en la estructura y funcionalidad de las proteínas, fragmentación química, o el aumento de la susceptibilidad al ataque proteolítico, que se lleva a cabo especialmente en los proteosomas. Davies y Goldberg (1987) mostraron que la proteólisis se incrementa más de once veces tras la exposición a O $_2^{\cdot-}$ y a H $_2$ O $_2$. Por otro lado, en concentraciones de 20 a 400 μ M de H $_2$ O $_2$, se inhibe la proteólisis y se puede provocar la acumulación intracelular de proteínas oxidadas, esto tiene como implicación directa, la acumulación de las marañas neurofibrilares, usuales en los procesos neurodegenerativos (Stadtman y col., 1992). Los lípidos son moléculas fácilmente oxidadas por el ataque de radicales libres, las más comunmente oxidadas son los lípidos poliinsaturados, ya que los radicales libres los capaces de extraer hidrógenos de los grupos metilos, lo que vuelve inestables a las moléculas y facilita la formación de grupos peroxilos, por lo que las moléculas resultantes se conocen como lípoperóxidos, moléculas que además pueden también actuar como radicales libres (Horton y Fairhurst, 1987).

Las células y tejidos vivos, tienen muchos mecanismos para reestablecer el estatus redox original tras una exposición temporal a estrés oxidativo. Por ejemplo, la producción

de NO[•] es sujeta a la retroalimentación inhibitoria directa de las NOS, mediante el NO[•] (Abu-Soud y *col.*, 1995). Concentraciones de ROS elevadas, inducen en muchas células la expresión de genes cuyos productos exhiben actividad antioxidante, de hecho, se considera que este es uno de los más importantes mecanismos de homeostasis redox. Entre las enzimas antioxidantes que usualmente se expresan por inducción, están la SOD de cobre y zinc (SOD-1), y la SOD de manganeso (SOD-2) en mamíferos, estas enzimas también se encuentran en plantas y levaduras, lo que indica que se trata de una enzimas antiguas y conservadas. También se conocen los cambios en el sistema de glutatión, tanto en el incremento de glutatión en sí mismo, como de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Droge, 2002).

Halliwell y Gutteridge (1989) han definido a los antioxidantes como sustancias que a dosis bajas son capaces de competir con los sustratos oxidables y significativamente contrarrestar o inhibir la oxidación de los sustratos. Esta definición incluye las enzimas SOD, la GPx y la Catalasa, así como compuestos no enzimáticos, como el α -tocoferol, (Vitamina E), el β -caroteno, el ascorbato (Vitamina C) y el glutatión (Droge, 2002). Adicionalmente, hay compuestos que tienen baja actividad antioxidante en bajas concentraciones, pero, al aumentar su concentración, pueden tener un importante efecto antioxidante, entre estos compuestos están ciertos aminoácidos libres, péptidos y proteínas. Prácticamente todos los aminoácidos pueden servir como blancos del ataque oxidativo de las ROS, mientras que algunos, como el triptófano, la tirosina, la histidina y la cisteína, son particularmente sensibles a estas (Davies y Goldberg, 1987).

Eicosanoides, el papel de la Ciclooxygenasa 2.

Las prostaglandinas son una larga familia de lípidos insaturados, que tienen un ciclo de veinte carbonos, con uno o dos oxígenos, y dos cadenas alifáticas laterales con insaturaciones. Junto con los tromboxanos, las prostaglandinas forman la familia, de los prostanoides, éstos a su vez, pertenecen a un largo grupo de lípidos llamados eicosanoides, que tienen en común un esqueleto de 20 carbonos (Narumiya *y col.*, 1999). Las prostaglandinas, cuyo aislamiento fue reportado en 1962 a partir del líquido seminal (Bergstrom y Samuelsson), se derivan de la oxidación del ácido araquidónico, la cual es catalizada por las enzimas ciclooxigenasas. En años recientes, se reportó la existencia de los isoprostanos, que son productos de la oxidación del ácido araquidónico por una vía no enzimática (Morrow *y col.*, 1992a; Morrow *y col.*, 1992b). Las prostaglandinas son moléculas de señalización de vida media corta, que actúan como mensajeros autócrinos y parácrinos. Desde su descubrimiento, se identificaron acciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central (SNC)(Horton, 1964) como son la regulación de la memoria (Zoltay y Cooper, 1994; Chen *y col.*, 2002), el sueño(Yoshida *y col.*, 2003) y la fiebre (Scammell *y col.*, 1998; Schiltz y Sawchenko, 2002); también se considera que están estrechamente relacionadas con la etiología de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la Esclerosis lateral amiotrófica (Minghetti, 2004). El hecho más conocido de las prostaglandinas es que al tratar a un paciente con ácido acetil salicílico (ASA) se bloquea la producción de éstas, lo cual tiene numerosas consecuencias, como el control del dolor y la fiebre. Sin embargo, los detalles biológicos y moleculares de esto eran virtualmente desconocidos hasta el descubrimiento en años recientes de las enzimas ciclooxigenasas, el funcionamiento del ASA se describió hasta 1975 (Roth *y col.*, 1975) y la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) se descubrió hasta 1992 (Hla y Neilson, 1992; O'Banion *y col.*, 1992).

La COX-2 es de carácter constitutivo en bajas cantidades, aunque, frente a una amplia gama de estímulos, incrementa su expresión. La COX-2 se encuentra en el cerebro, el corazón, los ovarios, músculos estriados y otros tejidos. Las enzimas ciclooxigenasas son

oxidoreductasas cuya actividad depende de la presencia de H_2O_2 . Sus sustratos son tres posibles ácidos grasos: el ácido γ homolinoléico del que proceden las prostaglandinas de la serie 1 (p.e PGE_1 , PGH_1), el ácido araquidónico (del que proceden las prostaglandinas de la serie 2 (p.e PGE_2 , PGF_2) y el ácido 5,8,11,14,17-eicosapentanoico, del que derivan las prostaglandinas de la serie 3 (PGE_3 , PGG_3). Aunque de las prostaglandinas de la serie 2, se pueden derivar prostaglandinas de la serie 1, p.e, la prostaglandina PGA_1 se puede derivar de la PGE_2 (Narumiya y col., 1999). Los derivados de la actividad de las ciclooxigenasa, reciben el nombre de prostanoides, que se dividen en dos grupos, las prostaglandinas, que son ácido grasos diinsaturados, compuestos de veinte carbonos, con una cabeza cíclica de cinco carbonos; el segundo grupo es el de los tromboxanos, que tienen características similares, pero su cabeza es de seis átomos, uno de ellos oxígeno. Las prostaglandinas y tromboxanos más abundantes en los mamíferos son las del tipo 2 (p.e TXA_2 , PGE_2) ya que el ácido araquidónico es más abundante en las membranas que los otros dos lípidos. Además, son las prostaglandinas de la serie 2, para las que más roles fisiológicos se han descrito (Narumiya y col., 1999).

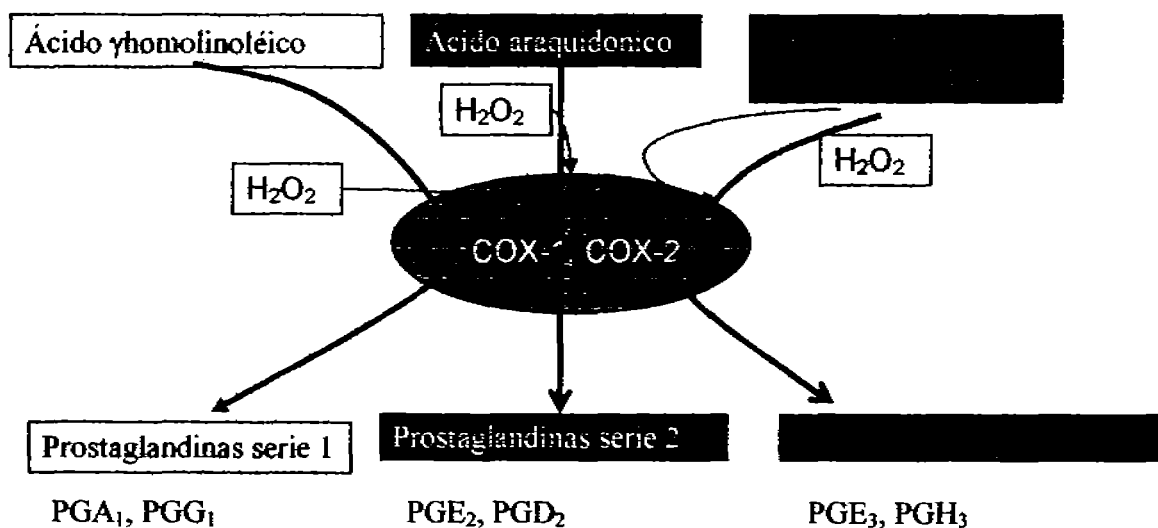


Figura 1, Se muestran las tres principales rutas metabólicas de las prostaglandinas, en donde a partir de tres distintos sustratos, las Ciclooxygenasas sintetizan las tres distintas series de

prostaglandinas, según su origen, la ruta más importante en los mamíferos, es la que parte del ácido araquidónico.

La expresión de la COX-2 es promovida mediante varios mecanismos: puede ser inducida por la interleucina 1 (IL-1) (Lyons-Giordano *et al.*, 1993), el factor de crecimiento de fibroblastos b (bFGF)(Karim *et al.*, 1997), el factor de crecimiento transformante α (TGF α) (Matsuura, 1999) o el factor de crecimiento epidermal también estimula la expresión de COX-2(Perkins y Kniss, 1997). Las ROS también estimulan la producción de COX-2, ya que activan el factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B), la transcripción de la COX-2 también es inducida, cuando el NF κ B es activado por el factor de necrosis tumoral (TNF) y los lipopolisacáridos (LPS)(Kamata y Hirata, 1999). Finalmente, las prostaglandinas también regulan la expresión de la COX-2; se sabe que la PGE₂ induce el influjo de Ca⁺⁺ al interior celular, lo que deriva en la activación de la proteína cinasa C (PKC) que activa al NF κ B (Baldwin, 1996).

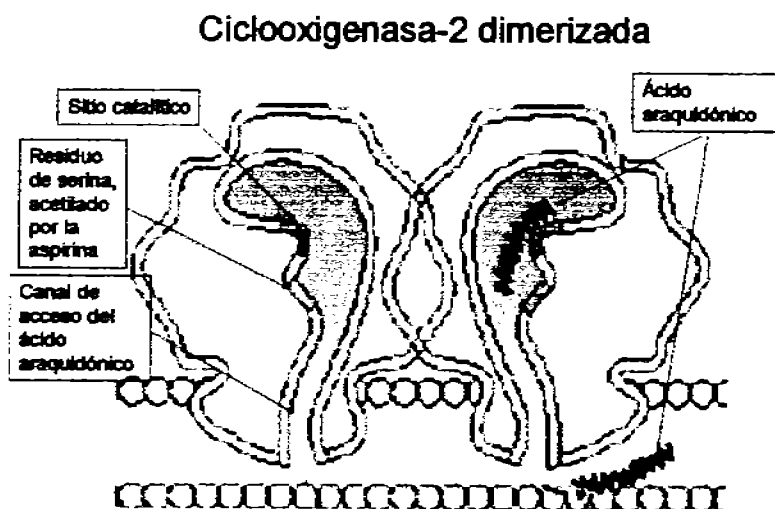


Figura2 La Ciclooxygenasa cuando está activa, se encuentra en homodímeros en la membrana plasmática. Cada subunidad tiene un canal de acceso, por el que puede entrar el ácido araquidónico, mismo que es bloqueado por la acción de los agentes antiinflamatorios no esteroideos como la aspirina, el sitio catalítico se encuentra hasta el fondo de este canal (FitzGerald, 2003).

La transcripción de la COX-2 también puede ser activada o desactivada por proteínas del grupo de transductores de señales y activadores de transcripción (STAT) ya que en el promotor del gen de la COX-2 existe un sitio de unión a estos factores. Los receptores que tienen un sistema de transducción mediado por las proteínas STAT, son los receptores de interleucinas, de prolactina (PRL-R) y de hormona de crecimiento (GH-R) (Zandi *y col.*, 1997).

La COX-2 es una proteína que, tras ser ensamblada y transportada en el retículo endoplásmico, se inserta en la membrana, donde forma homodímeros funcionales. Cada proteína de este complejo, cuenta con un canal de acceso por donde entra el ácido araquidónico. El canal de acceso, conduce los sustratos hacia el sitio catalítico de la enzima, donde se llevan a cabo las peroxidaciones necesarias para la producción de prostaglandinas. El inhibidor más conocido de las COX, es el ácido acetilsalicílico, que acetila un residuo de serina en la superficie del canal de acceso, esto tiene como consecuencia que una zona hidrofóbica se vuelva hidrofílica, lo que impide el paso para los sustratos (Roth *y col.*, 1975; FitzGerald, 2003).

En la primera peroxidación del ácido araquidónico, se crea un ciclo de dos oxígenos entre los carbonos 9 y 11, así como la inserción de un grupo hidroperoxilo en el carbono 15; el resultado de estas reacciones, es la prostaglandina G_2 (PGG_2). Posteriormente, el grupo hidroperoxilo es remplazado con un grupo hidroxilo. Dicha reacción produce la prostaglandina PGH_2 , que es precursor directo de la PGE_2 , la PGF_2 , la PGI_2 y el TXA_2 . Existe un grupo de enzimas sintasas isomerasas, las cuales transforman la PGH_2 en cada uno de sus derivados, la expresión de estas enzimas cambia según el tejido y el estado fisiológico, por esa razón no siempre se presentan los mismos prostanooides. Los prostanooides difunden a través de la membrana celular y se unen a receptores membranales acoplados a proteínas G de gran afinidad (Narumiya *y col.*, 1999).

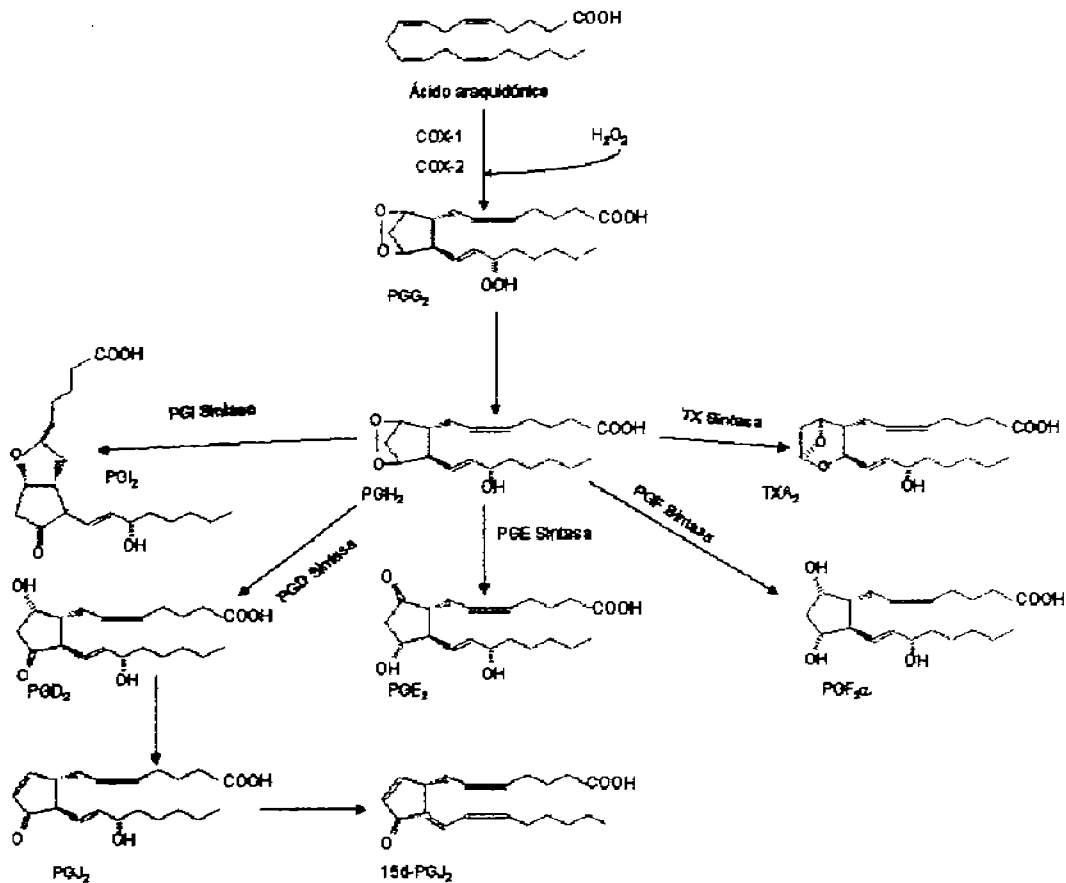


Figura 3 En este esquema se muestra brevemente una parte de la vía metabólica derivada del ácido araquidónico y algunos de sus metabolitos con importancia biológica. En primer lugar, el ácido araquidónico es peroxidado por la COX-1 o la COX-2, luego, forma la PGG₂ que al reducirse forma la PGH₂ que es más estable. A través de su respectiva sintasa, a partir de la PGH₂ se forman la PGI₂, el TXA₂, la PGE₂, la PGD₂. De esta última se derivan la PGJ₂ y la 15d-PGJ₂. (Narumiya y col., 1999).

Se han descrito muchos receptores de prostanoideos, así como muchos subtipos e isoformas, casi todos acoplados a proteínas G. Entre los receptores de prostaglandinas están el receptor de prostaglandinas D (DP)(Jones, 1976), el de prostaglandinas E (EP) con cuatro subtipos, de los cuales el EP₃ tiene cuatro isoformas; El FP, el de prostaglandinas I (IP) y de tromboxanos TP, que cuenta con dos isoformas. Todos los receptores, salvo el EP₁ del que se desconoce su acción, son acoplados a proteínas G de distintos tipos (Negishi y col., 1993). La mayoría de estos receptores, se acoplan a proteínas G del tipo s o del tipo i, que regulan a la

alza o a la baja las concentraciones de cAMP intracelulares, estimulando o inhibiendo la enzima adenilato ciclasa. Existen otros receptores acoplados a proteínas G_q , que activan el sistema de fosfolipasas de la membrana y la liberación de fosfatos de inositol, lo que interviene en la regulación del Ca^{++} intracelular (Narumiya y col., 1993).

Transducción de receptores de prostanoides				
Receptor	Subtipo	Isoforma	Proteína activadora	Segundo mensajero o mecanismo de acción
DP			G_s	cAMP↑
EP	EP ₁		No identificada	Ca^{++} ↑
	EP ₂		G_s	cAMP↑
	EP ₄		G_s	cAMP↑
	EP ₃	EP _{3A}	G_i	cAMP ↓
		EP _{3B}	G_s	cAMP↑
		EP _{3C}	G_s	cAMP↑
		EP _{3D}	G_s, G_i, G_q	cAMP↑, cAMP↓, Respuesta de fosfatidilinositol
FP				Respuesta de fosfatidilinositol
IP			G_s, G_q	cAMP↑
TP		TP α	G_i, G_q	cAMP, Respuesta de fosfatidilinositol
		TP β	G_s, G_q	cAMP↓, Respuesta de fosfatidilinositol
PPAR			Actúa como factor de transcripción	Induce la transcripción de proteínas
TXA ₂ R			G_s	cAMP↑

Tabla 1 Principales características de los receptores de prostanoides, su vía de transducción y su principal acción sobre mensajeros intracelulares. Todos los receptores son acoplados a proteínas G y pueden tener una acción inhibitoria o estimuladora sobre los niveles de cAMP intracelulares, o sobre los niveles de Ca^{++} , mediante las vías de fosfatos de inositol (Narumiya y col., 1999).

La búsqueda de los receptores de prostanoides en las células de los mamíferos, ha encontrado como obstáculos, la baja expresión de estos y la variedad de receptores que coexisten en las mismas poblaciones celulares. La hibridación *in situ* y el *northern blot* han sido, hasta ahora, las herramientas más socorridas para dilucidar la distribución de receptores de prostanoides en los organismos. En efecto, se ha encontrado que cada receptor tiene una distribución específica y que sus niveles de expresión son variables entre los tejidos (Narumiya y col., 1999). El receptor DP, se describe como abundante en las meninges de ratón y humano, y

su activación se ha involucrado en procesos de sueño. Los receptores EP se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos de ratón y el humano, el EP₃ se ha descrito como abundante en el sistema nervioso central. El mRNA del EP₃ se ha encontrado en las neuronas corticales del hipocampo, en los núcleos talámicos, en el hipotálamo, en el cerebro medio y en el tallo cerebral. Al receptor EP₃ se le han descrito varios roles fisiológicos en el metabolismo cerebral, se ha mostrado que se expresa en poblaciones de neuronas monoaminérgicas como las norepinefrinérgicas del *Locus Ceruleus*, las serotoninérgicas de los núcleos del rafe y las dopaminérgicas de la *Substantia Nigra*. Se ha descrito que agonistas del EP₃, pueden despolarizar las membranas proceso que incrementa la conductancia catiónica, coadyuvando así con el desencadenamiento de potenciales de acción. Al receptor EP₃, se le asocia también con el desencadenamiento de la fiebre, mediante su acción en el área preóptica del hipotálamo. Los receptores IP, se encuentran en la raíz del ganglio dorsal, y coexpresan con neuronas de sustancia P, por lo que se espera una conexión entre este receptor y el dolor. Los receptores FP y TP, no se han descrito en el sistema nervioso central, aunque son importantes en los riñones, los ovarios y el sistema inmune (Narumiya y col., 1999). También se conocen receptores de tipo intracelular con actividad de factores nucleares de transcripción; el más conocido, es el receptor activado proliferador de peroxisomas (PPAR). El ligando más común del PPAR es la prostaglandina PGJ₂; cuando el receptor se une con la prostaglandina este se activa, formando heterodímeros con el receptor del ácido retinóico, estos dímeros pueden regular la expresión de varias caspasas (Rudolph y col., 2001; Okano y col., 2003). El receptor de tromboxanos TXA₂R, es también un receptor acoplado a proteínas G, y tiene homología a los receptores de prostaglandinas.

Las prostaglandinas producidas enzimáticamente en el SNC, están íntimamente ligadas a varias funciones fisiológicas, en varios niveles. La prostaglandina más común y estudiada en el SNC, es la PGE₂, la cual es generada en las neuronas al presentarse influjos de Ca⁺⁺ mediante el receptor de NMDA; por lo que se considera que tienen un papel coadyuvante en la adquisición de la memoria. Esto se ha comprobado cuando, al inhibir la producción de prostaglandinas en el hipocampo y la corteza de las ratas, se ve disminuida la adquisición de memoria. A su vez, se conoce un efecto neuroprotector importante de la PGE₂, ya que en cultivos neuronales *in vitro*, en rebanadas de tejido e *in vivo*, la PGE₂ a través de su receptor EP₂, muestra protección hacia la excitotoxicidad mediada por el glutamato y protección en paradigmas de infarto, reduciendo la

zona de penumbra. Este efecto se debe a la síntesis de cAMP, activada por la PGE₂, ya que al inhibir la PKA, no se presenta el efecto protector. Cuando existe un estado infeccioso mediado por virus o bacterias, los macrófagos, producen interleucinas como la 1β, la 6 y el TNF-α (Luheshi y Rothwell, 1996) que influyen sobre las células de la microvasculatura hipotalámica, éstas producen PGE₂, estimulante de las neuronas del núcleo ventromedial preóptico y del núcleo paraventricular hipotalámico. Al activarse dichos núcleos de neuronas, estas activan el eje tiroideo, aumentando así la temperatura corporal (Scammell *y col.*, 1998; Schiltz y Sawchenko, 2002). La fiebre es un estado fisiológico en respuesta al proceso infeccioso, que estimula al sistema inmunológico e inhibe la proliferación de virus y bacterias, sin embargo, por tiempos prolongados puede crear serios daños. Hasta hace poco tiempo, no se conocía cómo es que la fiebre disminuye sin la intervención de antipiréticos, o la completa eliminación de los agentes infecciosos, actualmente se sabe que otra prostaglandina, la 15-Deoxi-Δ^{12,14}-prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) disminuye la temperatura corporal en el estado febril. La 15d-PGJ₂ es un metabolito de la PGD₂, prostaglandina producida por la PGD₂-Sintasa, enzima que se encuentra en el hipotálamo y aumenta su expresión durante la fiebre. En consecuencia, la 15d-PGJ₂ también aumenta su producción y actúa sobre el factor NFκB, inhibiendo su activación, esto disminuye la expresión de interleucinas y prostaglandinas. Esto tiene como consecuencia la disminución de la temperatura corporal y el estado inflamatorio (Mouihate *y col.*, 2004).

La IL-1β y el TNF-α juegan un papel importante en la regulación del sueño, la administración exógena de TNF-α, estimula el sueño no MOR en varias especies incluso los niveles endógenos de estas citoquinas, varían junto con el ciclo sueño-vigilia (Yoshida *y col.*, 2003). Al ser IL-1β y el TNF-α activadores del NFκB, se espera que si se aumentan los niveles de estos, se expresen mayores cantidades de COX-2 en el cerebro. Pero esto no es un hecho colateral, porque la inhibición de la COX-2 atenúa la inducción del sueño estimulado por IL-1β y el TNF-α en ratas y en conejos, por lo que se sugiere un papel central de las prostaglandinas en este mecanismo de inducción del sueño (Yoshida *y col.*, 2003). La principal prostaglandina involucrada en la inducción del sueño es la PGD₂, esta prostaglandina induce sueño cuando es infundida en el espacio subaracnoideo, en la zona correspondiente al telencéfalo rostral basal (Matsumura *y col.*, 1994). También se sabe que la infusión de PGD₂ incrementa

significativamente la expresión de Fos en las leptomeninges y las neuronas dentro del núcleo ventrolateral del área preóptica, sitios que se consideran centros de sueño, así mismo, disminuye la expresión de Fos en los núcleos Tuberomamilares del hipotálamo, considerados como centros de inducción de la vigilia (Scammell *y col.*, 1998). La PGD-S, es mayormente producida en las leptomeninges y plexos coroideos, y es secretada dentro del líquido céfalo raquídeo (LCR), donde se convierte en β -traza, una de las mayores proteínas del LCR (Urade y Hayaishi, 2000). Así mismo, ratones transgénicos que sobreexpresan la PGD-S, muestran excesiva cantidad de sueño no MOR con un incremento considerable de la PGD₂ en el cerebro. Como se había comentado anteriormente, el receptor DP, que aumenta la cantidad de cAMP, se encuentra casi exclusivamente en las células trabeculares del espacio subaracnoideo, y coexpresa con la PGD-S; además, se ha demostrado que el receptor DP regula positivamente la secreción de Adenosina extracelular en esta área (Mizoguchi *y col.*, 2001). Se sabe que el mecanismo de inducción del sueño por PGD₂, es dependiente de los receptores de adenosina A_{2A}, lo que podría explicar por qué la combinación de la cafeína, antagonista de A_{2A}, y la aspirina, inhibidor de COX-2, inhiben el sueño (Sato *y col.*, 1996).

La implicación de las prostaglandinas en los procesos de apoptosis, es controvertida. Por una parte son apoptóticas y por otro lado son antiapoptóticas. Las observaciones indican que esta diferencia varía según las condiciones, la población celular de la que se trate y el tiempo de exposición a la prostaglandina (Rudolph *y col.*, 2001). Por ejemplo, en células cancerígenas de colon, la PGE₂ activa la expresión de Bcl-2, una proteína antiapoptótica que impide la salida del citocromo c de la mitocondria (Sun *y col.*, 2002). En cambio, en los linfocitos T, esta misma prostaglandina no muestra efectos sobre la expresión de Bcl-2, pero sí muestra activación de c-Myc, una proteína proapoptótica, cuya expresión precede a la fragmentación del DNA (Pica *y col.*, 1995; Pica *y col.*, 1996; Rudolph *y col.*, 2001). Al parecer la capacidad apoptótica de la PGE₂ depende de la producción de cAMP que logre y de la acción de otras sustancias de acción parácrina, específicas de cada población celular. La prostaglandina más apoptótica, es la PGJ₂, a través de su receptor PPAR. Se ha descrito que la activación del PPAR promueve la transcripción de caspasas; también se ha observado que la presencia de inhibidores de caspasas, inactiva la apoptosis inducida por PGJ₂ (Rudolph *y col.*, 2001). La PGJ₂, además es muy

reactiva y puede dañar la degradación de proteínas mediante el proteosoma, por esta razón, pueden estar involucradas en la formación de depósitos neurofibrilares (Li y col., 2003).

En las neuronas hipocampales se ha reportado PGE₂, tanto en funciones normales como protectoras (McCullough y col., 2004), así como su participación en procesos neurodegenerativos. Los procesos neurodegenerativos afectan al hipocampo dependiendo de la zona, CA1 es la que se ve más afectada y la más resistente es la capa granular del giro dentado (Ajmone-Cat y col., 2003). En neuronas corticales en cultivo, se ha visto que la sobreexpresión de la COX-2 en estrés oxidativo, provoca la apoptosis mediada por prostaglandinas, especialmente la PGE₂ y PGF_{2α} (Li y col., 2002).

El factor NFκB y su papel en la reacción celular al estrés oxidativo.

El factor NFκB, es un complejo formado por varias proteínas de la misma familia, las llamadas p50, p52, p65 (Rel A), Rel-B y c-Rel, estas proteínas forman heterodímeros, la forma activa del NFκB, es casi siempre un heterodímero de p50 y p65 (Urban *y col.*, 1991; Baldwin, 1996). Sin presencia de estímulos activadores, el heterodímero p65-p50, permanece en el citosol de forma inactiva, la inactivación se da mediante su acoplamiento con la proteína inhibidora de κB (IκB_α) esta proteína es un blanco de fosforilación y su subsiguiente marcaje con ubiquitina permite a la proteína ser reconocida y lisada dentro del proteosoma. (Baldwin, 1996). El NFκB puede ser activado de muchas maneras posibles, mediante citoquinas inflamatorias, mitógenos, rayos ultravioleta y oxidantes; la presencia de todos estos estímulos, desencadena la degradación de la proteína IκB_α. Al ser activado, el heterodímero p50-p65 se transloca al núcleo, donde se acopla a secuencias de DNA consenso (Baldwin, 1996). Una de las características del NFκB, es su sensibilidad a activarse por estrés oxidativo, esto se debe al incremento de la actividad de las enzimas MAP cinasas, que fosforilan la proteína IκB_α, ya que las ROS inactivan las fosfatasa que inactivan estas enzimas. También es conocido que la proteína cinasa C (PKC), activada en respuesta al Ca⁺⁺, fosforila la IκB_α (Droge, 2002), los niveles intracelulares de Ca⁺⁺ se incrementan considerablemente como consecuencia del estrés oxidativo (Denisova *y col.*, 1997).

Una vez que la proteína IκB_α ha sido degradada, es factible que el heterodímero formado por p65 y p50, se trasloque al núcleo y se una a los promotores de sus genes blanco, promoviendo su transcripción (Kim *y col.*, 2000). Son varios los experimentos que explican la separación de la proteína IκB_α del complejo NFκB por medio de señales oxidativas. Se ha encontrado que la elevación en los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y del anión superóxido (O₂⁻), aumentan la traslocación de NFκB al núcleo y que los niveles citosólicos de IκB_α por el contrario decrecen. Lo mismo ocurre en modelos de estrés oxidativo, como el de hipoxia, en donde la ausencia del NADH, imposibilita reducir el glutatión, motivo por el cual, a pesar de la ausencia de oxígeno, los niveles de ROS aumentan sustancialmente (Schmedtje *y col.*, 1997).

La enzima sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), es una enzima que se expresa en respuesta al estrés oxidativo y también como resultado de la activación del NFκB. El óxido nítrico (NO) es producido durante el estrés oxidativo por la inducción de la iNOS, este gas ha sido estudiado como un importante mensajero de acción parácrina, sus roles fisiológicos conocidos, son la regulación de la vasodilatación y la regulación retrógrada de las sinapsis glutamatérgicas en el sistema nervioso central (Pagliaro, 2003). El óxido nítrico tiene un importante papel en la activación del NFκB, al parecer mediando la destrucción de la proteína IκBα como los otros radicales libres. El óxido nítrico, puede interactuar con residuos de cisteína en los grupos tiol, lo que también contribuye a la inactivación de las fosforilasas asociadas a receptores tipo tirosinas cinasas, y a las proteína PKC (Droge, 2002).

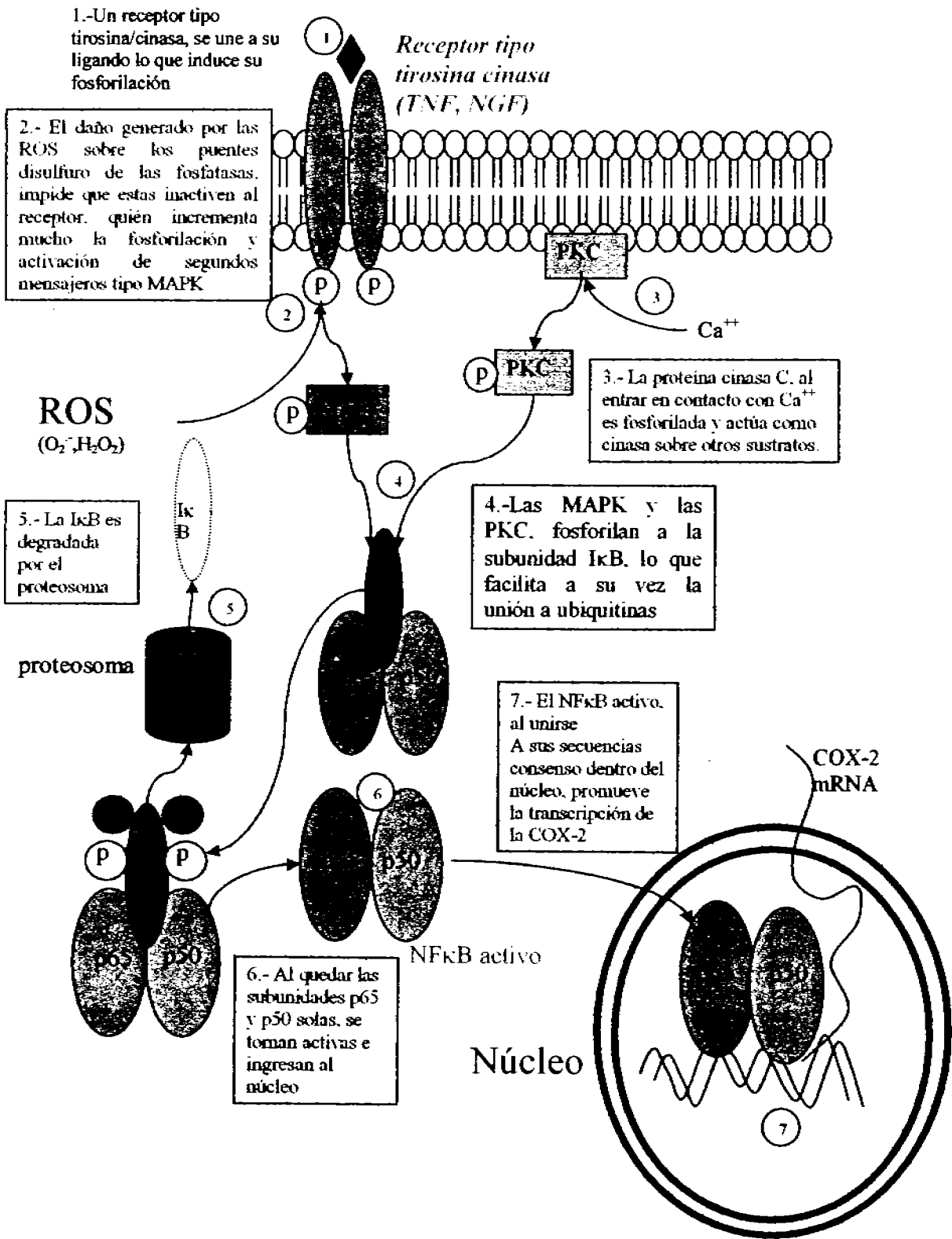


Figura 4 En este esquema, se muestra un mecanismo hipotético, mediante el cual las especies reactivas de oxígeno intracelulares, pueden encontrarse regulando la síntesis de COX-2. Se muestran las vías de MAP cinasas y de PKC, a su vez, la posible regulación directa de los ROS, sobre la activación del NFκB.

Tanto el p50 como el p65, tienen actividad transcripcional, ambas proteínas interactúan con otros factores transcripcionales nucleares, y en esa interacción, reside una de las propiedades fundamentales del NFκB, uno de los blancos de esta actividad es el promotor del gen de la COX-2. En el promotor del gen de la COX-2, existen dos secuencias consenso donde puede actuar el NFκB, la primera, conocida como 5' y la segunda, como 3'. Se ha descrito que la secuencia 5' es más susceptible a activar la transcripción de COX-2 mediante la estimulación por factores de crecimiento, la secuencia 3', es la que se activa en modelos de estrés oxidativo. Pruebas *in vitro* donde se inhiben las proteínas utilizando anticuerpos, han mostrado que la proteína de mayor importancia en la regulación de la COX-2, es p65 (Schmedtje *y col.*, 1997).

Recientemente se ha propuesto que las prostaglandinas pueden estar regulando al NFκB negativamente. Por ejemplo, se ha observado que la prostaglandina PGJ₂, suprime la activación del NFκB, en un mecanismo no dependiente de su receptor (Okano *y col.*, 2003).

Fisiología de la hormona de crecimiento y su efecto en el SNC

Se sabe que la hormona del crecimiento (GH) tiene efectos anabólicos producidos mediante la inducción del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1). La GH propicia el crecimiento óseo, regula la insulina, y promueve la movilización de ácidos grasos a partir del tejido adiposo, distribuyendo, así, la energía disponible de manera eficiente. La GH también tiene efectos neurotróficos, neuroprotectos y probablemente neurogénicos, el efecto neuroprotector se debe a la acción antiapoptótica de IGF-1 (Nyberg, 2000; Frago y *col.*, 2002). El receptor de la GH (GH-R) se ha localizado en varias partes del SNC, se encuentra en los plexos coroideos y en el hipocampo junto con el receptor de IGF-1 (Schneider y *col.*, 2003). EL GH-R, es un receptor que necesita dimerizarse para estar activo y se activa mediante la autofosforilación y la inducción de la fosforilación de proteínas cinasas asociadas, las JAK (Zhu y *col.*, 2001). El GH-R, es un receptor implicado en varias vías de transducción de señales, activa las proteínas de la vía de las MAP cinasas y activa otra familia de proteínas, conocidas como las STAT. Estas proteínas al ser fosforiladas por activación de un receptor, se dimerizan y se traslocan al núcleo, donde funcionan como factores de transcripción, tanto inhibitorios (STAT-5) como activadores (STAT-3) (Zhu y *col.*, 2001). Por otra parte, el promotor del gen de la COX-2, tiene un sitio de respuesta a proteínas STAT, por lo que es posible la regulación de la enzima por la GH. Además, en el ovario se ha encontrado que la GH puede regular la expresión de algunas prostaglandinas, en algunos casos a la alza y, en otros, a la baja, según el momento reproductivo y según la concentración de la hormona (Schmedtje y *col.*, 1997).

La influencia de la GH y el IGF-1 sobre la memoria, ha sido sujeta a debate durante largo tiempo; en el caso del estrés oxidativo dependiente de la edad sobre el cerebro, se ha mostrado que la GH tiene un efecto neuroprotectivo sobre el cerebro (Schneider-Rivas y *col.*, 1995). En humanos, se sabe que el tratamiento con GHRH eleva la adquisición de memoria (Alvarez y Cacabelos, 1990). También en humanos, los niveles de aspartato en el líquido cefalorraquídeo, tienden a subir en personas con deficiencia de GH, tratadas con remplazo hormonal, el aspartato es un ligando del receptor de NMDA, factor importante para la adquisición de la memoria y la atención (Schneider y *col.*, 2003).

Recientemente, estudios realizados en ratones Knock-Out (KO), muestran algunos datos sobre el papel de la hormona de crecimiento en el estrés oxidativo. Los ratones KO de GHR, tienen mayor esperanza de vida que los ratones “silvestres” en condiciones normales, debido a que estos ratones presentan una disminución de la glucosa sanguínea, con la consiguiente disminución de la actividad y generación de radicales libres (Bartke y Brown-Borg, 2004). En cambio, frente a la intoxicación con el paracuato, veneno que genera grandes cantidades de O_2^- , los GHR-KO tienen una disminución de la esperanza de vida. En el envenenamiento con paracuato la cantidad de lípidos peroxidados se eleva en los riñones y en el hígado, también hay una considerable disminución de la expresión de la SOD-1. En el hígado no hay disminución de la SOD-1, pero sí de la catalasa y la GPx (Hauck y col., 2002). Este experimento es de los pocos disponibles que están relacionando la vía de la GH, con el estrés oxidativo y la expresión de enzimas antioxidantes, y es conveniente considerarlo como un antecedente directo para este trabajo.

Modelo teórico de la activación del receptor de GH

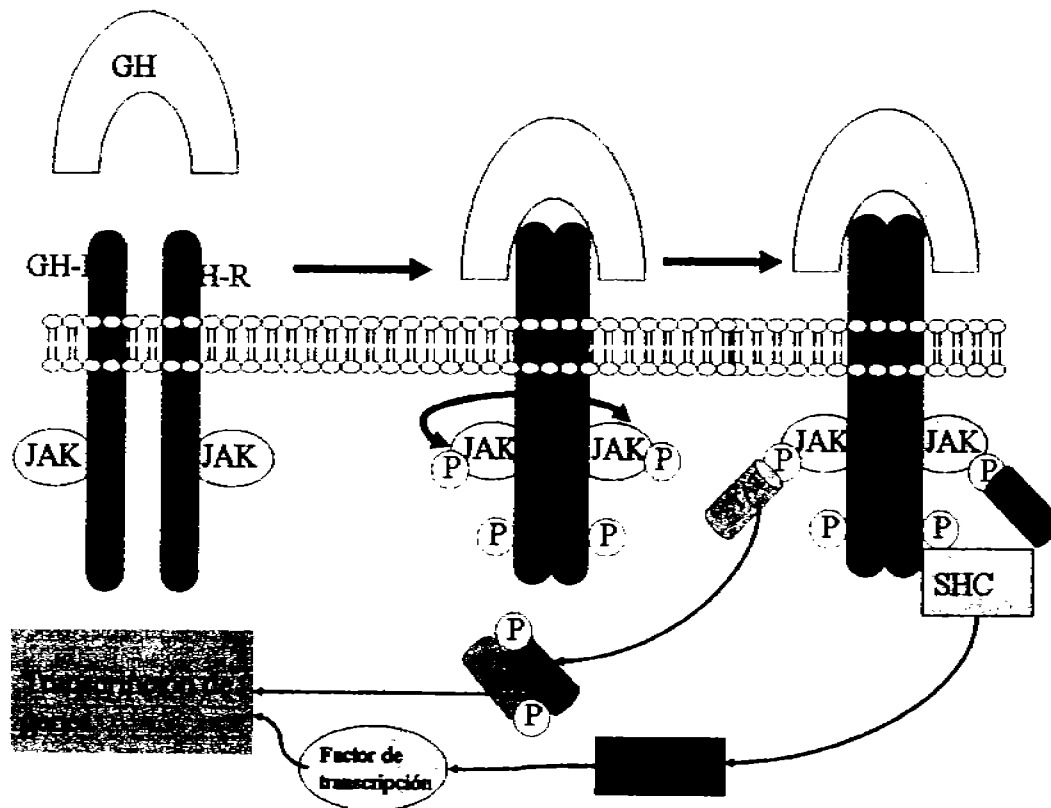


Figura 5, Modelo teórico de la activación del receptor de GH y su relación con la expresión génica. 1) Los receptores permanecen desacoplados en la membrana celular y las proteínas JAK aparecen desfosforiladas. 2) Cuando la GH se acopla a los receptores, hace que se dimericen y de esta manera se activen, lo que permite que las JAK sufran transfosforilación y que el mismo receptor haga lo mismo. 3) Las JAK fosforiladas, fosforilan a su vez a las STAT, que se heterodimerizan y se translocan al núcleo, funcionando como factores de transcripción. Por otra parte, el receptor fosforila a la proteína adaptadora SHC, que activa una cascada de proteínas tipo MAP cinasas, que a su vez pueden activar factores de transcripción como CREB (Zhu y col., 2001).

Organización del hipocampo y adquisición de memoria

El hipocampo de los mamíferos es considerado como la puerta de entrada de la memoria y como una de las regiones más plásticas del sistema nervioso central, también es una de las regiones con las que más aspectos conductuales se han relacionado (Carew, 2000). En general, se ha encontrado que muchos problemas de salud frecuentes en el humano, tienen especial incidencia en el hipocampo. Una de las zonas más afectadas por la enfermedad de Alzheimer es el hipocampo (Morimatsu y col., 1975) además de ser una de las zonas más resentidas en los pacientes con depresión (Amaral, 2003; McEwen, 2005). Las dos enfermedades mencionadas, nos dan una idea de las implicaciones conductuales que pueden tener los daños sobre el hipocampo, aunque de ninguna manera pensamos que la etiología y expresión de estas patologías tengan, únicamente relación con esta estructura. Actualmente existen pruebas conductuales que reflejan el desempeño del hipocampo a la hora de llevar a cabo una tarea específica, entre estas están la prueba del laberinto acuático, propuesto por Morris (1981). En esta prueba, se determina de manera directa la funcionalidad del hipocampo, especialmente de sus capas CA1 y CA3 cuyas neuronas son fundamentales en la adquisición de memoria espacial (Morris y col., 1982).



Figura 6 Corte sagital del cerebro de rata, las flechas indican las distintas poblaciones neuronales del hipocampo, los núcleos se aprecian de color negro, ya que están teñidos con violeta de cresilo (Paxinos, 1986).

Anatomía del hipocampo

Las distintas zonas en las que se encuentra dividido el hipocampo, fueron determinadas por el anatomista Santiago Lorente de Nó (Carew, 2000). Básicamente, estas se dividen en una capa de células granulares densamente poblada, esta capa tiene un fuerte doblez sobre sí misma, esta estructura se conoce como el giro dentado, porque se asemeja a un canino (Amaral, 2003). Las células granulares son, en su mayoría glutamatérgicas, aunque existen algunos otros fenotipos; alrededor de la capa granular del giro se encuentran las células del *hilus*, estas células son esencialmente gabaérgicas (Amaral, 2003). Dentro del pliegue del giro dentado, se encuentra una capa de neuronas grandes con largas proyecciones, que al observarse en el microscopio, parece desorganizada, esta capa suele llamarse CA4, pero siguiendo la nomenclatura de Paxinos, utilizada en este trabajo, se considerará como la capa polimórfica del giro dentado (Paxinos, 1986). Desde el punto de vista del corte sagital y del coronal, a la capa polimórfica del giro dentado, sigue una capa mucho más homogénea y organizada, esta capa cuenta con unas seis o siete células de espesor que se extiende largamente, esta es la zona CA, o cuerno de Amón, recordando los cuernos rituales que utilizaban los sacerdotes egipcios del dios del sol. Las zonas CA, se dividen en tres, utilizando consideraciones morfofuncionales, la capa CA1, que es extensa, homogénea y de ligero grosor, la capa CA2, que es muy pequeña y cuenta con células más alargadas. La capa CA3 no es tan grande como la CA1, ni tan pequeña como la CA2, es más gruesa que las otras y sus células son grandes y alargadas. Dentro de las vías que involucran el funcionamiento del hipocampo, se encuentran la vía perforante, originada en la corteza entorrinal (la cual se considera como una interfase entre las cortezas y el hipocampo). Las fibras musgosas que se originan en el giro dentado granular, llegan a las células piramidales de CA3. Las colaterales de Schaffer, originadas en las células piramidales de CA3, inervan las células piramidales de CA1. Finalmente están las fibras comisurales, éstas provienen de comisuras anteriores que pasan por la fimbria, haciendo contacto con las neuronas piramidales de CA1. El circuito general que funciona en el hipocampo, llamado circuito trisináptico, sintetiza lo anteriormente dicho.

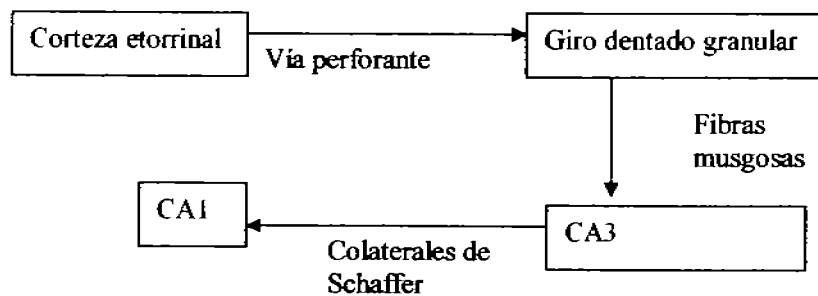
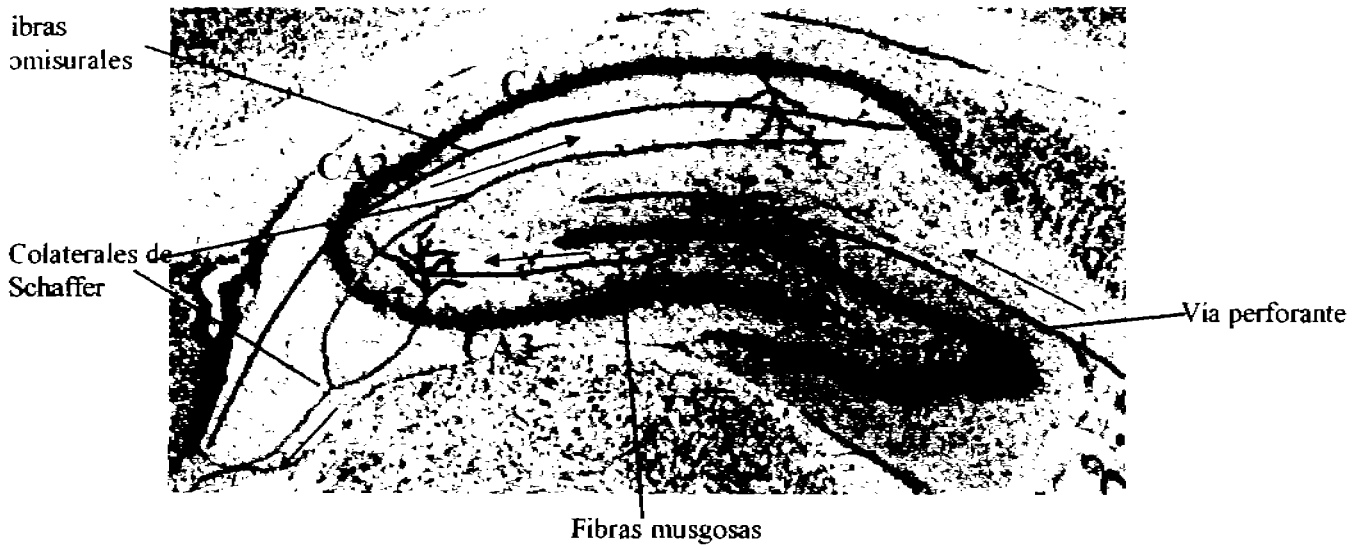


Figura 7, La figura muestra la organización de las conexiones en el hipocampo, de la corteza entorrinal llegan fibras perforantes hacia el giro dentado, de las neuronas granulares del giro dentado se originan las fibras musgosas, que relevan en las piramidales de CA3, de las que a su vez salen las fibras colaterales de Schaffer que llegan a otras zonas del sistema límbico y a CA1. A CA1, también llegan las fibras comisurales. También se muestra de una manera esquemática, como se organizan las conexiones en el llamado circuito trisináptico, cuya estimulación es la que induce la expresión de LTPs (Paxinos, 1986; Carew, 2000).

El hipocampo y la adquisición de la memoria

Tolman, en la década de 1930, describió la habilidad de las ratas para aprender laberintos, esto indica su capacidad para establecer mapas cognitivos y de navegación en el espacio (Tolman, 1948; Carew, 2000). Posteriormente, se afinaron los paradigmas experimentales de laberintos espaciales; el llamado laberinto de Olton (1977), consiste en

ocho brazos radiales elevados sobre el piso, al final de cada brazo se encuentra comida, las ratas en pocos días optimizan el laberinto, de modo que no visitan el mismo brazo dos veces. En el caso del laberinto de Olton, es utilizada la memoria de trabajo, con esta memoria se optimiza la repetición de una prueba específica una y otra vez. La que se da en varias pruebas es la memoria de referencia, un ejemplo de esta sería si la comida estuviera en solo ciertos brazos, entonces la rata dejaría marcas pero si esto no es posible, la memoria tendría que concretarse en un mapa cognitivo completo. Y en un mapa cognitivo resultado de la memoria de referencia, juegan un papel especialmente importante las referencias espaciales.

Como un perfeccionamiento del laberinto de ocho brazos, se desarrolló el laberinto acuático, considerando algunas cualidades fuertemente compartidas por todas las ratas. Las ratas, en su medio natural, son extraordinarias nadadoras, capaces de nadar en mar abierto durante horas entre dos islas y así colonizar archipiélagos enteros sin ayuda humana o de islotes. Sin embargo, en un mundo perfecto, las ratas no nadarían, porque evitan mojarse a toda costa, así como el espacio abierto que implican las extensiones de agua. Así que, en una prueba que involucra nado, el hecho de que la rata pueda estar fuera del agua, es la mayor recompensa posible (Carew, 2000).

La prueba básica, a la que se le han hecho varias modificaciones, consiste en entrenar a las ratas durante varias sesiones, para que localicen una plataforma hundida en agua opacada con leche, estas siempre son colocadas en un lugar distinto y únicamente utilizando como referencias, pistas espaciales, colocadas alrededor del tanque, las ratas pueden encontrar la plataforma, de donde son retiradas a un lugar seco. En unas cuantas sesiones, las ratas aprenden a través de las pistas espaciales a llegar a la plataforma y entonces se puede cuantificar el tiempo o la distancia de nado que transcurre para llegar a la plataforma, como una medida de la memoria adquirida en el desarrollo del experimento (Morris, 1981; Morris y col., 1982; Sorace y col., 2001).

En la década de 1950, se determinó mediante los experimentos de Milner y Scoville (1957; 2000), que las lesiones en el hipocampo, causan daño en la memoria de eventos (memoria explícita, declarativa o episódica), pero no afecta la memoria implícita o procedural, también se observó que la memoria adquirida previamente a la lesión, no se ve afectada. Cuando la rata es lesionada en el fórnix, la rata se comporta diferente,

perseverando en conductas incorrectas. En el caso específico del laberinto acuático de Morris, las ratas lesionadas en el hipocampo, tardan más tiempo en encontrar la plataforma, que las lesionadas en la neocorteza o las ratas sin lesión.

Tras la propuesta del laberinto de Morris, O'Keefe y Speakman (1987), descubrieron mediante un sencillo experimento, que en el hipocampo existen células que ellos llamaron "de lugar" estas células presentan actividad cuando la rata observa pistas espaciales. En el caso de que las ratas se hayan equivocado, las neuronas presentan actividad en el lugar incorrecto equivalente. En otra prueba similar, si las ratas han sido entrenadas para tomar premios una vez a la derecha y otra a la izquierda, existe una subpoblación de células que presenta actividad solo cuando toca virar a la izquierda y otra subpoblación que se activa al virar a la derecha, también existen subpoblaciones que presentan actividad en ambos casos. Se concluye por lo tanto que estos y otros experimentos, indican que la red hipocámpal representa memorias episódicas, como una secuencia de eventos y lugares, como una película en la que cada célula, contiene la información de un cuadro. La actividad de las células hipocámpales, representa un pequeño segmento del episodio, información sobre un estímulo, un comportamiento y la localización de momento. Muchas células codifican una particular combinación de eventos y lugares y otras para varias combinaciones "El hipocampo codifica elementos episodio específicos y los une en un amplio espacio de memoria".

Al estimular repetidamente las colaterales de Schaffer, o la vía perforante, aumenta la proporción de EPSP (potenciales postsinápticos excitatorios) en las neuronas postsinápticas del hipocampo. Esta facilitación sináptica se llamó potencial de largo plazo (LTP), porque duraba horas e incluso días y semanas (Douglas y Goddard, 1975; Reymann y col., 1985). Para facilitar la expresión de un LTP, se requieren varios requisitos, pero esencialmente se forman en CA3 y CA1, en regiones específicas de las neuronas, principalmente en las espinas dendríticas. Los LTP más largos, que duran al menos 10 horas, requieren de la síntesis de cAMP y de proteínas (Krug y col., 1984; Deadwyler y col., 1987). Se reconoce habitualmente que los LTP son una parte muy importante del componente electroquímico de la memoria, por lo que se concluye que las regiones CA3 y CA1, son las zonas del hipocampo más directamente involucradas en la adquisición de memoria y la formación de mapas cognitivos. Otras áreas sensibles a la formación de

LTPs, son la corteza, el cerebelo y la amígdala. Diversos estudios con ratones knock-out (KO), muestran una dependencia de los LTPs a los influjos de Ca^{++} intracelular y sobre todo, la dependencia absoluta del receptor NMDA. Los ratones KO a NMDA no pueden formar LTPs ni resolver laberintos, muestran una completa pérdida de las células de lugar (Nakazawa y col., 2003).

Existen evidencias de que alteraciones en la memoria pueden atribuirse o por lo menos correlacionarse directamente con un estado de estrés oxidativo, lo cual se ha demostrado mediante lípidos peroxidados, en el caso de la inyección del péptido beta amiloide directamente en el hipocampo (Perez-Severiano y col., 2004). En el estrés oxidativo inducido por inyección de kainato, se puede observar también el incremento de lípidos peroxidados (Sztriha, 1986) y la aparición de problemas cognitivos (Handelmann y Olton, 1981). Otro estudio, indica que tras la inyección del péptido β amiloide, aumenta significativamente la pérdida de células en el hipocampo, especialmente en CA1, respecto a lo que ocurre en CA3, esta pérdida, está relacionada con la detección en aumento del estrés oxidativo, medido por el incremento superóxidos (Stepanichev y col., 2004). En otro experimento similar, se observó una correlación positiva, entre la expresión de la interleucina 6 y 1b, con la expresión de glutatión peroxidasa, que sin embargo decae con el tiempo y se torna negativa (Rosales-Corral, 2004). Se tiene bastante claro que la presencia de especies reactivas productos del estrés oxidativo, activan vías de transducción específicas, capaces de estimular la expresión de factores inflamatorios como interleucinas. Ya se ha discutido numerosas veces en la literatura, la expresión de COX-2 en el hipocampo, así como la detección de su primer y más abundante metabolito, la PGE_2 . Aunque la COX-2 se encuentra en niveles basales constitutivos, tiene un fuerte incremento en su expresión como resultado de estados inflamatorios y un cambio en el equilibrio de óxido reducción. Aunque los productos de la COX-2 se han caracterizado como factores inflamatorios, causantes de dolor, causantes de sueño, de fiebre, de edema y de apoptosis, también hay quién ha mostrado la posible implicación funcional en procesos de adquisición de memoria. Un experimento reciente, muestra que la inyección de inhibidores específicos de la COX-2, causa un decremento del desempeño de las ratas en el laberinto de Morris (Teather y col., 2002), se justifica que la presencia de PGE_2 en las sinapsis, puede coadyuvar a la sinapsis glutamatérgica y tal vez a la formación de LTPs, ya que también

estimulan la entrada de calcio, y la biosíntesis de cAMP. La memoria requiere de un sustrato anatómico y un sustrato bioquímico, y en el estrés oxidativo hay pérdida de poblaciones celulares que permiten la formación de circuitos neuronales y hay un fuerte desbalance bioquímico, expresado en el aumento del calcio intracelular, la muerte mitocondrial, el déficit energético, y alteraciones en la permeabilidad, mecanismos indispensables para el mantenimiento de procesos como los LTP y cualquier tipo de potencial postsináptico.

La COX-2 y las enfermedades neurodegenerativas

La primera razón por la que se sugirió una participación de la COX-2 en la enfermedad de Alzheimer (EA) es que el uso prolongado de AINEs retrasa el desarrollo de la enfermedad (Rich *y col.*, 1995). Estudios *post-mortem* indican que en presencia de placas neurofibrilares la COX-2 se incrementa significativamente en la corteza cerebral y en el hipocampo (Morimatsu *y col.*, 1975). Este aumento está presente desde las primeras etapas de la enfermedad y durante todo el transcurso de esta (Luterman *y col.*, 2000). También se ha observado que en los cerebros de pacientes con EA aparece una creciente expresión de IL-1 β e IL-6, que participan en la síntesis de la proteína precursora de amiloides (APP). La IL-1 β se asocia con la transformación de APP en el péptido β A mediante un proceso en el que participa la COX-2. La IL-1 β induce la expresión de COX-2 en las neuronas y ésta causa liberación de PGE₂, esta liberación incrementa la secreción de IL-1 β e IL-6 en los astrocitos que en las neuronas inducen apoptosis al activar una vía de MAPK en la que se encuentran Myc y P53 (Bazan *y col.*, 2002).

El estado de estrés oxidativo, está presente tanto en el envejecimiento como en desórdenes neurodegenerativos asociados con la edad, incluyendo la EA. Una producción excesiva de radicales libres que sobrepasa las habilidades celulares de atrapar y detoxificar los agentes peligrosos juega un papel crítico en el envejecimiento acelerado y la aparición de enfermedades neurodegenerativas. En el cerebro afectado por la EA se presenta oxidación de lípidos, proteínas y DNA (Butterfield *y col.*, 2001). Uno de los factores importantes que contribuyen a mantener este círculo vicioso, es el aumento de la COX-2. Esta proteína en presencia de estrés oxidativo es oxidada e incrementa unas veinte veces su actividad enzimática (Fujimoto *y col.*, 2004). La COX-2 es una generadora importante de especies reactivas de oxígeno y citoquinas, esta contribuye a que se perpetúe el círculo vicioso de inflamación durante todo el transcurso de la enfermedad (Butterfield *y col.*, 2001).

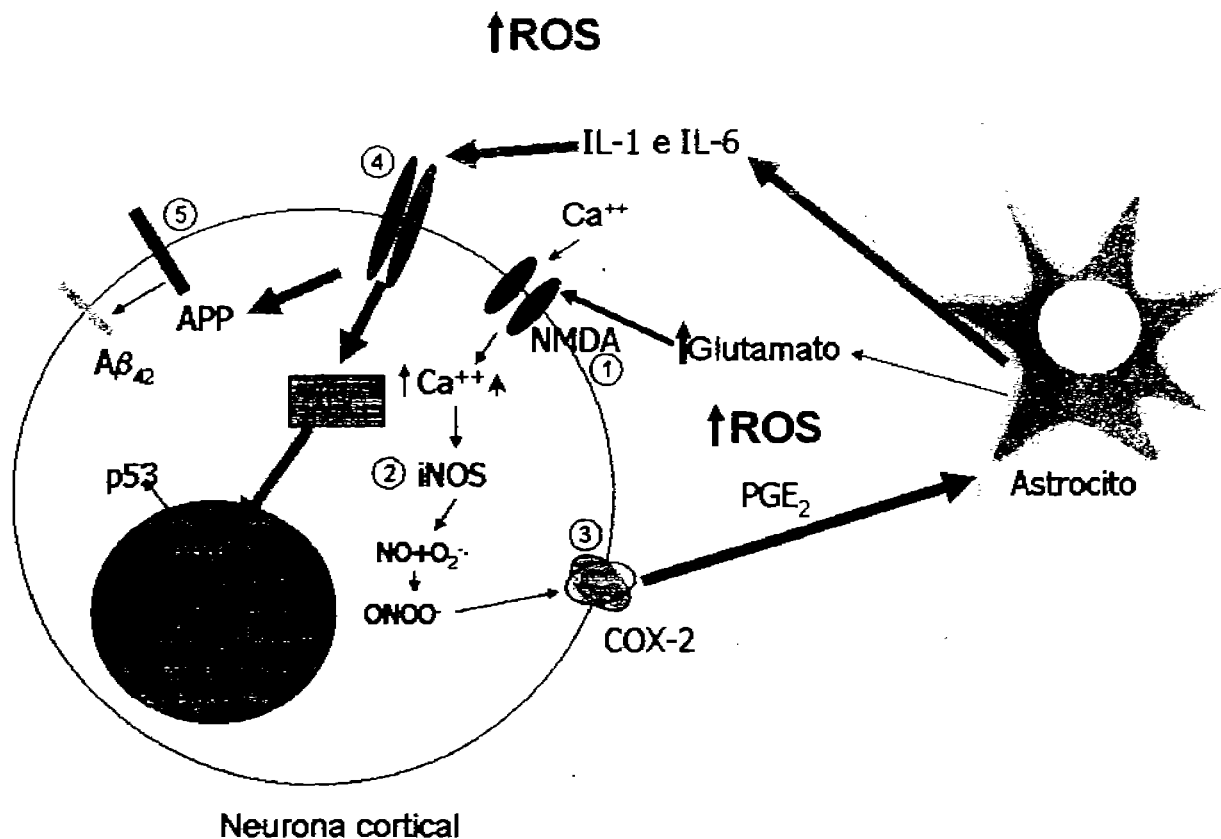


Figura 8. Interacciones entre el astrocito y la neurona que se dan durante las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer. El incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), produce un aumento en la liberación de glutamato, el cual activa los receptores tipo NMDA. 1) Esto produce una importante entrada de Ca^{++} en la neurona 2) lo que activa la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que produce óxido nítrico que a su vez reacciona con el radical superóxido, produciendo el radical peroxinitrito (ONOO). El ONOO oxida a la COX-2 sobreactivándola 3) esta sobreactivación produce grandes cantidades de prostaglandinas, lo que estimula a los astrocitos aledaños secretar fuertes cantidades de IL-1 e IL-6. 4) Estas interleucinas activan la apoptosis mediante la vía de MAP cinasas (MAPK), 5) así como la producción de la proteína precursora de amiloides (APP), que al ser lisada por caspasas, produce el péptido β amiloide, fuertemente tóxico, comunmente encontrado en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Butterfield y col., 2001).

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por una neurodegeneración progresiva e irreversible de las neuronas en *substantia nigra* y sus prolongaciones en estriado, las cuales intervienen en la regulación motora. En ratones tratados con 1-metil-4-

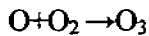
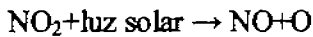
fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), utilizados como modelo animal de la EP, así como en estudios *post-mortem* de personas que padecieron EP se observa un aumento de la expresión de COX-2 en células nerviosas (Teismann y col., 2003). Con el fin de probar si la presencia de COX-2 causa la muerte de las neuronas de la *substantia nigra* se realizó un sencillo experimento en el que se trataron ratones con solución salina, MPTP y MPTP con dosis crecientes de meloxicam, un AINE. Los resultados mostraron que las células productoras de dopamina y las neuronas totales disminuían considerablemente con la administración de MPTP, pero su número se conservaba a dosis crecientes de meloxicam. Esto arroja como conclusión que la inhibición de COX-2 en la *substantia nigra* disminuye el proceso neurodegenerativo (Teismann y Ferger, 2001). Aunque los trabajos citados y muchos otros existentes han mostrado que el aumento de COX-2 se relaciona con la pérdida de neuronas dopaminérgicas, el mecanismo exacto por el cual se da esta pérdida permanece desconocido; sin embargo se piensa que pudiera ser similar al de la EA (Teismann y col., 2003).

La esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELAF) es una enfermedad neurodegenerativa muy importante, caracterizada por la muerte de neuronas motoras en la médula espinal que causa inevitables trastornos motores en los pacientes. Aunque la enfermedad es de origen genético, la muerte celular se da por autoinmunidad incontrolada. La actividad de la COX-2 tiene un importante papel en la ELAF ya que la regulación positiva de la enzima ocurre a la par de los eventos progresivos de la enfermedad. La COX-2 y la PGE₂ aparecen en la médula espinal de pacientes con ELAF en concentraciones siete veces mayores que en personas sanas (Yasojima y col., 2001). Se piensa que la aparición de ELAF tiene que ver con mutaciones en la enzima superóxido dismutasa (SOD-1) que inhabilitan su funcionamiento. Dicha enzima es crucial en la detoxificación de los radicales libres por lo que se induce un crecimiento desmedido de estos agentes tóxicos. Es posible que por esa razón se produzcan altas cantidades de COX-2 y citoquinas y se activan células del sistema inmune. Cuando se desencadena este proceso inflamatorio suceden varios eventos, la microglía fagocítica del sistema nervioso central se activa y comienza a fagocitar neuronas dañadas, a la par, los vasos sanguíneos se dilatan y fenestran lo que permite la entrada de linfocitos CD4⁺ que aumentan la cantidad de citoquinas y linfocitos CD8⁺ que pueden inducir la muerte neuronal (Consilvio y col., 2004). Por último, como

muestra de la implicación de COX-2 en la ELAF se ha observado que si se proporcionan AINEs (tanto selectivos a COX-2, como el celecoxib, tanto no selectivos, como el ASA) en modelos animales y en pacientes habrá un retraso notable en el progreso de la enfermedad (Consilvio y col., 2004).

El modelo de estrés oxidativo por ozono

El ozono (O₃) es muy inestable y altamente reactivo. El ozono naturalmente se forma en las capas superiores de la atmósfera, cuando el O₂ es irradiado con luz ultravioleta. Sin embargo, en las capas bajas de la atmósfera, se forma tras la incidencia de la luz ultravioleta sobre los óxidos de nitrógeno, productos de las descargas eléctricas sobre el nitrógeno molecular (N₂) o provenientes de la combustión de carburantes fósiles. El conjunto de reacciones que ocurren en la tropósfera, se puede sintetizar de la siguiente manera:



Por esta vía, se forma el O₃ presente en las capas bajas de la atmósfera y este es el O₃ al que nos encontramos expuestos frecuentemente (Finlayson-Pitts, 1999).

El O₃ se mezcla con el aire y es inhalado durante la respiración, al entrar en contacto con el agua presente en la superficie del epitelio pulmonar, el O₃ se destruye, formando moléculas oxidantes y radicales libres. El pulmón tiene un sistema de antioxidantes contra moléculas oxidantes, que se forman a partir de la inhalación de gases atmosféricos. Conformando el sistema antioxidante pulmonar, se encuentran las enzimas SOD de cobre y zinc y de manganeso, también la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la catalasa. Estas enzimas pueden, mediante las reacciones explicadas previamente, destruir la mayoría de las moléculas oxidantes y radicales libres que se forman en el epitelio pulmonar, incluso aumentan su expresión en presencia de O₃ (Rahman y *col.*, 1991; Rivas-Arancibia y *col.*, 1998). Sin embargo, la expresión de estas enzimas tiene un límite y su capacidad de catalizar sustratos también. Por esta razón, ante la exposición crónica o aguda al O₃, las especies reactivas comienzan a difundirse por toda la circulación sanguínea. Cuando esto sucede y las demás defensas antioxidantes del organismo, no pueden neutralizar todas las especies reactivas antes de producir daño molecular, entonces el equilibrio óxido-reducción se ha perdido y el organismo ha entrado en estrés oxidativo.

Por este motivo, bajas dosis de ozono administradas por poco tiempo, no tienen un efecto significativo sobre la fisiología general, sino apenas ciertos síntomas de inflamación en los pulmones, así en los epitelios expuestos al aire y no queratinizados, como sería el

caso de la conjuntiva ocular, garganta y vías aéreas superiores. La inflamación que se manifiesta en estos tejidos, tiene que ver con la activación del factor NFκB y la consiguiente producción de citoquinas inflamatorias. Aunque en este caso, el organismo sigue manteniendo su equilibrio redox. Sin embargo, cuando se incrementan los niveles de O₃ o el gas se administra en bajas dosis durante periodos de tiempo largos, las especies reactivas que no pueden ser neutralizadas en el pulmón llegan a la circulación, y comienzan a causar daño oxidativo sobre lípidos, proteínas, DNA, etc, entonces el organismo se encuentra en desequilibrio redox.

Existen numerosos modelos para provocar estrés oxidativo en animales de experimentación, entre estos se encuentran la administración de sustancias oxidantes, como el paracuato, el óxido de cadmio, el ácido-3-nitropopiónico, el modelo de hipoxia-reperusión, la administración de H₂O₂ y otros. También existen métodos de provocar estrés oxidativo en tejidos específicos, con características específicas de cada tejido. Por ejemplo, la inyección sobre algún lugar del cerebro del péptido βA, es un modelo de estrés oxidativo cerebral, que tiene como objetivo imitar el resultado de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

El modelo de inducción de estrés oxidativo utilizando exposición a O₃ en cámaras especialmente diseñadas para dicho fin, tiene la ventaja de que es sistémico, y no es invasivo, ya que no se tiene que administrar ninguna sustancia externa, ni mucho menos realizar intervenciones quirúrgicas. Es suficiente que los animales inhalen aire de manera natural, para conseguir, dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición, la inducción correcta de estrés oxidativo.

Entre los primeros efectos fisiológicos observados de la exposición a O₃, se encontró que la exposición durante 4hr en dosis de 0.1, 0.2 y 0.5 ppm, se incrementan en pulmón y cerebro los niveles de SOD-1, así como la memoria de largo plazo en el paradigma de prevención pasiva se ven deteriorados. También se mostró, que los niveles de SOD-1, se ven reducidos en la exposición a 1ppm de O₃ (Rivas-Arancibia y col., 1998), este resultado muestra que a esas dosis, la capacidad de respuesta de la SOD-1 ha sido rebasada y sus niveles se reducen para que la misma SOD-1 no contribuya con el desequilibrio redox. Posteriormente, se encontraron daños citológicos como consecuencia de la

exposición a 1ppm de O₃, las células piramidales de CA1, mostraron una consistente disminución en la cantidad de espinas dendríticas que aparecen con la tinción argéntica de Golgi (Avila-Costa y col., 1999).

Posteriormente se observó que el O₃ provoca un incremento en las cantidades de lípidos peroxidados en diferentes regiones cerebrales, este aumento difiere entre las zonas analizadas, la zona más resistente es la corteza frontal y las más lábiles, el hipocampo y la *substantia nigra*. También se muestra, que tanto los efectos bioquímicos como conductuales, pueden ser prevenidos mediante la administración de vitamina E (Guerrero y col., 1999). El efecto protector mediado por antioxidantes ha sido observado también con taurina y vitamina C (Rodríguez-Martínez y col., 2004).

Otros experimentos a más niveles, han mostrado que a nivel de comportamiento, se ve aumentada la conducta de congelamiento, no así las conductas exploratorias y motoras que se ven disminuidas. La liberación de neurotransmisores también se ve alterada, mientras que la dopamina, el ácido glutámico y el GABA se incrementan en la exposición a O₃, por el contrario la serotonina decrece. Por otra parte, los indicadores de liberación de óxido nítrico, como citrulina y nitratos, aumentan su concentración. También en la zona del estriado, análisis con microscopía electrónica, han mostrado modificaciones citológicas importantes. Se observa vacuolización en las dendritas e incremento del retículo endoplásmico rugoso (Rivas-Arancibia y col., 2003).

Hipótesis

Sí la GH actúa como antioxidante, puede revertir los cambios inducidos por estrés oxidativo, tanto conductuales como en el metabolismo de la ciclooxigenasa-2 en el hipocampo.

Objetivos generales:

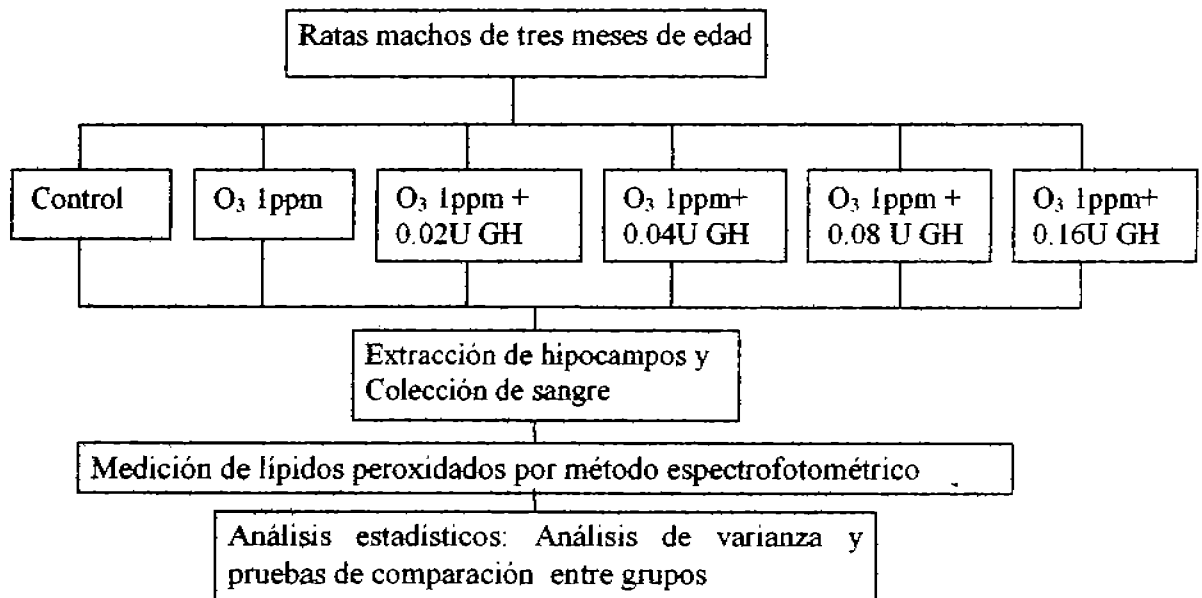
1. Determinar el efecto de la GH en la expresión de COX-2 y las alteraciones sufridas en el hipocampo, causadas por el estrés oxidativo producido por exposición a ozono.

Objetivos particulares

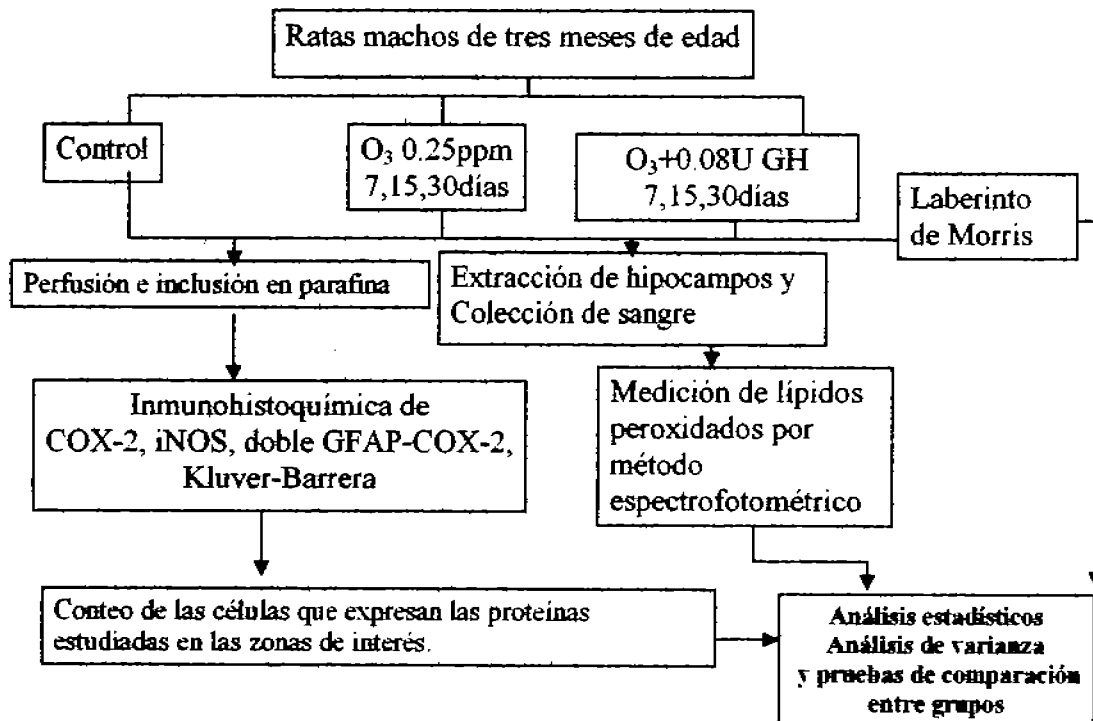
1. Determinar si existe un efecto antioxidante de la GH en el hipocampo en un experimento agudo y en un experimento crónico.
2. Estudiar si la GH protege a los animales del declive del aprendizaje espacial causado por exposición crónica a bajas dosis de ozono.
3. Determinar las alteraciones en la expresión de la COX-2 en el hipocampo, expuesto a estrés oxidativo crónico, por exposición crónica a bajas dosis de ozono y determinar el efecto de la GH sobre dicha expresión.
4. Determinar los posibles cambios en el número de neuronas en las capas CA1 y CA3 del hipocampo, en la exposición crónica a bajas dosis de ozono y el efecto de la GH sobre este.
5. Determinar los posibles cambios en la expresión de iNOS en la capas CA1 y CA3 del hipocampo, en la exposición crónica a bajas dosis de ozono y el efecto de la GH sobre este.
6. Determinar si el posible efecto antioxidante de la GH se da de forma directa o por medio de reacciones metabólicas.

Estrategia experimental

Curva dosis respuesta



Experimento crónico



Material y Métodos

Grupos experimentales, curva dosis respuesta para determinar dosis.

Se utilizaron 36 ratas macho de la cepa wistar, de tres meses de edad con peso de 300g, ciclo de luz/oscuridad de doce horas, con comida y agua *at libitum*. Las ratas se dividieron en seis grupos de seis individuos. El primer grupo fue el control y no se le aplicó ningún tratamiento. Los restantes grupos fueron expuestos durante 4hr a O₃ 1ppm, al salir de la cámara de O₃ a un grupo se le inyectaron 0.02U de GH (Saizen) de forma subcutánea utilizando agua inyectable como vehículo, a otro grupo 0.04U, 0.08U, 0.16U y al último no se administró ninguna dosis. Dos horas después de salir de la cámara de O₃ las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Se colectó la sangre y se separó el suero mediante centrifugación, 5 minutos a 3000rpm guardándose a -70°C. Se diseccionaron los cerebros con el fin de extraer los hipocampos y posteriormente homogenizarlos 1:10 en PB (0.1M pH 7.4) y guardarlos a -70°C.

Grupos experimentales, experimento crónico

Se utilizaron setenta ratas macho de la cepa wistar, de tres meses de edad con peso de 300g, ciclo de luz/oscuridad de doce horas, con comida y agua *at libitum*. Las ratas fueron divididas en tres grupos, un grupo, como control, un grupo expuesto a O₃ y otro expuesto a O₃ y tratado con 0.08U de GH, estos dos grupos, se dividieron en tres subgrupos, de acuerdo al tiempo de exposición, 7 días, 15 días y 30 días. La exposición a O₃ se llevó a cabo colocando las ratas en una cámara de ozono durante cuatro horas diarias, a 0.25ppm del gas, los animales del grupo tratado con GH, se inyectaron diariamente tras la exposición a ozono, por vía subcutánea utilizando agua inyectable como vehículo.

. Seis individuos de cada grupo, fueron sacrificados por decapitación dos horas después de recibir la última inyección de la hormona. Se colectó la sangre y se separó el suero mediante centrifugación, 5 minutos a 3000rpm guardándose a -70°C. Se diseccionaron los cerebros con el fin de extraer los hipocampos para posteriormente homogenizarlos 1:10 en PB (0.1M pH 7.4) y guardarlos a -70°C.

Se utilizaron cuatro individuos de cada grupo con los mismos tratamientos ya descritos, que fueron perfundidos con paraformaldehído a 4%, siguiendo posteriormente un método estándar de inclusión en parafina, para obtener cortes sagitales de 5 μ m, en laminillas cubiertas de poli-L-lisina.

Inmunohistoquímica

Las pruebas de inmunohistoquímica que se realizaron para la proteína COX-2, se llevaron a cabo tras un procedimiento de recuperación antigénica en una olla de presión (decloaking chamber biocare) para recuperación de antígenos a 120°C y 15psi durante 20 minutos, en el buffer developer (Biocare) y tras 20 minutos de enfriamiento, se lavaron dos veces con agua desionizada. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena, mediante H₂O₂ (3%) durante 10 minutos y se lavó dos veces con agua desionizada. Posteriormente, se añadió una solución de bloqueo (ScyTek super block), tras un breve lavado con PBS (0.1M, pH 7.4), seguido del anticuerpo primario IgG anti COX-2 de rata hecho en conejo (Santa Cruz sc-7951)(Li y col., 2004; Ye y col., 2005) 1 μ g/ml, en PBS, se dejó incubar 12 horas a 4 °C, se realizaron tres lavados con PBS y a continuación se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado (UltraTek anticuerpo biotinilado Anti-polivalente), tras tres lavados en PBS se añadió el complejo enzimático estreptavidina peroxidasa (UltraTek HRP) y tras tres lavados con PBS, se reveló con una solución de cromógeno (diaminobenzidina) y sustrato (H₂O₂) (Dako DAB kit), la reacción se detuvo a los dos minutos utilizando agua desionizada. En la inmunohistoquímica para iNOS, se utilizó el mismo procedimiento anterior, pero con el anticuerpo primario IgG anti COX-2 de rata hecho en conejo (sc-651) (Rodríguez-Pascual y col., 2000).

En la doble inmunohistoquímica, tras la incubación con el DAB, las laminillas fueron incubadas en baño maría hirviendo en una solución de tris pH 8.0 y EDTA durante 20 minutos, tras dos lavados con PBS, se incubaron en clara de huevo durante 30 minutos y posteriormente en leche descremada 1:10 durante media hora, tras dos lavados con PBS, se volvió a bloquear la peroxidasa igual que en el primer paso. Finalmente se incubó con el anticuerpo anti-GFAP de conejo (Zymed 18-0063)(Tanaka y Sobue, 1994) en

concentración de 1:100, a temperatura ambiente durante 12 horas, posteriormente se utilizaron el anticuerpo secundario y el sistema de amplificación similar a la primera parte y se utilizó el cromógeno AEC, que proporciona un color rojo (Zymed).

Los datos se analizaron primero llevando a cabo la prueba de Barlett, para determinar si el análisis debía ser o no paramétrico, al tener una diferencia significativa entre las varianzas, se procedió a una prueba de Kruskal-Wallis, cuando esta prueba arrojó una $p < 0.05$, entonces se procedió a un análisis de comparación entre grupos, con la prueba de U de Mann-Whitney, aquí también se consideró significancia, en $p < 0.05$.

Método de Kluver-Barrera para teñir neuronas selectivamente

Las laminillas fueron desparafinizadas hasta etanol al 95%, posteriormente fueron incubadas en una solución de Luxol fast blue (1% en etanol al 95%) a 60°C durante toda la noche. Las laminillas se lavaron en etanol al 95% y posteriormente en agua bidestilada, después fueron sumergidas en una solución de cloruro de litio (0.05%) durante 5 segundos, luego etanol al 70% durante 10 segundos y otra vez en agua bidestilada. Se repitieron los pasos anteriores hasta que se observó un contraste adecuado entre la materia gris (sin color) y las fibras de mielina (azules). Se incubaron en violeta de cresilo (0.25% en agua con 0.1% de ácido acético glacial) durante 1 minuto. Fueron nuevamente lavados con agua bidestilada, deshidratados y montados. Las fibras mielinizadas se observan azul fuerte, mientras que los cuerpos de Nissl, se muestra color violeta (Kluver y Barrera, 1953).

Cuantificación de lípidos peroxidados

Para la cuantificar los niveles de lípidos peroxidados, se utilizó una técnica espectrofotométrica basada en la reducción de lípidos hidroperoxidados a lípidos hidroxilados en presencia de hemoglobina. En presencia de lípidos hidroxilados el MCDP se rompe en forma oxidativa y produce azul de metileno en proporción equimolar. Para llevar a cabo este procedimiento se descongelaron los homogenizados, fueron centrifugados a 3000rpm durante 5 min y se utilizó el sobrenadante. Se colocaron 20µl de la muestra en

tubos para microcentrífuga, y se colocaron 80µl de la solución de oxidasa ascórbica (kit de peroxidación de lípidos LPO-cc de Kamiya)(Ohishi y *col.*, 1985; Wang y Liehr, 1994), a 30°C durante 10 min, posteriormente se colocaron en cada tubo 160 µl de la solución de hemoglobina y MCDP del mismo kit, incubándose a 30°C en oscuridad durante 15min, inmediatamente se midió absorbancia a 675nm en el espectrofotómetro de masas, y realizando una curva de calibración utilizando una muestra blanco (PB) y una muestra estándar del kit (Hidroperóxido de cumeno 50nmol), para obtener la cuantificación lípidos peroxidados en el tejido en nmoles/ml de homogenizado. En el caso de la medición en plasma se hizo de la misma manera, pero sin realizar ninguna dilución y la centrifugación se utilizó para remover la fracción celular.

Laberinto de Morris

Las pruebas para determinar adquisición de nueva memoria espacial, fueron llevadas a cabo mediante la utilización de la técnica de laberinto acuático propuestas por Morris 1982. Se utilizó para esto un tanque de 1.5m de diámetro, 60 cm de alto, con una plataforma de 30 cm de alto. La plataforma queda hundida 1cm en el agua que es enturbada con leche en polvo y acondicionada a 22°C. Alrededor del tanque, se colocaron imágenes bien visibles y distinguibles por sus formas y sus colores.

Tres días antes de sacrificar a las ratas, comenzó el entrenamiento de cada grupo de animales, tras la dosis de GH en su caso. El primer entrenamiento consistió en colocar a la rata en un punto dentro del agua para que buscara la salida, como usualmente las ratas la buscan alrededor del tanque, en la primera prueba la rata es guiada hacia la plataforma, cuando ha permanecido ahí 15 segundos, se acerca a la rata una reja, a la cual esta se sube y se la transporta a un lugar seco. El primer día se hacen dos pruebas más, esperando que la rata encuentre por sí sola la plataforma. En el segundo día, las ratas hacen tres pruebas y el tercero también. Finalmente, se quita la plataforma, el tanque es dividido en cuatro cuadrantes y se deja que la rata nada buscando la plataforma durante un minuto, cada vez que la rata nada en el cuadrante adecuado, se mide el tiempo que permanece ahí. El tiempo que nada cada rata en el cuadrante correcto, se utiliza como índice de memoria.

Prueba para determinar si la GH tiene efecto antioxidante intrínseco

Para esta prueba se utilizaron los homogenizados de hipocampo de 6 ratas distintas, que fueron distribuidos en varios tubos para microcentrífuga. Se colocaron 100µl de homogenado en 3 ml de un medio oxidante, compuesto por KH_2PO_4 50 mM, Xantina 50µM, EDTA 0.1 mM y 1 unidad de Xantina Oxidasa (Una unidad de xantina oxidasa, es la cantidad de enzima necesaria para oxidar un µM de xantina en un minuto), también se utilizó el mismo medio sin la xantina oxidasa a modo de control. Este medio fue colocado a 37°C en un baño de inmersión y de cuatro homogenados distintos, se tomaron muestras a los 2 min, a los 5 min, a los 10min y a los 15 min, Con estas muestras, se procedió a la cuantificación de lípidos referida anteriormente. A los resultados obtenidos, se les aplicó una regresión hiperbólica, utilizando el paquete estadísticos Sigma Plot. A partir de los resultados de esta curva, se utilizaron los mismos medios, pero incubándolos únicamente durante 4.5min, agregándoles 0.024 y 0.048 U de GH, así como 150µmoles de ácido ascórbico (sigma), a modo de control positivo.

Resultados

Curvas dosis respuesta de peroxidación de lípidos

Los resultados indican que la única dosis que tiene efecto antioxidante, es la de 0.08U de GH (fig 9). En el tejido de hipocampo homogenizado, no se encontró una distribución normal de las mediciones y no se encontró homogeneidad en las varianzas, por tal motivo se utilizaron estadísticas no paramétricas. Se utilizó el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (K-W), para grupos independientes considerando el resultado significativo con una $p < 0.05$. La prueba de K-W mostró una p de 0.0029, por lo que se procedió a realizar la prueba de U de Mann-Whitney (M-W) para determinar diferencias entre grupos independientes. Esta medición arrojó diferencias significativas entre el control y todos los grupos menos el que fue tratado con 0.08U de GH, este grupo y el tratado con 0.16 de GH, a su vez mostraron una diferencia con el grupo no tratado con la hormona, por esta razón se decidió utilizar esta dosis, que además es la misma que se utilizó en experimentos anteriores (fig 9A) (Schneider-Rivas *y col.*, 1995). En la medición en plasma, realizada con el objeto de mostrar los efectos a un nivel más global, las diferencias significativas, se mostraron en la dosis de 0.04U.

Figura 9

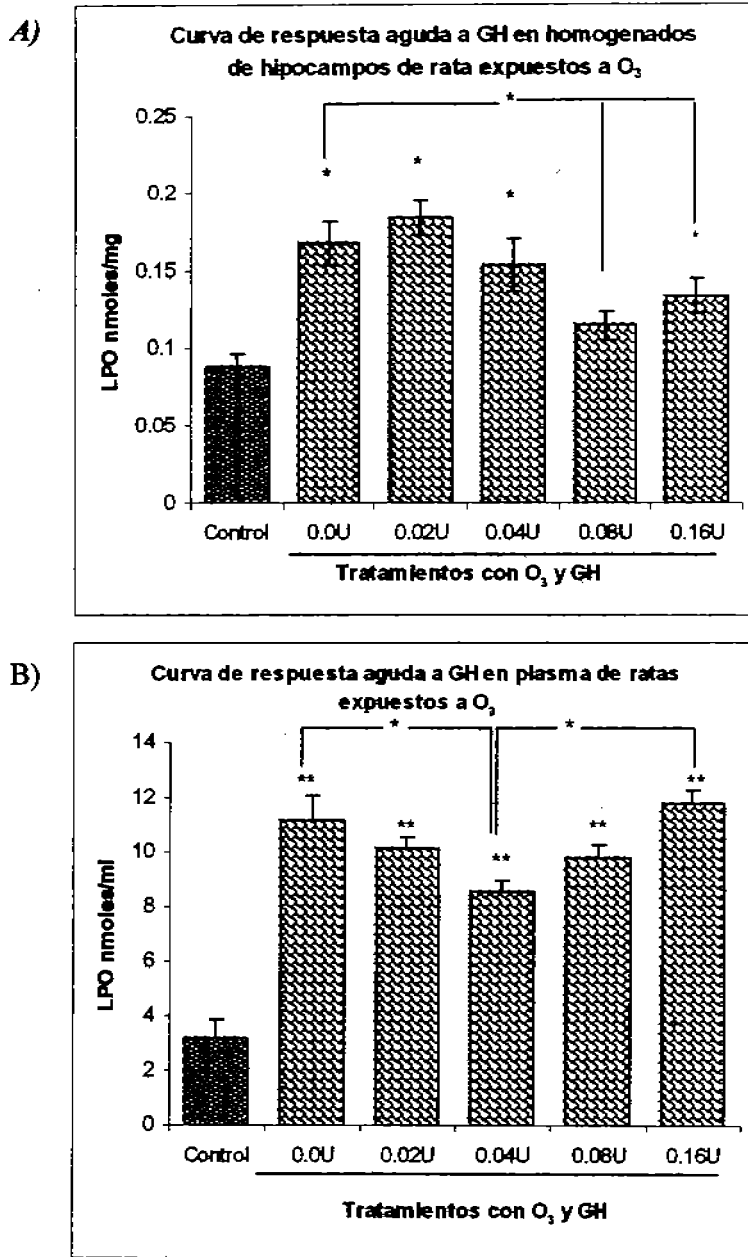


Figura 9. Efectos de diferentes dosis de GH sobre los niveles de lípidos peroxidados en ratas expuestas a O₃ 1ppm, presentados en medias \pm e.e.m, en el eje de las abscisas se encuentran las diferentes dosis de GH probadas, así como el grupo control que no recibió ningún tratamiento A) La dosis que resultó tener un mayor efecto antioxidante en los homogenados de hipocampo, fue la de 0.08U al no presentar diferencia significativa con el control. B) En el caso del plasma, el mayor efecto antioxidante se encontró con la dosis de 0.04, que es diferente con el grupo sin tratamiento con GH. *, $p < 0.05$ contra el control y entre grupos, **, $p < 0.01$ contra el control y entre grupos.

El tratamiento con GH modifica la cantidad de lípidos peroxidados en el hipocampo, a los quince días de exposición a 0.25ppm de O₃.

En las mediciones de lípidos peroxidados en los sueros de las ratas tratadas crónicamente con 0.25ppm de O₃ y 0.25ppm de O₃+ 0.08U de GH, observamos que existe un aumento progresivo de la oxidación de lípidos en ambos grupos, mostrando diferencias significativas de todos los grupos experimentales respecto al control con una $p < 0.05$. En los homogenizados de hipocampo, se muestra una diferencia significativa entre grupos a los quince días, lo que no ocurre a los siete días de tratamiento ni a los treinta días. En las mediciones realizadas en el plasma, encontramos el mismo patrón, con la diferencia de que el efecto reductor de lipoperoxidación de la hormona a los 15 días, es más acentuado que en el hipocampo.

Figura 10

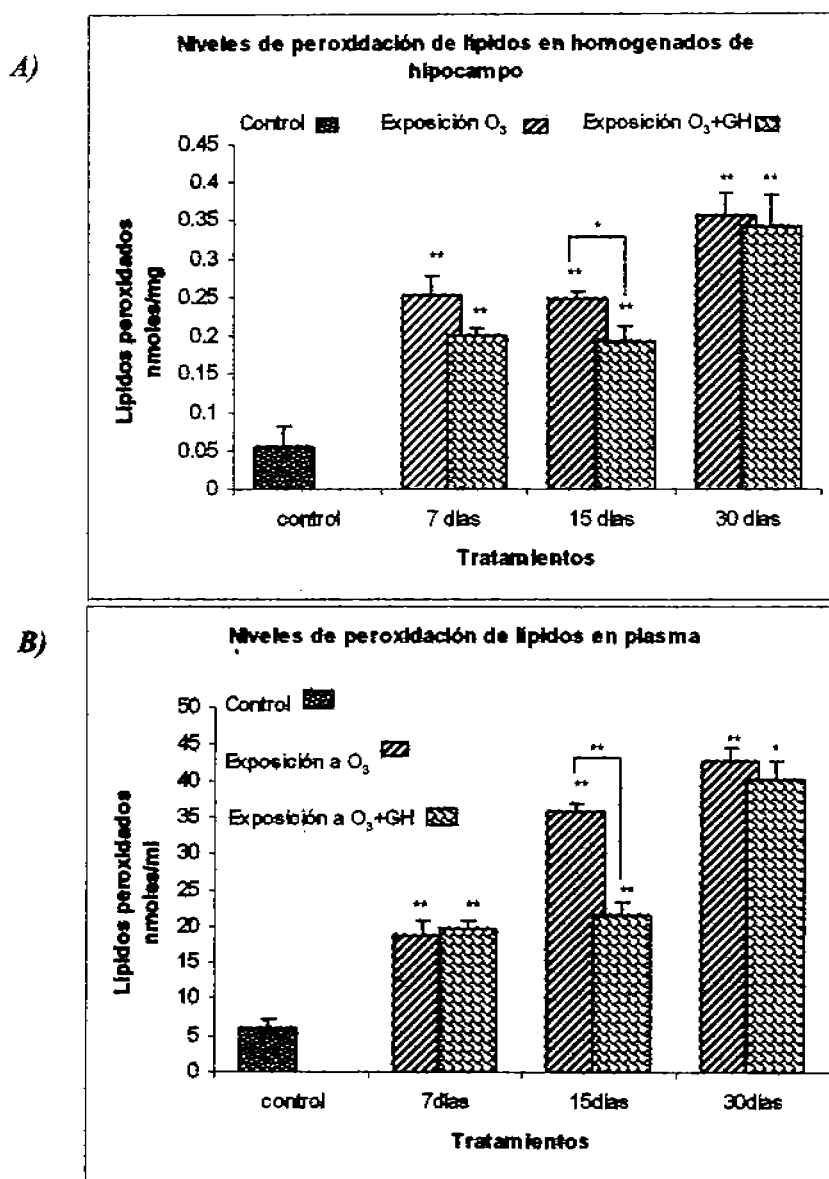


Figura 10 Efectos de la GH (0.08U) sobre los niveles de lípidos peroxidados en ratas expuestas a O₃ 0.25ppm crónicamente. En las abscisas se muestran en medias±e.e.m los niveles de lipoperóxidos, en el eje de las abscisas se encuentran las diferentes tiempos de tratamiento a O₃ solo y con GH. A) Se muestran los niveles de lipoperóxidos en los homogenados de hipocampo en los distintos tratamientos B) Se muestran los niveles de lipoperóxidos en plasma. *, $p < 0.05$ respecto al control y entre los grupos. **, $p < 0.001$ respecto al control y entre los grupos.

Modificaciones en la adquisición de memoria espacial, causadas por la exposición a ozono y el tratamiento con GH.

Se utilizó la prueba del laberinto acuático de Morris, para determinar los cambios en la adquisición de memoria espacial, en los diferentes tratamientos crónicos con O_3 a 0.25ppm y O_3 adicionado con GH. Al aplicarse una prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas, se rechazó la utilización de pruebas paramétricas y se utilizó la prueba de K-W para determinar la presencia de cambios en el conjunto del experimento y la prueba de M-W para determinar diferencias entre grupos. Como se muestra en la figura 11, los grupos tratados solo con O_3 mostraron una disminución constante en la latencia de retención, mientras que las ratas expuestas a los mismos tiempos de O_3 pero tratadas con 0.08U de GH, no mostraron esa disminución. En los grupos tratados solo con O_3 expuestos durante 15 y 30 días, se observa una diferencia significativa respecto al control con $p < 0.01$ y entre el grupo de 30 días tratado con O_3 y el tratado con $O_3 + GH$, se observó una diferencia de $p < 0.05$.

Figura 11

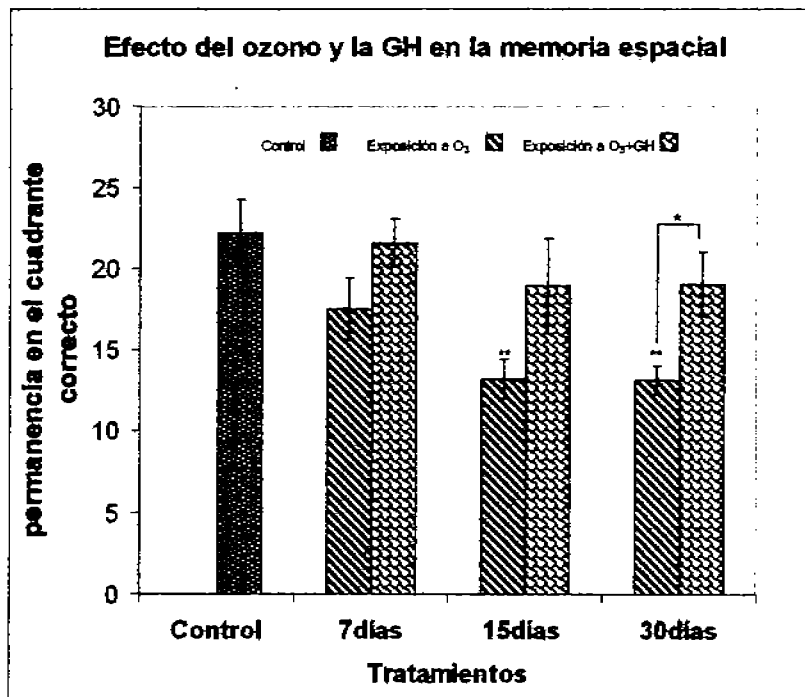


Figura 11. Efectos de la GH sobre la adquisición de memoria espacial en ratas expuestas a O_3 0.25ppm crónicamente. En las ordenadas se muestran en medias \pm e.e.m los tiempos de permanencia de las ratas en el cuadrante correcto (segundos dentro de un minuto). En el eje de las abscisas se encuentran las diferentes tiempos de tratamiento a O_3 solo y con GH. *, $p < 0.05$ respecto al control y entre los grupos. **, $p < 0.001$ respecto al control y entre los grupos.

Expresión de la COX-2 en el hipocampo, en ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono y expuestas a ozono con tratamiento de GH.

En las micrografías mostradas, se aprecia un claro aumento de la inmunoreactividad de COX-2, en los tratamientos con ozono a medida que progresa la exposición a este, con respecto al tratamiento control, en el que sin embargo aparecen zonas de tinción en todos las áreas del hipocampo. Sin embargo, esto lo podemos atribuir a una expresión basal de COX-2, que además puede observarse restringida a partes específicas de la célula, a la zona perinuclear y a la zona membranal. El aumento de la exposición a ozono, produce un cambio importante en la inmunoreactividad en todo el citoplasma e incluso con frecuencia se observa esta tinción extendida hacia las neuritas. Existen zonas del hipocampo, en las que vemos una muy baja expresión, particularmente en la capa granular del giro dentado, que se mantiene muy constante con todos los tratamientos. Por el contrario la capa polimórfica del giro dentado, que incluso en el control mantiene una importante expresión, se tiñe fuertemente en todos los tratamientos con ozono, aunque muestra una ligera disminución de tinción, en los tratamientos con GH. En la capa CA3 ocurren cambios importantes, ya que de una baja tinción en los grupos control, se observa un aumento muy grande en los grupos tratados con ozono, en los grupos tratados con ozono y GH, se observa una disminución respecto a los que solamente se expusieron a ozono, que sin embargo, no llega a ser similar a la de los controles. El conteo de células muestra un aumento significativo respecto al control en todos los tratamientos, mientras que a los 7 y a los quince días, el porcentaje de células inmunoreactivas en los tratamientos de ozono con GH, disminuye significativamente respecto a los tratamientos de exposición a ozono solo, a los treinta días, ya no se observa ninguna diferencia significativa en los porcentajes (figura 13 A).

En la capa CA2, se observa en el control una tenue tinción membranal, que se mantiene en todos los tratamientos, sin embargo esa tinción aumenta considerablemente durante todos los tratamientos de exposición a ozono, sin que la hormona de crecimiento tenga ninguna influencia sobre esta capa.

La capa CA1, es de entrada la que menos inmunoreactividad muestra en el grupo control, sin embargo, muestra una creciente tinción citoplasmática en los grupos tratados con ozono, en los que también se muestra una disminución consistente en los grupos tratados con GH, tanto en la intensidad y distribución de la tinción, como en el porcentaje de células inmunoreactivas a los siete y a los quince días, al mes de tratamiento, ya no se observa ninguna diferencia significativa en los porcentajes.

Figura 12 A

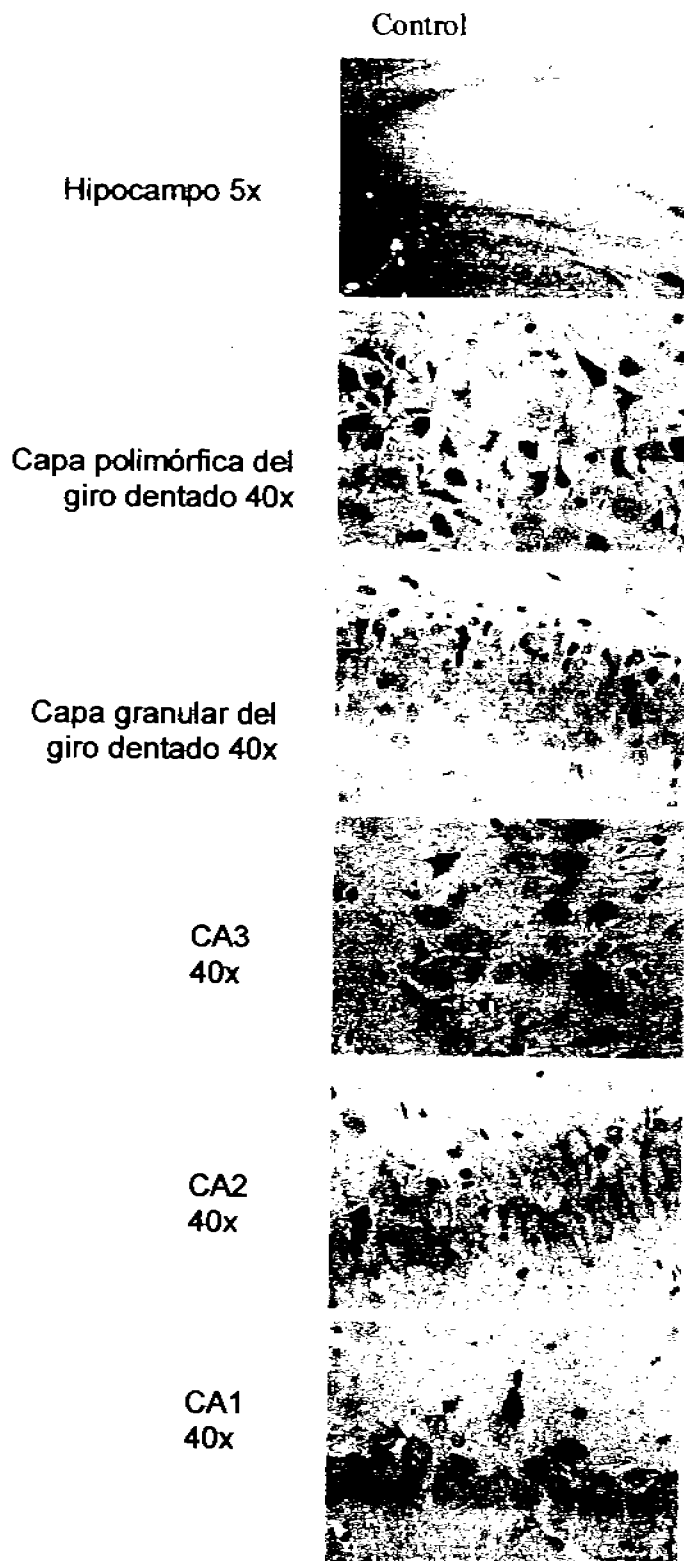


Figura 12 A, aquí se observa el patrón común de inmunoreactividad de la COX-2 en las distintas capas del hipocampo. Se puede observar, que comúnmente existe una baja pero constante expresión de COX-2, sobre todo en la zona citoplásmica y membranar de las células como indican las flechas.

Figura 12 B

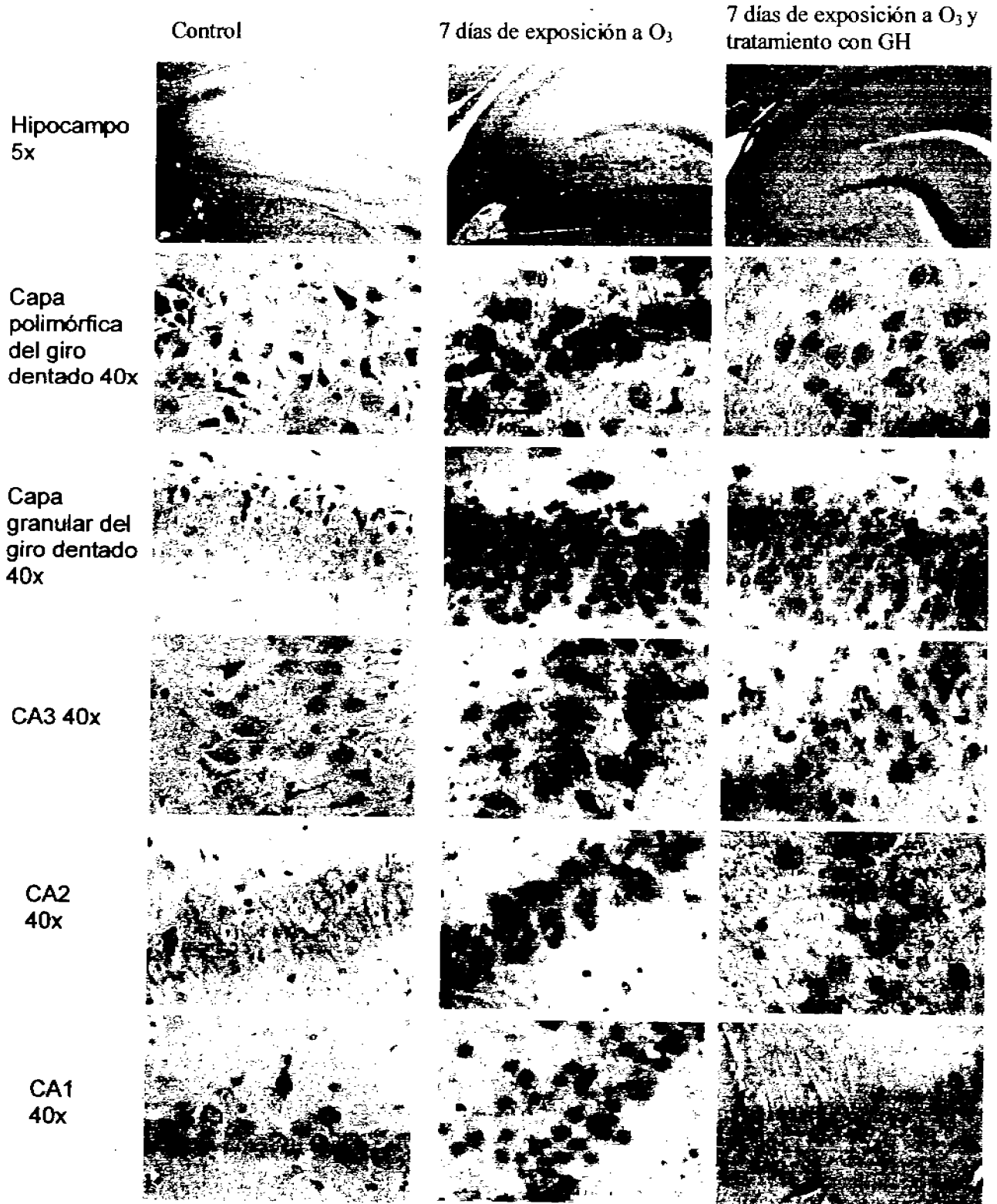


Figura 12 B, A los siete días de tratamiento con ozono, se observa un incremento de la inmunoreactividad de COX-2 en las distintas capas del hipocampo. En estas micrografías se pueden observar cambios en el patrón de inmunoreactividad celular, siendo la tinción más oscura y más distribuida tanto en membrana como en citoplasma y parte de la región perinuclear.

Figura 12 C
Control

15 días de exposición a O₃

15 días de exposición a O₃ y tratamiento con GH

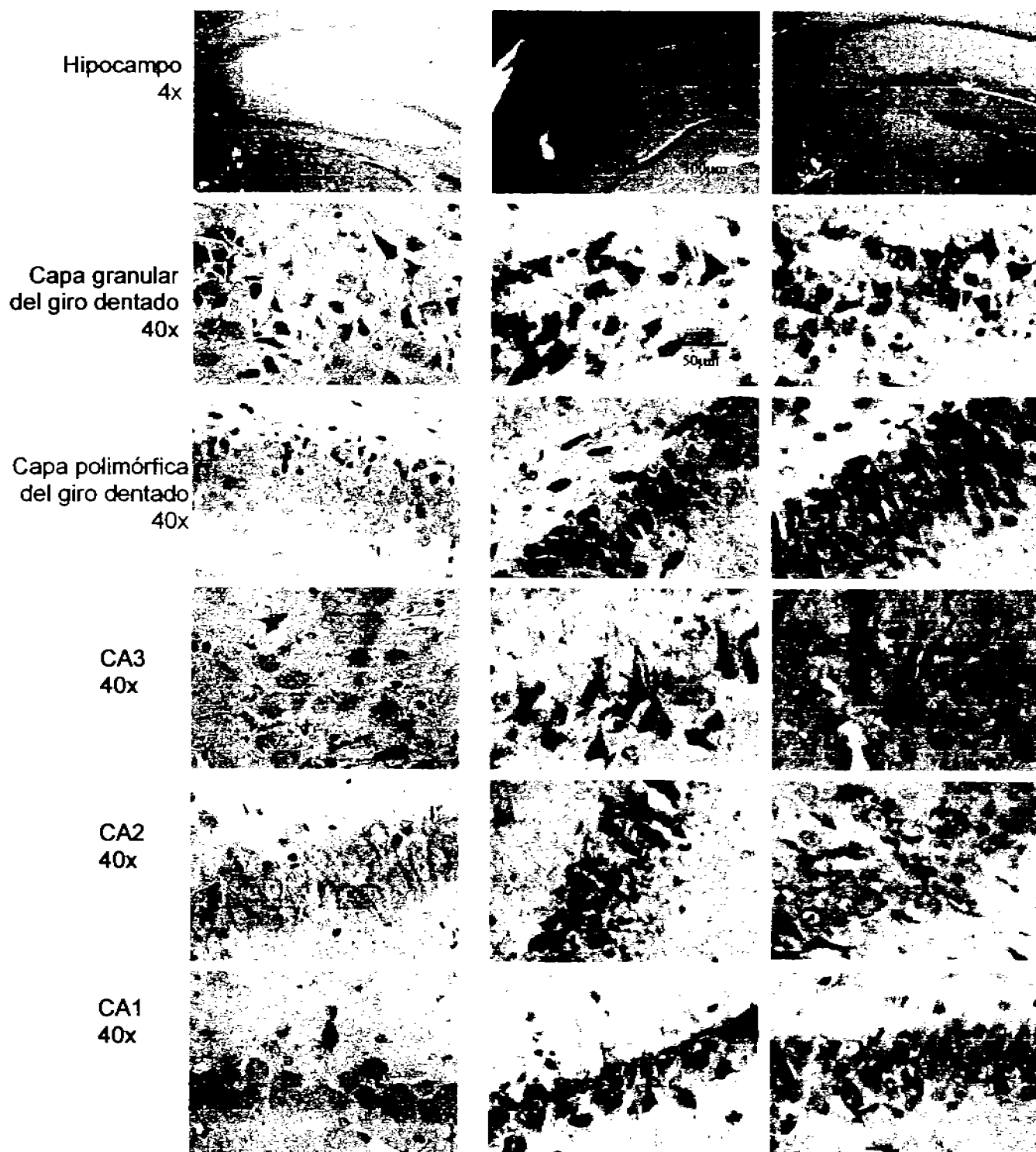


Figura 12 C, A los quince días de tratamiento con ozono, se mantiene el incremento de la inmunoreactividad de COX-2 en las distintas capas del hipocampo por el tratamiento con ozono, sin embargo, se observa una disminución en el número de células inmunoreactivas en los grupos tratados con GH. En las micrografías de 15 días, es en las que se observa una tinción más densa y más distribuida en la morfología celular.

Figura 12 D

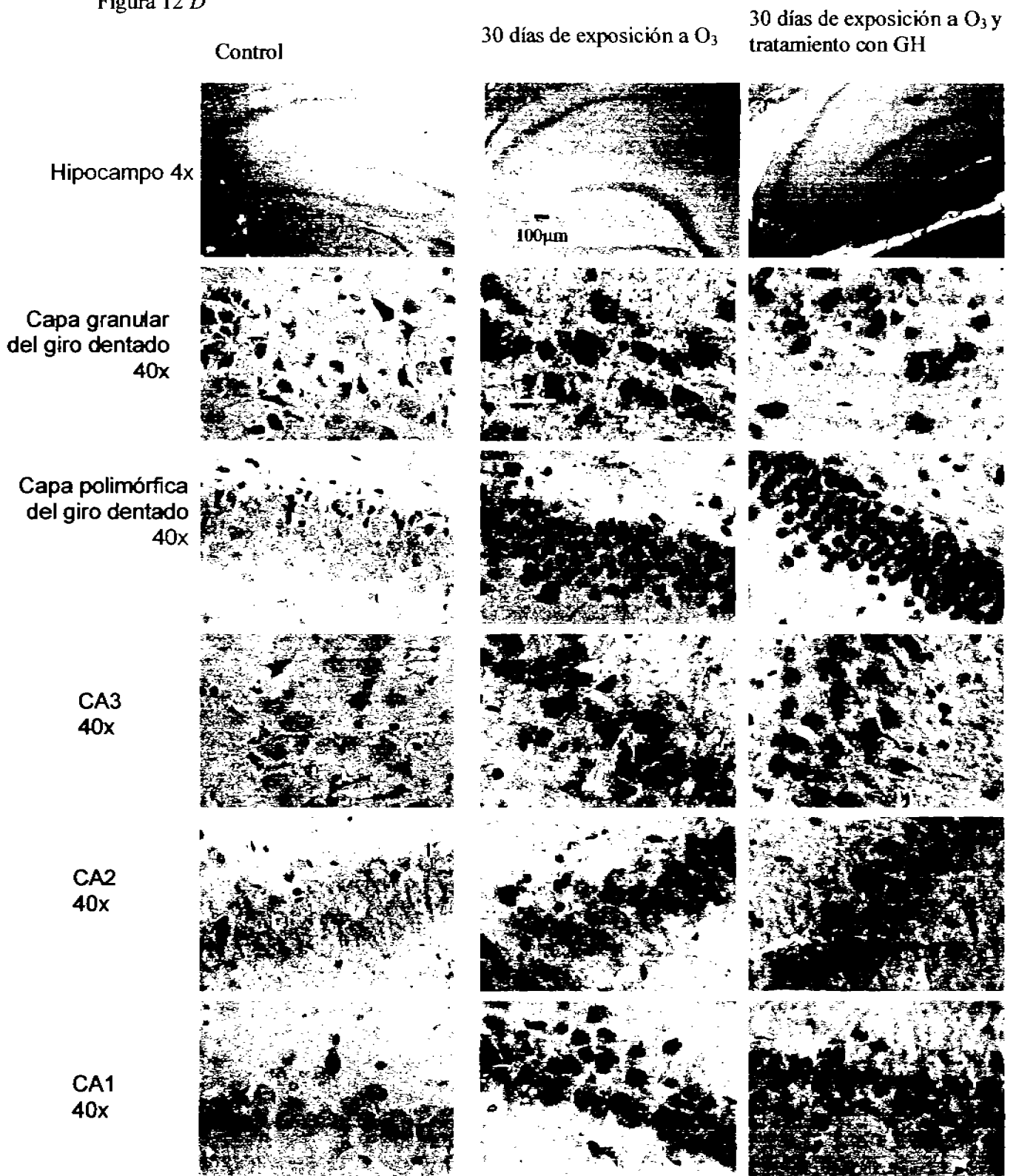
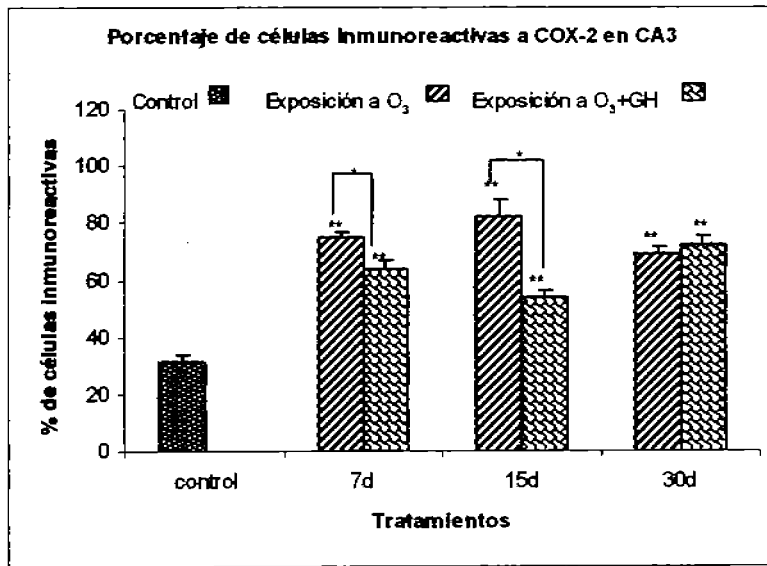


Figura 12 D. Se muestra el patrón de inmunoreactividad de las distintas capas del hipocampo a los treinta días de exposición a O₃. En este tratamiento ya no se muestran diferencias en el número de células inmunoreactivas entre las ratas tratadas sólo con O₃ y las ratas con O₃ y GH.

Figura 13 A)



B)

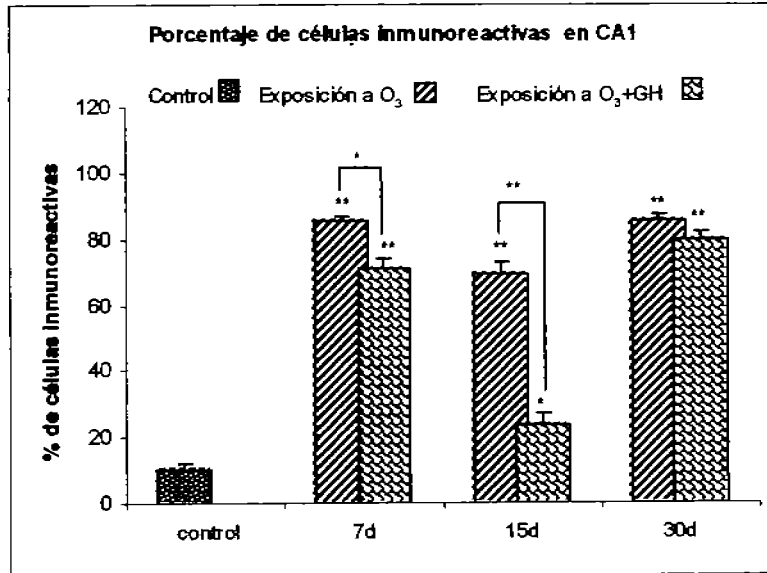
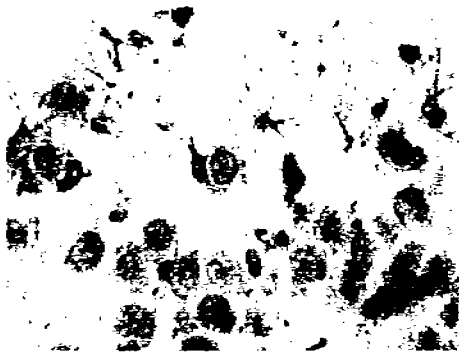


Figura 13. Efectos de la GH sobre los porcentajes de células inmunoreactivas a COX-2 en el hipocampo de ratas expuestas a O₃ 0.25ppm crónicamente. En las ordenadas se muestran en medias±e.e.m los porcentajes de células inmunoreactivas. En el eje de las abscisas se encuentran las diferentes tiempos de tratamiento a O₃ solo y con GH. * $p < 0.05$ respecto al control y entre los grupos. ** $p < 0.001$ respecto al control y entre los grupos.

Expresión de COX-2 sólo en neuronas?

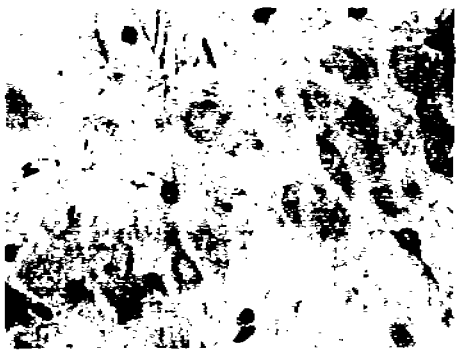
Figura 14. Doble tinción, COX-2 (café), GFAP (rojo),



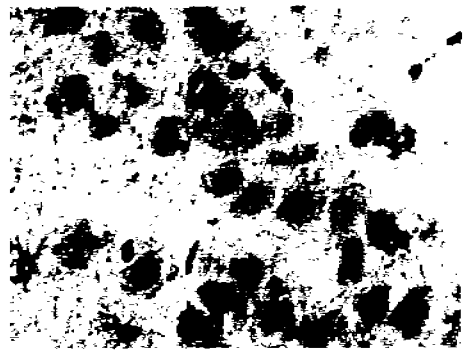
Capa polimórfica del GD 40x



CA1 40x



CA2 40x



CA3 40x

En la figura 14, se muestra la inmunotinción a los siete días de exposición a ozono, de COX-2 y GFAP. Este experimento, tuvo por objeto, mostrar si en nuestro modelo experimental, la expresión de COX-2, se restringía básicamente a neuronas, en este caso tiñendo los astrocitos de rojo. No encontramos que en los somas de astrocitos se presente inmunotinción de COX-2, por lo tanto podemos inferir que la inmunoreactividad a COX-2, se presenta principalmente en neuronas.

Conteo y observación de neuronas, utilizando la técnica de Kluver-Barrera

Con estos experimentos, se encontró una disminución significativa de neuronas en casi todos los tratamientos con ozono y GH respecto al control, en las áreas CA3 y CA1. Únicamente encontramos una recuperación del número de neuronas en el tratamiento de exposición a O₃ de 30 con GH en la capa CA1. A la par, también observamos modificaciones en la morfología celular, observamos una edematización a los 7 días de tratamiento con ozono, y a partir de los quince días comenzamos a observar neuronas con modificaciones citoplásmicas que indican modificaciones fisiológicas como consecuencia del estrés oxidativo.

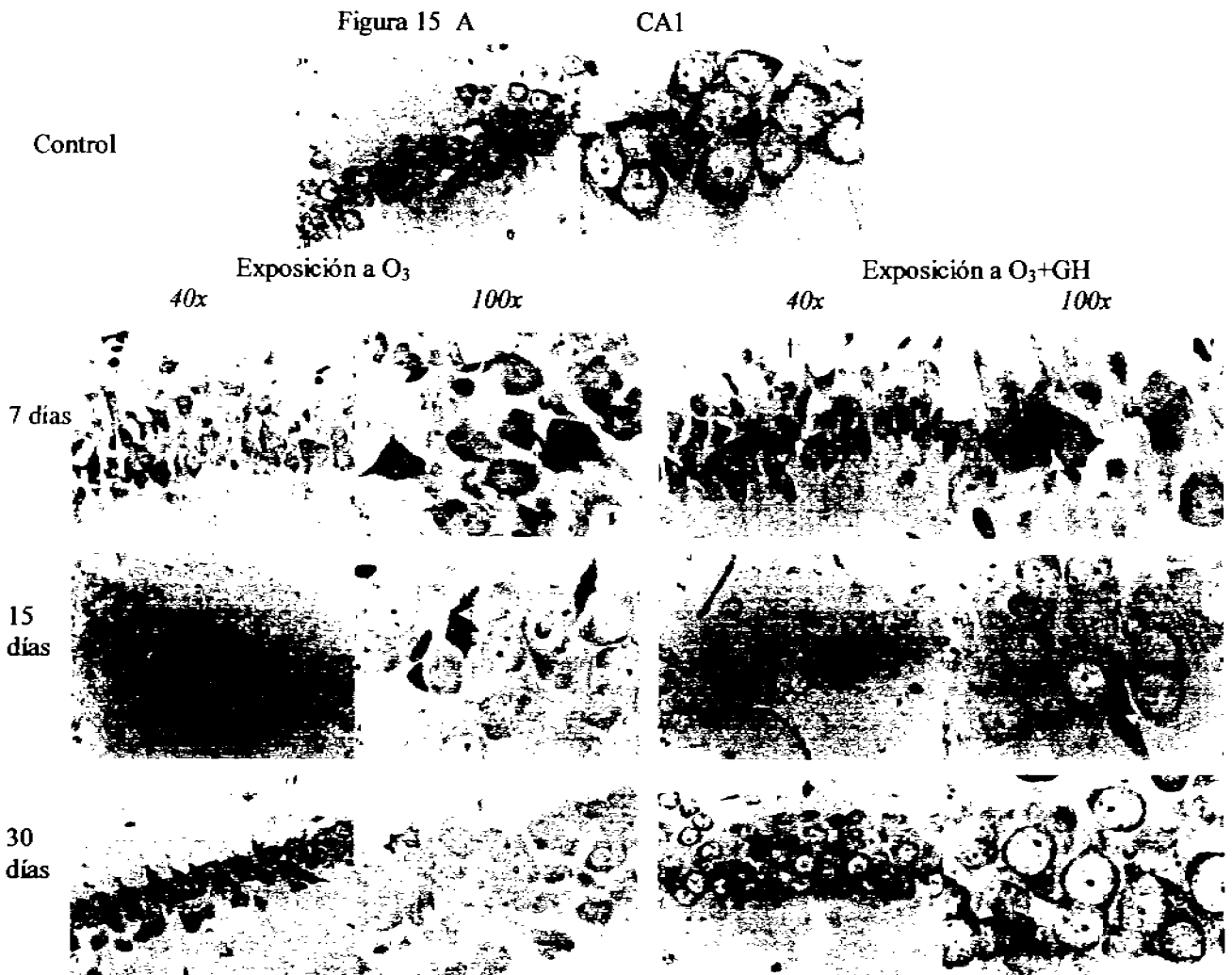


Figura 15 A. Micrografías de neuronas de la capa CA1 del hipocampo, teñidas con la técnica de Kluver-Barrera, por lo que se observa con claridad la morfología citoplásmica del soma neuronal. Las flechas indican algunas modificaciones observadas con este método.

Figura 15B

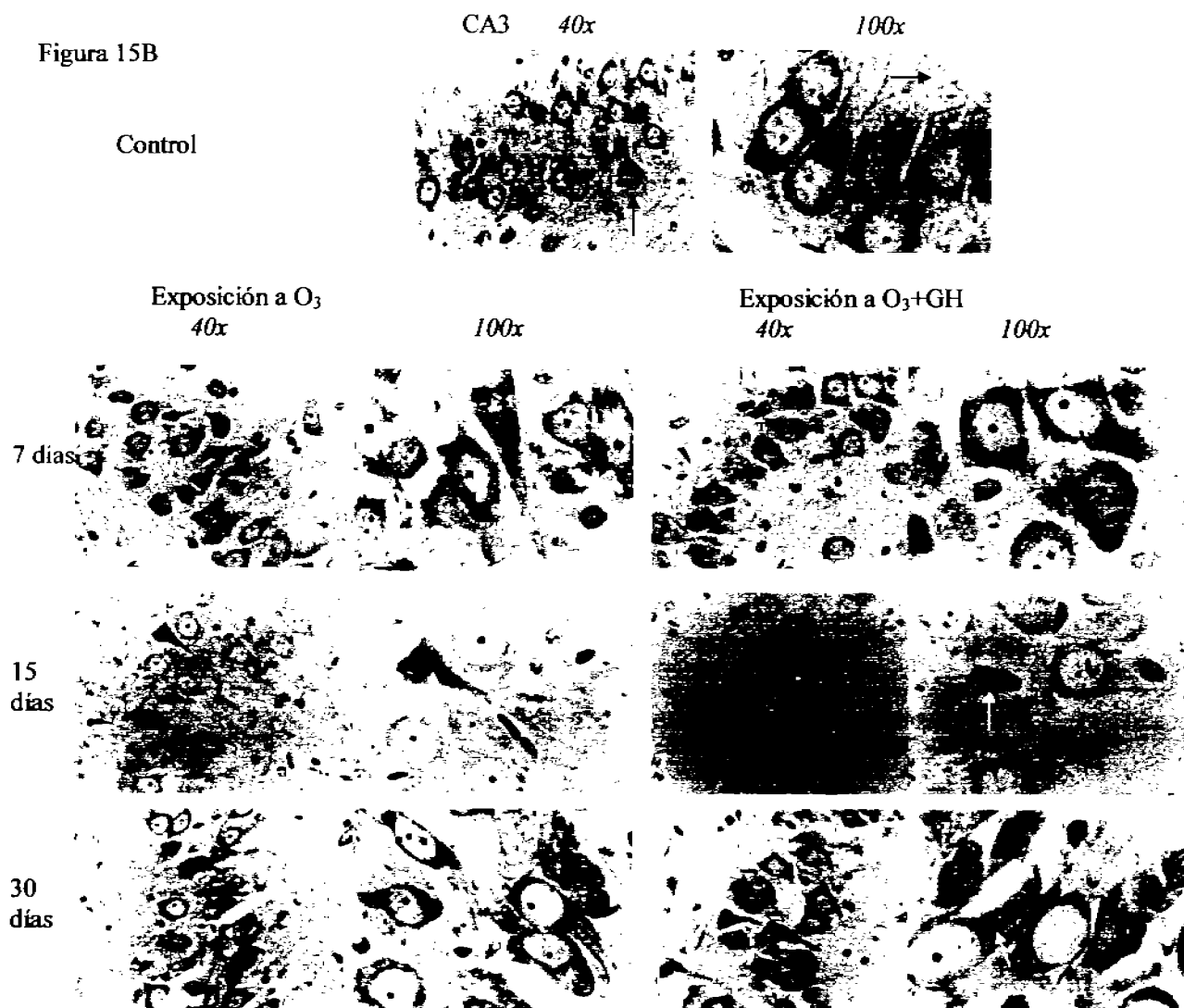


Figura 15 B. Micrografías de neuronas de la capa CA3 del hipocampo y algunas fibras colaterales de Schaffer indicadas con flechas oscuras (morado son cuerpos celulares, azul son fibras mielinizadas), teñidas con la técnica de Kluver-Barrera. Las flechas indican algunas modificaciones morfológicas observadas con este método en los tratamientos con O₃ y O₃ con GH.

Los resultados de los conteos, mostraron un decremento significativo en el número de neuronas en los tratamientos con ozono. En la capa CA3 (fig 16A) este decremento es significativo a los quince días de exposición a ozono, sin embargo con el tratamiento con GH estos niveles se mantienen y se presenta una diferencia significativa entre los dos grupos de quince días. El grupo expuesto a ozono durante treinta días, mostró una disminución significativa en el número de neuronas mientras que el grupo de treinta días tratado con GH, no mostró ninguna disminución, entre los grupos de treinta días, no encontramos diferencia significativa.

Figura 16 A)

B)

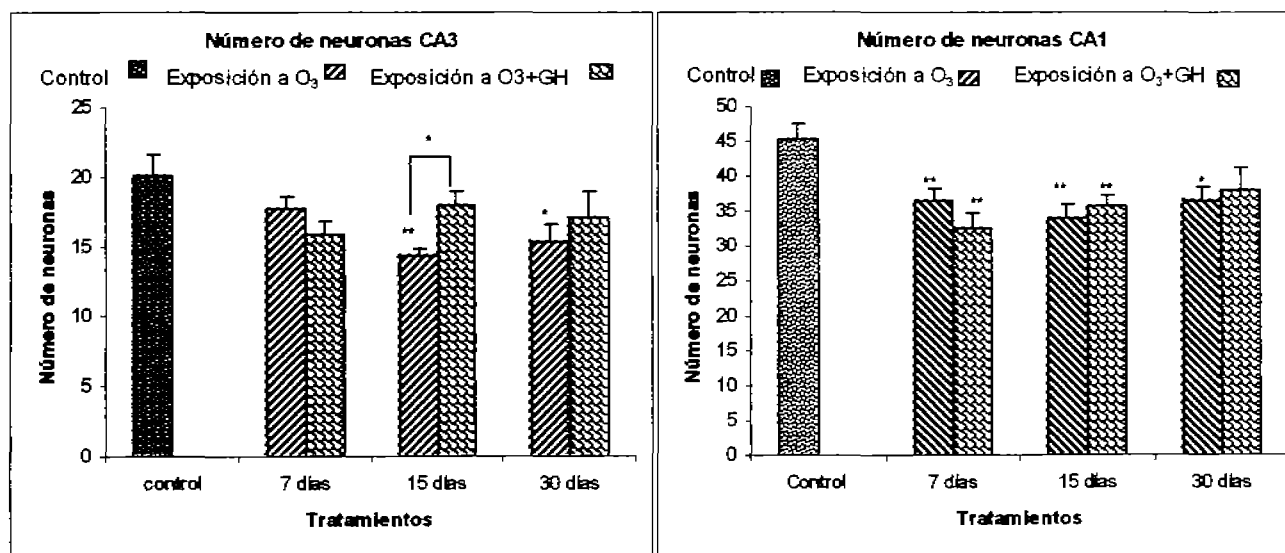


Figura 16. Efectos de la GH sobre el número de neuronas en ratas expuestas a O₃ 0.25ppm crónicamente. En el eje de las ordenadas se muestran en medias±e.e.m los números de neuronas por campo de 30,000μ². En el eje de las abscisas se encuentran las diferentes tiempos de tratamiento a O₃ solo y con GH. *, p<0.05 respecto al control y entre los grupos. **, p<0.001 respecto al control y entre los grupos.

Inmunohistoquímica de iNOS

La inmunohistoquímica, mostró un incremento notable en la inmunoreactividad de iNOS en los distintos tratamientos con ozono, mostró cambios morfológicos en las células inmunoreactivas, las cuales se mostraron edematizadas en los tratamientos de 7 días de ozono y a partir de los quince días, empezamos a observar células inmunoreactivas con cambios morfológicos sustanciales que sugieren muerte necrótica o apoptótica.

Figura 17 A

CA1

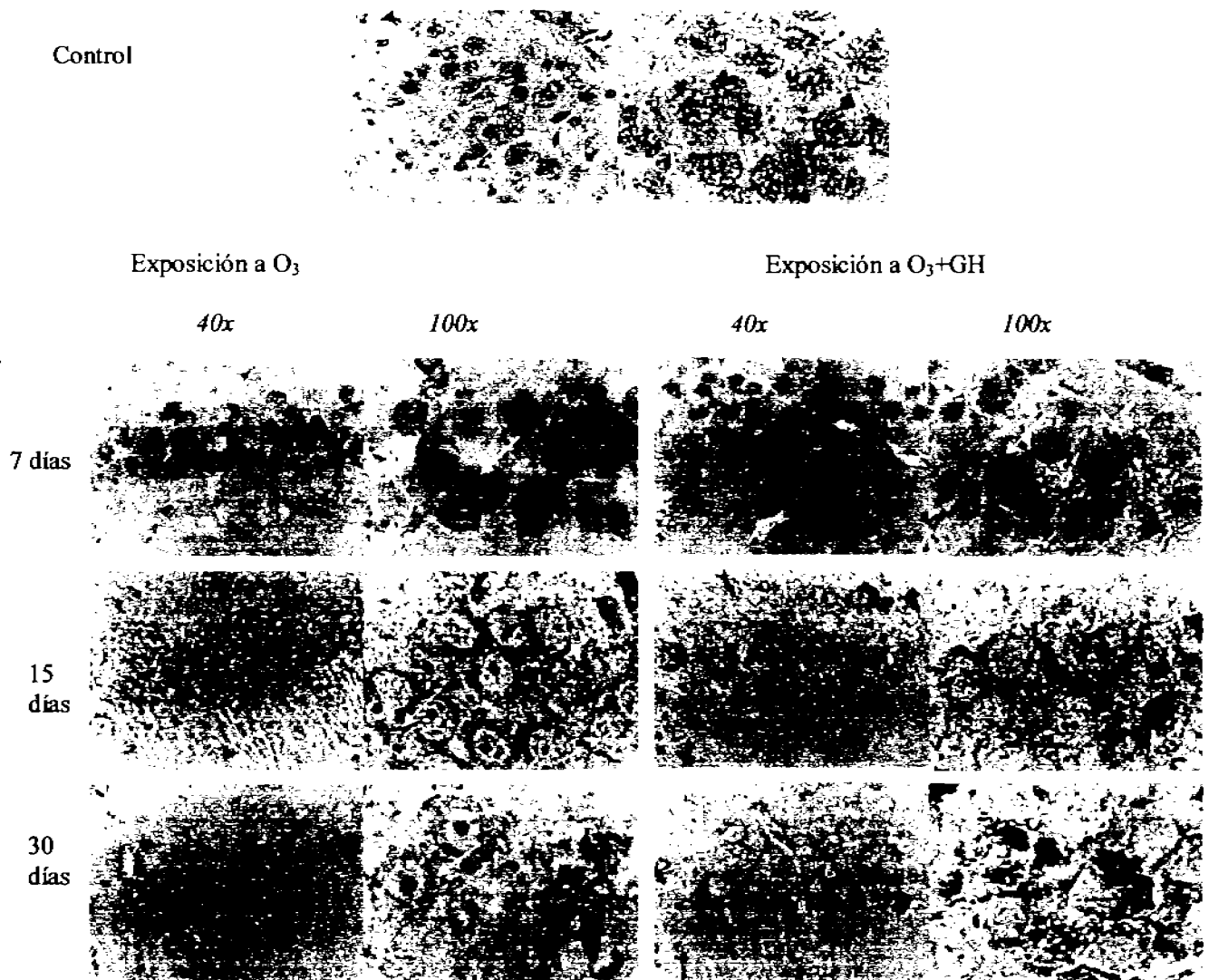


Figura 17A. La capa CA1 del hipocampo, muestra una sustancial inmunoreactividad a iNOS inducida por exposición a ozono, sin observarse diferencias entre los tratamientos de O₃ solo y los tratamientos con O₃+GH. La inmunoreactividad se observa en las zonas citoplásmicas de las células de todos los tratamientos (flechas claras) y se observan algunas células con fuertes modificaciones citoplásmicas y una inmunoreactividad superior a la del resto (flechas oscuras)

CA3

Figura 17 B)

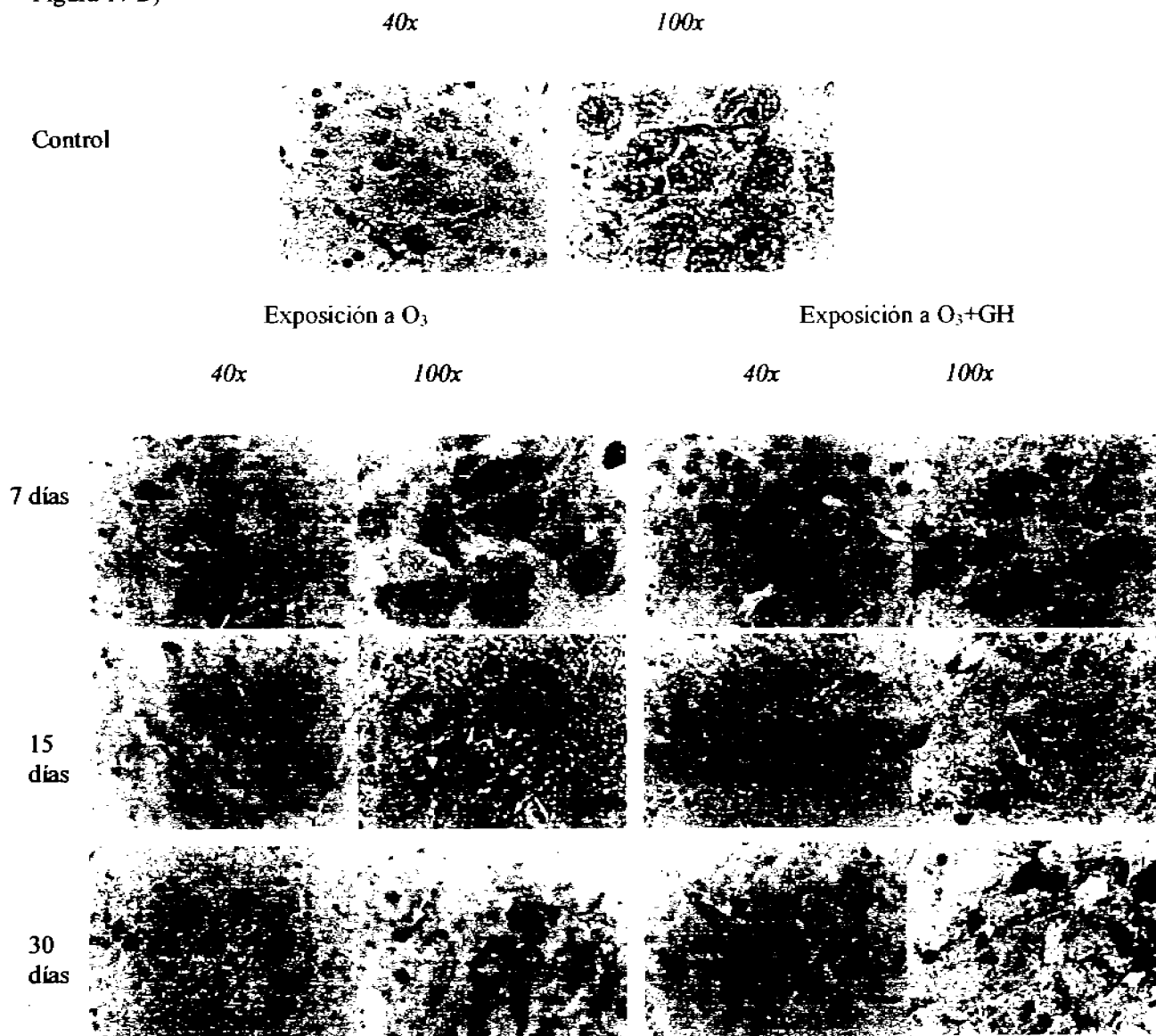
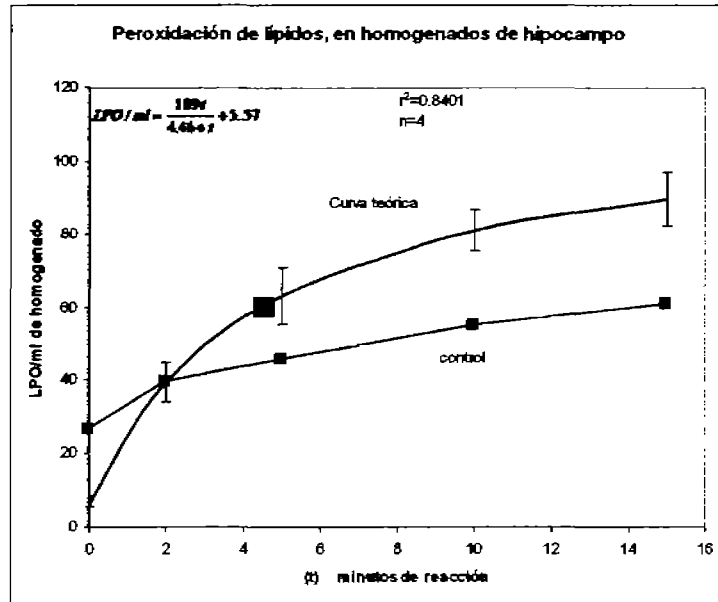


Figura 17B. La capa CA3 del hipocampo, muestra un incremento de inmunoreactividad a iNOS en los tratamientos expuestos a O_3 , aquí tampoco se observan diferencias entre los tratamientos de O_3 solo y los tratamientos con O_3+GH . La inmunoreactividad se observa en las zonas citoplásmicas de las células de todos los tratamientos (flechas claras) y se observan algunas células con fuertes modificaciones citoplásmicas y una inmunoreactividad superior a la del resto (flechas oscuras).

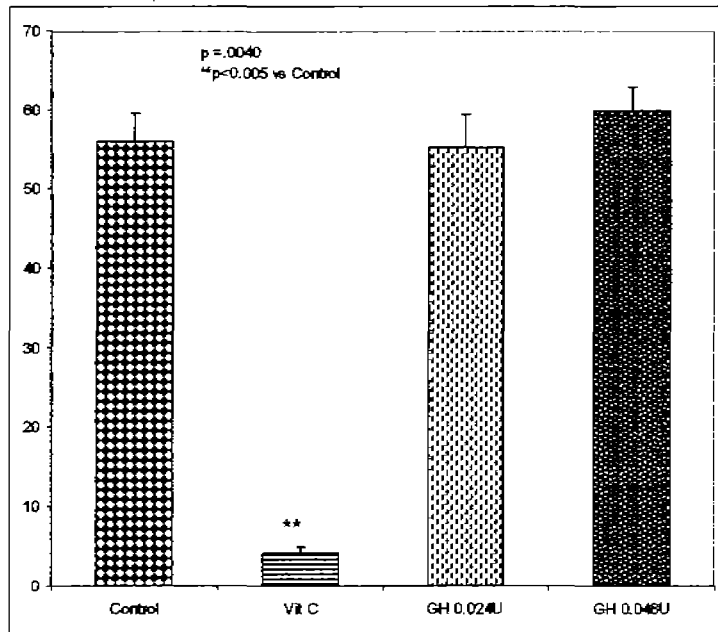
Prueba para determinar si la molécula de GH, muestra actividad antioxidante en un sistema in vitro.

Con el fin de determinar si los efectos antioxidantes observados se debían a una característica química de la GH, o si por el contrario son efecto de su actividad endócrina, se realizó el siguiente experimento. La curva de oxidación del medio se analizó utilizando un análisis de regresión para hipérbolas, en el cual se encontró la ecuación $LPO/ml = \frac{109t}{4.46+t} + 5.57$ donde t es el tiempo transcurrido en minutos, 109 será el nivel de saturación de lípidos peroxidados y 4.46 es aproximadamente el tiempo en el que la mitad de la saturación es conseguida, 5.57 es el nivel inicial de lipoperóxidos. Para esta curva se obtuvo $r^2=0.84$ (Figura 18A). A partir de esta ecuación se determinó utilizar 4.5 minutos de oxidación para medir el efecto de diferentes concentraciones de GH, ya que es el tiempo en que se llega a la mitad de la saturación de peroxidación del medio. Utilizando este tiempo se tomaron mediciones utilizando 0.024U de GH, 0.048U de GH, 150 μ moles ácido ascórbico y control. Únicamente se encontraron diferencias significativas a $p<0.05$ respecto al control con el tratamiento con ácido ascórbico (Figura 18 B). Esto implica que la GH no tiene efectos antioxidantes directos neutralizando radicales libres, como sí lo hace el ácido ascórbico. Esto significa que un efecto antioxidante *in vivo* de la GH, se debe a algún efecto mediado por su receptor.

18 A)



18 B)



En la figura 18 se muestran los resultados de la prueba de efecto antioxidante in vitro de la GH. A) La curva de oxidación teórica obtenida mediante regresión hiperbólica, donde la línea representa la función obtenida \pm e.e.m. Tras el resultado de esta gráfica, se decidió utilizar 4.46 minutos. B) Utilizando ese tiempo, se procedió a realizar pruebas con dos concentraciones distintas de GH, y ácido ascórbico. **, $p < 0.01$, respecto al control.

Discusión

La exposición a ozono, es un modelo no invasivo de estrés oxidativo el cuál se puede aplicar durante periodos largos de tiempo para causar un desequilibrio redox, con este modelo es posible estudiar los efectos crónicos a largo plazo causados por el aumento de las ROS y así producir una neurodegeneración progresiva. Con el modelo de ozono, también se pueden estudiar los efectos que diversos antioxidantes pueden presentar sobre el proceso de muerte celular.

El experimento agudo de dosis respuesta a GH, fue realizado con el objetivo de encontrar una dosis adecuada para ser utilizada en los experimentos crónicos. En este experimento se expusieron los animales a una dosis alta de ozono para producir estrés oxidativo y se inyectaron diferentes dosis de GH (0.02U, 0.04U, 0.08U, 0.16U) para determinar el mayor efecto antioxidante. La GH no mostró un efecto antioxidante en todas las dosis, como podría esperarse del tocoferol y la vitamina C. La dosis de 0.08 U de GH (esta dosis es equivalente 26µg, los niveles circulantes en machos alrededor de las 16 horas, se encuentran cerca de 7ng/ml (Chacon y col., 2005)) fue la más efectiva porque mostró una disminución significativa en los niveles de lipoperóxidos en los homogenizados de hipocampo y no mostró diferencias significativas con el control sin exposición a O₃. La siguiente dosis utilizada, 0.16 U, mostró un efecto levemente menor (Figura 9A). En el experimento llevado a cabo con plasma, la dosis antioxidante más efectiva fue 0.04U de GH (Figura 9B). Esta diferencia puede deberse a que distintos tejidos blanco tienen una respuesta diferencial a la GH ya que no existe una distribución uniforme de los receptores para esta hormona y estos pueden desencadenar vías de transducción diferentes en cada zona. Por lo expuesto anteriormente, decidimos escoger la dosis de 0.08U porque el objetivo de estudio de este trabajo es el posible efecto protector de la GH en el hipocampo con daño oxidativo, causado por la exposición de los animales a O₃.

Los resultados de nuestros experimentos coinciden con resultados previos (Dorado-Martinez y col., 2001; Nino-Cabrera y col., 2002), la exposición crónica a bajas dosis de O₃ produjo un aumento en la cantidad de lípidos peroxidados encontrados en el homogenizado de tejido hipocampal (10 A). Todos los grupos que fueron expuestos a ozono, mostraron un

incremento significativo de lipoperóxidos respecto al control que no recibió tratamiento. La diferencia al comparar los resultados del grupo de siete días en comparación con el grupo de quince días no es significativa, esto puede relacionarse con la primera respuesta de sistemas oxidantes al estrés oxidativo, dentro de esta respuesta se puede encontrar un incremento en la expresión de la SOD-1 y de la GPx. Sin embargo, hacia el mes de exposición a ozono, los niveles de lipoperóxidos son más elevados que en los grupos anteriores. Este fenómeno indica que el daño oxidativo es acumulativo y las señales inflamatorias por consiguiente, se expresan en mayores cantidades a lo largo del tiempo. Incluso, cuando las especies reactivas sobrepasan la capacidad detoxificadora de las defensas antioxidantes enzimáticas, estas contribuyen con la producción de especies reactivas, por ejemplo, la SOD-1 comienza a producir O_2^- . La COX-2, por ejemplo, al ser oxidada por el ataque del peroxinitrito, incrementa varias veces su velocidad de reacción y esta enzima, es una productora importante de especies reactivas (Yasojima y col., 2001).

Al tratar las ratas expuestas a ozono diariamente con 0.08U de GH, encontramos una disminución significativa de lipoperóxidos a los quince días, respecto a las ratas que no fueron tratadas con GH (Figura 10A). Sin embargo, esta respuesta no es significativa para los otros grupos estudiados, esto podría explicarse ya que muchas hormonas tienen respuestas variables según las dosis y los tiempos de tratamiento lo cual depende de los cambios en sus receptores y en sus sistemas de transducción. En el caso de la GH, la complicación es mayor, ya que no estamos hablando de la respuesta a una sola hormona, sino que estamos hablando de la respuesta a tres mensajeros neuroquímicos (GH, IGF-I e IGF-II) cuya interacción, no está del todo entendida; una de las cuestiones que no ha sido aclarada, es su influencia conjunta sobre el tejido hipocampal, el cual tiene receptores para los tres factores (Schneider y col., 2003). Más concretamente, podemos discutir que la GH puede tener efecto sobre la expresión de sistemas antioxidantes, como lo serían el de la SOD-1 y el de GPx; por ejemplo, recientemente se ha mostrado que la administración de GH a ratas de edad avanzada, promueve la formación de glutatión reducido en el cerebro (Donahue y col., 2005). También es factible que la GH, al aumentar la tasa metabólica y la movilización de lípidos en los tejidos, pueda favorecer el recambio y la destrucción de lípidos y otros componentes celulares dañados por oxidación. Finalmente, tanto la GH como el IGF-I y el IGF-II pueden participar como mediadores de la inflamación, ya que utilizan las mismas vías de transducción que

señales inflamatorias importantes, como las interleucinas (Zhu *y col.*, 2001; Denko y Malemud, 2005; Han *y col.*, 2005).

El estudio de retención de memoria espacial, nos mostró que ésta se ve deteriorada con el transcurso del tiempo de exposición a O₃. El mayor daño, se mostró al mes de tratamiento crónico (Figura 11 A). Esto se correlaciona directamente con el mayor aumento de los lípidos peroxidados al mes de exposición a ozono, lo que indica que ante mayor estrés oxidativo, mayor es el daño funcional en la plasticidad del hipocampo. En experimentos anteriores, se demostró el deterioro de la memoria en ratas expuestas a ozono y se observó la existencia de un daño tisular en la capa CA1 del hipocampo (Avila-Costa *y col.*, 1999; Rivas-Arancibia *y col.*, 2000). Si consideramos que esta capa y CA3 son las más activas en la formación de mapas cognoscitivos espaciales, entonces es posible que este déficit en memoria se deba a que estas zonas están afectadas por el daño oxidativo. Al mes de tratamiento con GH, se mostró un efecto protector sobre la memoria espacial a los treinta días, esto puede explicarse ya que la GH tiene efectos positivos sobre la adquisición de memoria, esto se ha observado también en humanos y se piensa que se debe a un mejoramiento de la neurotransmisión mediante aspartato (Schneider *y col.*, 2003; Le Greves *y col.*, 2005).

Las capas CA1 y CA3 del hipocampo, que son las que se ven más afectadas por estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas, también expresan mediadores inflamatorios como la iNOS y la COX-2. Esta última, es una enzima que responde al daño oxidativo, incrementándolo considerablemente y comenzando la liberación de prostaglandinas. Existen estudios previos, que muestran que la COX-2 se expresa en presencia de casi cualquier tipo de estrés oxidativo; sin embargo, no existían datos previos de su expresión en respuesta a la exposición a ozono, más que en pulmón (Valacchi *y col.*, 2004). Nuestros resultados muestran que el ozono promueve la expresión de COX-2 en el hipocampo principalmente en las capas CA1 y CA3, las cuales son las zonas más sensibles al estrés oxidativo y que presentan mayor daño en las enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, también se observa un aumento de expresión de COX-2 en las capas granular y polimórfica del giro dentado y en la capa CA2 (Figura 12 A-D). El conteo de células que expresan consistentemente COX-2, mostró un aumento en las capas CA1 y CA3 a partir de los siete días de exposición a O₃. Sin embargo, con el tratamiento con GH se observa una reducción en la expresión de COX-2 a los siete días y una mayor a los quince días, mientras que a los 30 días ya no se observa este efecto (Figura

13 A y B). Esta mediación puede ser consecuencia de la disminución transitoria del estrés oxidativo, observada a los quince días de tratamiento con GH en los lípidos peroxidados, o puede deberse a un efecto directo de la transducción de señales de la GH. Ahora bien, la disminución de COX-2 en ratas expuestas a ozono tratadas con GH puede deberse a una modulación de la respuesta inflamatoria del hipocampo inducida por el oxidante. Como habíamos mencionado, existe una relación muy importante entre la expresión de COX-2 y de iNOS, ambas enzimas son inducibles tanto por estrés oxidativo como por inflamación, además de que se inducen mutuamente al generar especies reactivas y señales inflamatorias. Por esto decidimos observar el efecto de la exposición a O₃ y el tratamiento con GH sobre la expresión de iNOS en el hipocampo (Figura 17). Dicha enzima se expresa de forma muy sensible a los cambios en el equilibrio oxido reducción y observamos una expresión creciente de iNOS a partir de los siete días de exposición a ozono en las capas CA1 y CA3, que además se relacionan con cambios morfológicos celulares como la presencia de edema, que ya había sido observada previamente en los cerebros de ratas expuestas a O₃ (Rivas-Arancibia y col., 2003). En este caso no observamos una disminución de la expresión de iNOS en ratas tratadas con GH, esto puede deberse a que la iNOS es más sensible al estrés oxidativo que la COX-2, o puede deberse a que la GH no afecta directamente su expresión mediante su sistema de transducción de señales.

Para corroborar el efecto de la exposición a ozono y del tratamiento con GH, realizamos un conteo específico de neuronas utilizando la técnica de Kluver-Barrera (que marca exclusivamente neuronas (Kluver y Barrera, 1953)) ya que las células que expresan COX-2 en el hipocampo, son exclusivamente neuronas (Figura 14). Con este método observamos que los animales expuestos a ozono presentan en la capa CA3 una disminución gradual de neuronas que se muestra significativa a los quince y a los treinta días. Por el contrario los grupos tratados con GH tanto a los quince como a los treinta días no mostraron disminución significativa respecto al control (Figura 16 A). En la capa CA1, observamos una disminución significativa de neuronas en todos los grupos, menos en el grupo tratado con GH durante treinta días (16 B). Estos resultados muestran que el tratamiento con ozono provoca una disminución en el número de neuronas, que puede deberse a una muerte celular. En CA3, la GH parece estar previniendo la muerte neuronal, esto puede deberse a sus efectos anabólicos, antiapoptóticos (Frago y col., 2002) y probablemente antioxidantes (Donahue y

col., 2005) como se observa en este trabajo a los 15 días de exposición a ozono. En la capa CA1, la recuperación observada únicamente a los treinta días, puede deberse a algún efecto migratorio. Especialmente en la capa CA3, se observa una correlación con el efecto inflamatorio y apoptótico de las prostaglandinas. La protección del número de neuronas, puede correlacionarse con la disminución de COX-2 en las ratas expuestas a ozono y tratadas con GH. A los treinta días, la protección sobre las neuronas ejercida por GH, se encuentra relacionada con el mantenimiento de la adquisición de memoria, observada en ese mismo tratamiento (Figura 11).

En los experimentos descritos, se puede observar a los quince días, un efecto antioxidante de la GH. Sin embargo, no es claro cual puede ser el mecanismo. Por esa razón utilizamos un sistema *in vitro* con el fin de descartar que la propia molécula, pudiera ser antioxidante intrínsecamente. Los resultados muestran que la molécula no es antioxidante *in vitro*, por lo cual su efecto antioxidante debe ser considerado sólo a partir de su actividad endócrina (Fig 18).

En este trabajo, observamos las relaciones entre el efecto protector de las funciones cognitivas de la GH en el modelo de estrés oxidativo por ozono, y su posible relación con la COX-2. Los resultados obtenidos indican que la GH puede ser un agente protector del daño oxidativo, lo que no sólo se observa en problemas de exposición a agentes oxidantes exógenos, sino también al estado de oxidación que se expresa en los animales con el incremento de la edad. Sin embargo, la GH es una hormona cuyo receptor puede actuar mediante distintas vías de transducción y en cada tejido pueden tener diferentes respuestas.

La COX-2, por el contrario, es conocida por responder al daño oxidativo generando especies reactivas y provocando inflamación. Esto se observa claramente en las enfermedades neurodegenerativas, donde la COX-2 parece tener un importante papel oxidante, inflamatorio y apoptótico. Sin embargo, la COX-2 en un estado de desbalance redox, tiene funciones en la facilitación de la memoria, en la modulación del sueño y probables funciones neuroprotectivas.

La meta de este trabajo fue buscar las posibles relaciones entre ambos sistemas durante el estrés oxidativo inducido por O₃ y nuestros resultados apuntan a que sí existe una relación, a pesar de que su mecanismo molecular y fisiológico celular no sea del todo claro. Sin embargo,

este trabajo, otorga un punto de partida para posteriores experimentos, enfocados a la dilucidación específica de los mecanismos finos de esta relación.

Conclusiones

- Aunque se observó un efecto antioxidante de la GH en el hipocampo a 0.08U a los quince días de exposición a ozono.
- La COX-2 es una enzima que se expresa en el hipocampo como resultado de la exposición a estrés oxidativo por ozono. Dicha expresión, se observa en todos los grupos expuestos a ozono y en todas las áreas del hipocampo, principalmente en CA3 y CA1, que a su vez son las áreas que se ven más afectadas en las enfermedades neurodegenerativas.
- La GH disminuye la expresión de COX-2 en el hipocampo de ratas expuestas a ozono a los quince días de tratamiento, indicando un efecto protector sobre dicha zona del cerebro.
- Los animales expuestos a O₃ presentan una alteración en la memoria espacial mediada por el hipocampo. El tratamiento con GH es capaz de prevenir este daño a los treinta días de exposición a O₃.

Bibliografía

- 1.- Abu-Soud, H.M., Wang, J., Rousseau, D.L., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J. y Stuehr, D.J. (1995). "Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis." J Biol Chem **270**(39): 22997-3006.
- 2.- Ajmone-Cat, M.A., De Simone, R., Nicolini, A. y Minghetti, L. (2003). "Effects of phosphatidylserine on p38 mitogen activated protein kinase, cyclic AMP responding element binding protein and nuclear factor-kappaB activation in resting and activated microglial cells." J Neurochem **84**(2): 413-6.
- 3.- Alvarez, X.A. y Cacabelos, R. (1990). "Effects of GRF (1-29) NH₂ on short-term memory: neuroendocrine and neuropsychological assessment in healthy young subjects." Methods Find Exp Clin Pharmacol **12**(7): 493-9.
- 4.- Amaral, D., Johnston, D (2003). Hippocampus, The Synaptic Organization of the Brain. S. J, Oxford University press.
- 5.- Avila-Costa, M.R., Colin-Barenque, L., Fortoul, T.I., Machado-Salas, P., Espinosa-Villanueva, J., Rugerio-Vargas, C., et al. (1999). "Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1." Neurosci Lett **270**(2): 107-9.
- 6.- Baldwin, A.S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-83.
- 7.- Bartke, A. y Brown-Borg, H. (2004). "Life extension in the dwarf mouse." Curr Top Dev Biol **63**: 189-225.
- 8.- Bazan, N.G., Colangelo, V. y Lukiw, W.J. (2002). "Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease." Prostaglandins Other Lipid Mediat **68-69**: 197-210.
- 9.- Beckman, K.B. y Ames, B.N. (1998). "The free radical theory of aging matures." Physiol Rev **78**(2): 547-81.
- 10.- Bergstrom, S. y Samuelsson, B. (1962). "Isolation of prostaglandin E1 from human seminal plasma. Prostaglandins and related factors. 11." J Biol Chem **237**: 3005-6.
- 11.- Butterfield, D.A., Howard, B.J. y LaFontaine, M.A. (2001). "Brain oxidative stress in

- animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease and Huntington's disease." Curr Med Chem **8**(7): 815-28.
- 12.- Carew, J.T. (2000). Spatial navigation in rats. Behavioral Neurobiology, Sinauer Associates Inc: 375-411.
 - 13.- Chacon, F., Esquifino, A.I., Perello, M., Cardinali, D.P., Spinedi, E. y Alvarez, M.P. (2005). "24-hour changes in ACTH, corticosterone, growth hormone, and leptin levels in young male rats subjected to calorie restriction." Chronobiol Int **22**(2): 253-65.
 - 14.- Chen, C., Magee, J.C. y Bazan, N.G. (2002). "Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity." J Neurophysiol **87**(6): 2851-7.
 - 15.- Christman, M.F., Morgan, R.W., Jacobson, F.S. y Ames, B.N. (1985). "Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*." Cell **41**(3): 753-62.
 - 16.- Commoner, B., Townsend, J. y Pake, G.E. (1954). "Free radicals in biological materials." Nature **174**(4432): 689-91.
 - 17.- Consilvio, C., Vincent, A.M. y Feldman, E.L. (2004). "Neuroinflammation, COX-2, and ALS—a dual role?" Exp Neurol **187**(1): 1-10.
 - 18.- Davies, K.J. y Goldberg, A.L. (1987). "Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells." J Biol Chem **262**(17): 8227-34.
 - 19.- Deadwyler, S.A., Dunwiddie, T. y Lynch, G. (1987). "A critical level of protein synthesis is required for long-term potentiation." Synapse **1**(1): 90-5.
 - 20.- Denisova, N.A., Strain, J.G. y Joseph, J.A. (1997). "Oxidant injury in PC12 cells—a possible model of calcium "dysregulation" in aging: II. Interactions with membrane lipids." J Neurochem **69**(3): 1259-66.
 - 21.- Denko, C.W. y Malemud, C.J. (2005). "Role of the growth hormone/insulin-like growth factor-1 paracrine axis in rheumatic diseases." Semin Arthritis Rheum **35**(1): 24-34.
 - 22.- Donahue, A.N., Aschner, M., Lash, L.H., Syversen, T. y Sonntag, W.E. (2005). "Growth hormone administration to aged animals reduces disulfide glutathione levels in hippocampus." Mech Ageing Dev.

- 23.- Dorado-Martinez, C., Paredes-Carbajal, C., Mascher, D., Borgonio-Perez, G. y Rivas-Arancibia, S. (2001). "Effects of different ozone doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels, in rats." Int J Neurosci **108**(3-4): 149-61.
- 24.- Douglas, R.M. y Goddard, G.V. (1975). "Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus." Brain Res **86**(2): 205-15.
- 25.- Dringen, R., Pawlowski, P.G. y Hirrlinger, J. (2005). "Peroxide detoxification by brain cells." J Neurosci Res **79**(1-2): 157-65.
- 26.- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- 27.- Finlayson-Pitts, B.J.a.P., James N., Jr. (1999). Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere., Academic Press.
- 28.- FitzGerald, G.A. (2003). "COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease." Nat Rev Drug Discov **2**(11): 879-90.
- 29.- Floyd, R.A. y Hensley, K. (2002). "Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases." Neurobiol Aging **23**(5): 795-807.
- 30.- Frago, L.M., Paneda, C., Dickson, S.L., Hewson, A.K., Argente, J. y Chowen, J.A. (2002). "Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection." Endocrinology **143**(10): 4113-22.
- 31.- Fujimoto, Y., Uno, E. y Sakuma, S. (2004). "Effects of reactive oxygen and nitrogen species on cyclooxygenase-1 and -2 activities." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **71**(5): 335-40.
- 32.- Gebicke-Haerter, P.J. (2001). "Microglia in neurodegeneration: molecular aspects." Microsc Res Tech **54**(1): 47-58.
- 33.- Guerrero, A.L., Dorado-Martinez, C., Rodriguez, A., Pedroza-Rios, K., Borgonio-Perez, G. y Rivas-Arancibia, S. (1999). "Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats." Neuroreport **10**(8): 1689-92.
- 34.- Gutteridge, J.M. y Halliwell, B. (1989). "Iron toxicity and oxygen radicals." Baillieres Clin Haematol **2**(2): 195-256.
- 35.- Han, X., Sosnowska, D., Bonkowski, E.L. y Denson, L.A. (2005). "Growth hormone inhibits signal transducer and activator of transcription 3 activation and reduces

- disease activity in murine colitis." Gastroenterology **129**(1): 185-203.
- 36.- Handelmann, G.E. y Olton, D.S. (1981). "Spatial memory following damage to hippocampal CA3 pyramidal cells with kainic acid: impairment and recovery with preoperative training." Brain Res **217**(1): 41-58.
- 37.- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.
- 38.- Hauck, S.J., Aaron, J.M., Wright, C., Kopchick, J.J. y Bartke, A. (2002). "Antioxidant enzymes, free-radical damage, and response to paraquat in liver and kidney of long-living growth hormone receptor/binding protein gene-disrupted mice." Horm Metab Res **34**(9): 481-6.
- 39.- Hensley, K. y Floyd, R.A. (2002). "Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead." Arch Biochem Biophys **397**(2): 377-83.
- 40.- Hla, T. y Neilson, K. (1992). "Human cyclooxygenase-2 cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7384-8.
- 41.- Horton, A.A. y Fairhurst, S. (1987). "Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity." Crit Rev Toxicol **18**(1): 27-79.
- 42.- Horton, E.W. (1964). "Actions Of Prostaglandins E1, E2 And E3 On The Central Nervous System." Br J Pharmacol Chemother **22**: 189-92.
- 43.- Jellinger, K.A. y Stadelmann, C. (2000). "Mechanisms of cell death in neurodegenerative disorders." J Neural Transm Suppl **59**: 95-114.
- 44.- Joels, M., Karst, H., Alfarez, D., Heine, V.M., Qin, Y., van Riel, E., et al. (2004). "Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus." Stress **7**(4): 221-31.
- 45.- Jones, R.L. (1976). "Cardiovascular actions of prostaglandins D and E in the sheep: evidence for two distinct receptors." Adv Prostaglandin Thromboxane Res **1**: 221-30.
- 46.- Kamata, H. y Hirata, H. (1999). "Redox regulation of cellular signalling." Cell Signal **11**(1): 1-14.
- 47.- Karim, S., Berrou, E., Levy-Toledano, S., Bryckaert, M. y MacLouf, J. (1997). "Regulatory role of prostaglandin E2 in induction of cyclo-oxygenase-2 by a thromboxane A2 analogue (U46619) and basic fibroblast growth factor in porcine

- aortic smooth-muscle cells." Biochem J **326** (Pt 2): 593-9.
- 48.- Kim, H.J., Kim, K.W., Yu, B.P. y Chung, H.Y. (2000). "The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappaB activation and IkappaBalpha degradation." Free Radic Biol Med **28**(5): 683-92.
- 49.- Kluver, H. y Barrera, E. (1953). "A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **12**(4): 400-3.
- 50.- Krug, M., Lossner, B. y Ott, T. (1984). "Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats." Brain Res Bull **13**(1): 39-42.
- 51.- Le Greves, M., Le Greves, P. y Nyberg, F. (2005). "Age-related effects of IGF-1 on the NMDA-, GH- and IGF-1-receptor mRNA transcripts in the rat hippocampus." Brain Res Bull **65**(5): 369-74.
- 52.- Li, H.L., Sun, B.Z. y Ma, F.C. (2004). "Expression of COX-2, iNOS, p53 and Ki-67 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma." World J Gastroenterol **10**(13): 1862-6.
- 53.- Li, L., Prabhakaran, K., Shou, Y., Borowitz, J.L. y Isom, G.E. (2002). "Oxidative stress and cyclooxygenase-2 induction mediate cyanide-induced apoptosis of cortical cells." Toxicol Appl Pharmacol **185**(1): 55-63.
- 54.- Li, Z., Jansen, M., Pierre, S.R. y Figueiredo-Pereira, M.E. (2003). "Neurodegeneration: linking ubiquitin/proteasome pathway impairment with inflammation." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 547-52.
- 55.- Luheshi, G. y Rothwell, N. (1996). "Cytokines and fever." Int Arch Allergy Immunol **109**(4): 301-7.
- 56.- Luterman, J.D., Haroutunian, V., Yemul, S., Ho, L., Purohit, D., Aisen, P.S., et al. (2000). "Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia." Arch Neurol **57**(8): 1153-60.
- 57.- Lyons-Giordano, B., Pratta, M.A., Galbraith, W., Davis, G.L. y Arner, E.C. (1993). "Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2." Exp Cell Res **206**(1): 58-62.
- 58.- Matsumura, H., Nakajima, T., Osaka, T., Satoh, S., Kawase, K., Kubo, E., et al. (1994). "Prostaglandin D2-sensitive, sleep-promoting zone defined in the ventral

- surface of the rostral basal forebrain." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 11998-2002.
- 59.- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969a). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-55.
- 60.- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969b). "The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen." J Biol Chem **244**(22): 6056-63.
- 61.- McCullough, L., Wu, L., Haughey, N., Liang, X., Hand, T., Wang, Q., et al. (2004). "Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia." J Neurosci **24**(1): 257-68.
- 62.- McEwen, B.S. (2005). "Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain." Metabolism **54**(5 Suppl 1): 20-3.
- 63.- Mills, G.C. (1957). "Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown." J Biol Chem **229**(1): 189-97.
- 64.- Minghetti, L. (2004). "Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases." J Neuropathol Exp Neurol **63**(9): 901-10.
- 65.- Mittal, C.K. y Murad, F. (1977). "Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(10): 4360-4.
- 66.- Mizoguchi, A., Eguchi, N., Kimura, K., Kiyohara, Y., Qu, W.M., Huang, Z.L., et al. (2001). "Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11674-9.
- 67.- Morimatsu, M., Hirai, S., Muramatsu, A. y Yoshikawa, M. (1975). "Senile degenerative brain lesions and dementia." J Am Geriatr Soc **23**(9): 390-406.
- 68.- Morris, R.G. (1981). "Spatial localization does not require the presence of local cues." Learning and Motivation **12**(2): 239-260.
- 69.- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N. y O'Keefe, J. (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." Nature **297**(5868): 681-3.
- 70.- Morrow, J.D., Awad, J.A., Boss, H.J., Blair, I.A. y Roberts, L.J., 2nd (1992a). "Non-

- cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10721-5.
- 71.- Morrow, J.D., Awad, J.A., Kato, T., Takahashi, K., Badr, K.F., Roberts, L.J., 2nd, et al. (1992b). "Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation." J Clin Invest **90**(6): 2502-7.
- 72.- Mouihate, A., Boisse, L. y Pittman, Q.J. (2004). "A novel antipyretic action of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in the rat brain." J Neurosci **24**(6): 1312-8.
- 73.- Nakazawa, K., Sun, L.D., Quirk, M.C., Rondi-Reig, L., Wilson, M.A. y Tonegawa, S. (2003). "Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience." Neuron **38**(2): 305-15.
- 74.- Narumiya, S., Hirata, N., Namba, T., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Sugimoto, Y., et al. (1993). "Structure and function of prostanoid receptors." J Lipid Mediat **6**(1-3): 155-61.
- 75.- Narumiya, S., Sugimoto, Y. y Ushikubi, F. (1999). "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions." Physiol Rev **79**(4): 1193-226.
- 76.- Negishi, M., Sugimoto, Y. y Ichikawa, A. (1993). "Prostanoid receptors and their biological actions." Prog Lipid Res **32**(4): 417-34.
- 77.- Nino-Cabrera, H.G., Colin-Barenque, L., Avila-Costa, M.R., Espinosa-Villanueva, J., Fortoul, T.I. y Rivas-Arancibia, S. (2002). "Differences between hippocampus and cerebral cortex in aged rats in an oxidative stress model." Int J Neurosci **112**(4): 373-81.
- 78.- Nyberg, F. (2000). "Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance." Front Neuroendocrinol **21**(4): 330-48.
- 79.- O'Banion, M.K., Winn, V.D. y Young, D.A. (1992). "cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4888-92.
- 80.- O'Keefe, J. y Speakman, A. (1987). "Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task." Exp Brain Res **68**(1): 1-27.
- 81.- Ohishi, N., Ohkawa, H., Miike, A., Tatano, T. y Yagi, K. (1985). "A new assay

- method for lipid peroxides using a methylene blue derivative." Biochem Int **10**(2): 205-11.
- 82.- Okano, H., Shiraki, K., Inoue, H., Yamanaka, Y., Kawakita, T., Saitou, Y., et al. (2003). "15-deoxy-delta-12-14-PGJ2 regulates apoptosis induction and nuclear factor-kappaB activation via a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism in hepatocellular carcinoma." Lab Invest **83**(10): 1529-39.
- 83.- Olton, D.S. (1977). "Spatial memory." Sci Am **236**(6): 82-4, 89-94, 96, 98.
- 84.- Pagliaro, P. (2003). "Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO." Life Sci **73**(17): 2137-49.
- 85.- Palmer, L.A., Semenza, G.L., Stoler, M.H. y Johns, R.A. (1998). "Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1." Am J Physiol **274**(2 Pt 1): L212-9.
- 86.- Paxinos, G. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. London, Academic press.
- 87.- Perez-Severiano, F., Salvatierra-Sanchez, R., Rodriguez-Perez, M., Cuevas-Martinez, E.Y., Guevara, J., Limon, D., et al. (2004). "S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits." Eur J Pharmacol **489**(3): 197-202.
- 88.- Perkins, D.J. y Kniss, D.A. (1997). "Rapid and transient induction of cyclo-oxygenase 2 by epidermal growth factor in human amnion-derived WISH cells." Biochem J **321** (Pt 3): 677-81.
- 89.- Pica, F., Franzese, O., D'Onofrio, C., Bonmassar, E., Favalli, C. y Garaci, E. (1996). "Prostaglandin E2 induces apoptosis in resting immature and mature human lymphocytes: a c-Myc-dependent and Bcl-2-independent associated pathway." J Pharmacol Exp Ther **277**(3): 1793-800.
- 90.- Pica, F., Franzese, O., D'Onofrio, C., Paganini, L., Favalli, C., Bonmassar, E., et al. (1995). "Effect of PGE2 on c-Myc and Bcl-2 production and programmed cell death in human lymphocytes." Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res **23**: 457-9.
- 91.- Rahman, I., Clerch, L.B. y Massaro, D. (1991). "Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone." Am J Physiol **260**(6 Pt 1): L412-8.
- 92.- Reymann, K.G., Malisch, R., Schulzeck, K., Brodemann, R., Ott, T. y Matthies, H. (1985). "The duration of long-term potentiation in the CA1 region of the

- hippocampal slice preparation." Brain Res Bull **15**(3): 249-55.
- 93.- Rich, J.B., Rasmusson, D.X., Folstein, M.F., Carson, K.A., Kawas, C. y Brandt, J. (1995). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease." Neurology **45**(1): 51-5.
- 94.- Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martinez, C., Borgonio-Perez, G., Hiriart-Urdanivia, M., Verdugo-Diaz, L., Duran-Vazquez, A., et al. (2000). "Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats." Environ Res **82**(1): 7-17.
- 95.- Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martinez, C., Colin-Barenque, L., Kendrick, K.M., de la Riva, C. y Guevara-Guzman, R. (2003). "Effect of acute ozone exposure on locomotor behavior and striatal function." Pharmacol Biochem Behav **74**(4): 891-900.
- 96.- Rivas-Arancibia, S., Vazquez-Sandoval, R., Gonzalez-Kladiano, D., Schneider-Rivas, S. y Lechuga-Guerrero, A. (1998). "Effects of ozone exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase." Environ Res **76**(1): 33-9.
- 97.- Rodriguez-Martinez, E., Rugerio-Vargas, C., Rodriguez, A.I., Borgonio-Perez, G. y Rivas-Arancibia, S. (2004). "Antioxidant effects of taurine, vitamin C, and vitamin E on oxidative damage in hippocampus caused by the administration of 3-nitropropionic acid in rats." Int J Neurosci **114**(9): 1133-45.
- 98.- Rodriguez-Pascual, F., Hausding, M., Ihrig-Biedert, I., Furneaux, H., Levy, A.P., Forstermann, U., et al. (2000). "Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR." J Biol Chem **275**(34): 26040-9.
- 99.- Roth, G.J., Stanford, N. y Majerus, P.W. (1975). "Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(8): 3073-6.
- 100.- Roth, S. y Droge, W. (1987). "Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide." Cell Immunol **108**(2): 417-24.
- 101.- Rudolph, I.L., Kelley, D.S., Klasing, K.C. y Erickson, K.L. (2001). "Regulation of cellular differentiation and apoptosis by fatty acids and their metabolites." Nutr Res **21**(1-2): 381-93.
- 102.- Satoh, S., Matsumura, H., Suzuki, F. y Hayaishi, O. (1996). "Promotion of sleep

- mediated by the A2a-adenosine receptor and possible involvement of this receptor in the sleep induced by prostaglandin D2 in rats." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5980-4.
- 103.- Scammell, T.E., Griffin, J.D., Elmquist, J.K. y Saper, C.B. (1998). "Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever." Am J Physiol **274**(3 Pt 2): R783-9.
- 104.- Schiltz, J.C. y Sawchenko, P.E. (2002). "Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults." J Neurosci **22**(13): 5606-18.
- 105.- Schmedtje, J.F., Jr., Ji, Y.S., Liu, W.L., DuBois, R.N. y Runge, M.S. (1997). "Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells." J Biol Chem **272**(1): 601-8.
- 106.- Schneider-Rivas, S., Rivas-Arancibia, S., Vazquez-Pereyra, F., Vazquez-Sandoval, R. y Borgonio-Perez, G. (1995). "Modulation of long-term memory and extinction responses induced by growth hormone (GH) and growth hormone releasing hormone (GHRH) in rats." Life Sci **56**(22): PL433-41.
- 107.- Schneider, H.J., Pagotto, U. y Stalla, G.K. (2003). "Central effects of the somatotrophic system." Eur J Endocrinol **149**(5): 377-92.
- 108.- Schreck, R., Albermann, K. y Baeuerle, P.A. (1992). "Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review)." Free Radic Res Commun **17**(4): 221-37.
- 109.- Scoville, W.B. y Milner, B. (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurochem **20**(1): 11-21.
- 110.- Scoville, W.B. y Milner, B. (2000). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **12**(1): 103-13.
- 111.- Shull, S., Heintz, N.H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y.M., Marsh, J.P., et al. (1991). "Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants." J Biol Chem **266**(36): 24398-403.
- 112.- Sorace, A., de Acetis, L., Alleva, E. y Santucci, D. (2001). "Prolonged exposure to low doses of ozone: short- and long-term changes in behavioral performance in mice." Environ Res **85**(2): 122-34.

- 113.- Stadtman, E.R., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Carney, J.M. y Floyd, R.A. (1992). "Protein modification in aging." Exs 62: 64-72.
- 114.- Stepanichev, M.Y., Zdobnova, I.M., Zarubenko, II, Moiseeva, Y.V., Lazareva, N.A., Onufriev, M.V., et al. (2004). "Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus." Physiol Behav 80(5): 647-55.
- 115.- Suh, Y.H. y Checler, F. (2002). "Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease." Pharmacol Rev 54(3): 469-525.
- 116.- Sun, Y., Tang, X.M., Half, E., Kuo, M.T. y Sinicrope, F.A. (2002). "Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells." Cancer Res 62(21): 6323-8.
- 117.- Sztrihai, L. (1986). "Increased lipid peroxide formation in the rat forebrain during kainic acid seizures." Biomed Biochim Acta 45(4): 491-4.
- 118.- Tanaka, J. y Sobue, K. (1994). "Localization and characterization of gelsolin in nervous tissues: gelsolin is specifically enriched in myelin-forming cells." J Neurosci 14(3 Pt 1): 1038-52.
- 119.- Teather, L.A., Packard, M.G. y Bazan, N.G. (2002). "Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation." Learn Mem 9(1): 41-7.
- 120.- Teismann, P. y Ferger, B. (2001). "Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease." Synapse 39(2): 167-74.
- 121.- Teismann, P., Vila, M., Choi, D.K., Tieu, K., Wu, D.C., Jackson-Lewis, V., et al. (2003). "COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci 991: 272-7.
- 122.- Tolman, E.C. (1948). "COGNITIVE MAPS IN RATS AND MEN." The Psychological Review 55(4): 189-208.
- 123.- Urade, Y. y Hayaishi, O. (2000). "Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase." Biochim Biophys Acta 1482(1-2): 259-71.
- 124.- Urban, M.B., Schreck, R. y Baeuerle, P.A. (1991). "NF-kappa B contacts DNA by a

- heterodimer of the p50 and p65 subunit." *Embo J* **10**(7): 1817-25.
- 125.- Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A.M., Olano, E., Davis, P.A., Packer, L., et al. (2004). "In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin." *Free Radic Biol Med* **36**(5): 673-81.
- 126.- Wang, M.Y. y Liehr, J.G. (1994). "Identification of fatty acid hydroperoxide cofactors in the cytochrome P450-mediated oxidation of estrogens to quinone metabolites. Role and balance of lipid peroxides during estrogen-induced carcinogenesis." *J Biol Chem* **269**(1): 284-91.
- 127.- Yasojima, K., Tourtellotte, W.W., McGeer, E.G. y McGeer, P.L. (2001). "Marked increase in cyclooxygenase-2 in ALS spinal cord: implications for therapy." *Neurology* **57**(6): 952-6.
- 128.- Ye, Y.N., Wu, W.K., Shin, V.Y. y Cho, C.H. (2005). "A mechanistic study of colon cancer growth promoted by cigarette smoke extract." *Eur J Pharmacol* **519**(1-2): 52-7.
- 129.- Yoshida, H., Kubota, T. y Krueger, J.M. (2003). "A cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates spontaneous and TNF-alpha-induced non-rapid eye movement sleep in rabbits." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**(1): R99-109.
- 130.- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. y Karin, M. (1997). "The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation." *Cell* **91**(2): 243-52.
- 131.- Zhu, T., Goh, E.L., Graichen, R., Ling, L. y Lobie, P.E. (2001). "Signal transduction via the growth hormone receptor." *Cell Signal* **13**(9): 599-616.
- 132.- Zoltay, G. y Cooper, J.R. (1994). "Presynaptic modulation by eicosanoids in cortical synaptosomes." *Neurochem Res* **19**(9): 1211-5.

Apéndice I, índice de abreviaturas

- bFGF- Factor de crecimiento de fibroblastos b
- CA1,2,3- Cuerno de Amón 1,2,3
- cGMP- Guanidil monofosfato cíclico
- COX-1- Ciclooxygenasa 1,
- COX-2- Ciclooxygenasa 2
- CREB - Proteína de unión al sitio responsivo cAMP/Ca⁺⁺
- DP- Receptor de PGD₂
- eNOS- Óxido nítrico sintasa endotelial
- EP- Receptor de PGE
- FP- Receptor de PGF
- GD- Giro dentado
- GDCG- Capa granular del giro dentado
- GDCP- Capa polimórfica del giro dentado
- GH- Hormona de Crecimiento
- GH-R – Receptor de hormona de crecimiento
- GFAP- Proteína Fibrilar Acídica
- GPx- Glutación peroxidasa
- IGF-1 - Factor de crecimiento tipo insulina 1
- IGF-2 - Factor de crecimiento tipo insulina 2
- IgG- Inmunoglobulina G
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-2 – Interleucina 2
- iNOS- Óxido nítrico sintasa inducible
- IP- Receptor de PGI₂
- IκB_α – Proteína inhibidora del NFκB α
- JAK- Cinasa Activada tipo Jano (Just Another kinase)
- LPS- Lipopolisacáridos
- MAPK- Proteínas Cinasas, activadas por mitógenos

MPTP- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADH- Nicotin adenin reducido
NFκB- Factor Nuclear κ de células B
NMDA- Receptores tipo N-metil-D-Aspartato
nNOS- Óxido nítrico sintasa neuronal
NO- Óxido Nítrico
NSAID Anti inflamatorios no esteroideos
O₂⁻- Anión superóxido
ONOO⁻- Anión peroxinitrito
PGE₂- Prostaglandina E derivada del ácido araquidónico
PGG₂- Prostaglandina G, derivada del ácido araquidónico
PGH₂- Prostaglandina H, derivada del ácido araquidónico
PGJ₂- Prostaglandina J, derivada del ácido araquidónico
PKC- Proteína cinasa dependiente de Calcio
PPAR- Receptor proliferador acoplado a peroxisomas
RNS- Especies reactivas de nitrógeno
ROS- Especies reactivas de oxígeno
SOD-1 Superóxido dismutasa de cobre y zinc
SOD-2 Superóxido dismutasa de manganeso
STAT- Transductor de señales y activador de la transcripción
TGFα- Factor de crecimiento de transformación alfa
TNF- Factor de necrosis tumoral
TP- Receptor de tromboxanos
TNF- Factor de necrosis tumoral
TXA₂- Tromboxano A, derivado del ácido araquidónico
TXA₂R- Receptor de TXA
βAPP – Proteína precursora del péptido β amiloide