



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE  
FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**Cambios fisiológicos de la hormona de crecimiento durante la lactancia en  
ratas criadas de forma artificial**

**TESIS**  
Que presenta

**M. en C. César Gabriel Toriz González**

Para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
EN LA ESPECIALIDAD DE  
**Fisiología Celular y Molecular**

**Directores de tesis: Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido  
Dr. Angel Ismael Melo Salazar**

**Ciudad de México**

**Abril 2021**

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario: **45270**; así como parte del apoyo a **Ciencia Básica 2012** en la modalidad de **Grupos de Investigación** con número de proyecto CONACyT: **181334**: Caracterización del individuo aislado socialmente: algunos aspectos fisiológicos, morfométricos y conductuales durante el desarrollo postnatal de la rata.

Asimismo, se recibió apoyo del personal auxiliar y técnico; tanto del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Biol. Carmen Solano Agama, Sr. Osvaldo Ríos), en el programa de doctorado en la especialidad de Fisiología Celular y Molecular; así como del personal técnico de la UNAM, M. en C. Elsa Liliana Aguirre Benítez.

El trabajo se realizó bajo la dirección conjunta de la Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido, profesora del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias; y del Dr. Angel Ismael Melo Salazar, Investigador del Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV laboratorio Tlaxcala. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

1. Resumen-----	6
Abreviaturas-----	9
2. Introducción	
2.1. Eje hipotálamo-hipofisiario	
2.1.1. Hipotálamo-----	12
2.1.2. Hipófisis-----	13
2.1.3. Hormonas hipofisarias-----	14
2.1.4. Anatomía hipofisiaria-----	15
2.1.5. Sistema porta-hipofisiario-----	17
2.1.6. Eminencia media-----	18
2.2. Hormona de crecimiento	
2.2.1. Breve descripción-----	19
2.2.2. Control hipotalámico sobre la secreción de GH-----	20
2.2.3. Expresión del gen a GH-----	23
2.3. Control periférico de la secreción de GH hipofisiaria por la grelina y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF)-1.	
2.3.1. Grelina-----	26
2.3.2. Secreción de grelina entérica-----	27
2.3.3. Factor de crecimiento tipo insulina (IGF)-1-----	28

2.3.4. La grelina durante el desarrollo-----	30
2.3.5. El IGF-1 durante el desarrollo-----	31
2.4. El efecto somatogénico y metabólico de la GH	
2.4.1. Receptor a GH-----	32
2.4.2. Regulación del ARNm del IGF-1 por la GH-----	33
2.4.3. Proteínas de unión a la IGF-I (IGFBPs) -----	35
2.4.4. Desarrollo postnatal del eje GH-IGF-1-----	35
2.4.5. Papel de la GH durante el periodo postnatal temprano (lactancia) ----	37
2.4.6. La relación madre-cría en los roedores y las concentraciones séricas de GH-----	38
2.4.7. Variaciones en la dieta de las crías de roedores durante la lactancia---	40
3. Hipótesis-----	43
4. Objetivo General-----	43
4.1. Objetivos Particulares-----	44
5. Materiales y métodos	
5.1. Animales-----	45
5.2. Cuantificación de GH, IGF-1 y Grelina-----	46
5.3. Ensayo de secreción en células de cultivo primario hipofisiario-----	47
5.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para <i>Gh</i> e <i>Igf</i> -----	48
5.5. Cuantificación del receptor a GH hepático por Western Blot-----	49
5.6. Inmunocitoquímica para los receptores, tanto de GH (GHR) como para dopamina (del tipo D2; D2R) -----	49

5.7. Citoquímica del tejido hepático-----	51
5.8. Análisis del contenido de TAGs en el tejido hepático-----	51
5.9. Análisis de los datos-----	52
6. Resultados	
6.1. Ganancia de peso corporal-----	53
6.2. Concentraciones séricas de GH-----	54
6.3. Secreción de GH en cultivo primario de células hipofisarias de crías CM y CA, así como la expresión del receptor a dopamina-----	56
6.4. ARNm de Gh1 (Gh1ARNm) hipofisario de crías CM y CA-----	59
6.5. Concentraciones séricas de grelina acilada posterior a cuatro horas de ayuno-----	60
6.6. Concentraciones séricas de glucosa en crías CM y CA con o sin ayuno de cuatro horas -----	61
6.7. Concentraciones séricas del factor de crecimiento epidérmico tipo 1 (IGF-1) --	63
6.8. Niveles de expresión relativa del IgfARNm y del receptor a GH-----	65
6.9. Parámetros morfométricos del hígado-----	67
6.10. Contenido en hígado de triacilgliceroles (TAGs) y de glucógeno en crías CM y CA-----	71
7. Discusión-----	73
8. Conclusiones-----	81
9. Perspectivas-----	82
10. Anexo 1: Preparación de la leche utilizada bajo el sistema de crianza artificial---	83
11. Bibliografía-----	87

## 1. Resumen

Durante el periodo de lactancia los patrones conductuales de interacción madre-cría cambian en función del desarrollo de las crías. Adicionalmente, hay cambios en la fuente de alimentación; inicialmente la leche materna es el único alimento de sustento, y posteriormente esta se combina con la ingesta de alimento sólido y de agua. Las concentraciones séricas de la hormona de crecimiento (GH, de sus siglas en inglés) dependen tanto de la interacción madre-cría como del propio metabolismo de las crías. En el procedimiento de crianza artificial (CA), las crías son privadas de la interacción madre-cría y su patrón de alimentación, así como la composición de la leche que ingieren es controlado. Este paradigma experimental ha sido usado en las ratas para analizar los efectos de la privación materna sobre el desarrollo de las conductas sociales y los sustratos neurales que la regulan. No obstante, poco se sabe sobre los efectos que generan los patrones de alimentación sobre el metabolismo de las crías. En el presente trabajo, analizamos las variaciones en las concentraciones séricas de GH, grelina acilada, y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF)-1 a lo largo del periodo de lactancia en las crías bajo CA. Como ha sido previamente reportado, el ayuno inducido por la separación materna de cuatro horas en crías de 7 días postnatales (dpn) que se encuentran criando con su madre (crianza materna; CM) causa una caída en las concentraciones séricas de GH. Sin embargo, esta respuesta no ocurre en las ratas CA, lo cual sugiere una adaptación al fenómeno de la separación materna. Se observó un efecto inhibitorio dopaminérgico sobre la secreción de GH en cultivos celulares hipofisarios provenientes de ratas con una edad de 7dpn, sugiriendo una regulación dopaminérgica sobre las concentraciones séricas de GH a esta edad. Los niveles séricos de grelina acilada en las crías CA mostraron un patrón invertido en comparación a las crías CM, el cual estuvo relacionado al patrón de alimentación artificial. Al 7dpn, los niveles de IGF-1 séricos fueron estadísticamente menores en las crías CA en comparación de las crías CM, lo cual fue asociado a una resistencia hepática a la GH y con una baja expresión del ARNm del IGF-1. De manera interesante, al 14dpn, ambos grupos experimentales mostraron una expresión elevada del ARNm del IGF-1 pero bajos niveles séricos del IGF-1, lo cual se invirtió al 21dpn. No obstante, los niveles séricos de glucosa fueron estadísticamente menores en las crías CA al 14dpn y se restablecen a niveles de las crías CM al 21dpn. Las crías CA al 21dpn exhiben una hepatomegalia y altos niveles del

receptor a GH en hígado, lo cual se explica por la ausencia de una dieta sólida. Estos datos sugieren que durante la CA, las crías pierden la secreción de GH estimulada por la interacción materna, lo cual se correlaciona con bajos niveles de IGF-1 durante la primera semana de vida postnatal. Posteriormente, estas crías exhiben una respuesta hepática para satisfacer la demanda metabólica para un destete normal, con bajos niveles de carbohidratos en su dieta.

## Summary

During the lactation period, rat pups are fed by the dam, and the patterns of mother-pup interaction change during this period. Additionally, there are changes in feeding; first, mother's milk is the only food needed for sustenance, and later, it is combined with solid food and water. GH serum concentrations depend on both maternal-pup interaction and energy metabolism. In the artificial rearing (AR) procedure, pups are deprived of mother-pup interaction, and the feeding pattern is controlled. This rearing paradigm has been used in rats to analyze the effects of maternal deprivation on social behavior. In the present study, we analyzed the variation in GH, acylated ghrelin and IGF-1 serum concentrations throughout the lactation period in AR pups. At pnd7, the maternal rearing (MR) pups responded to a 4 h fast with a drop in GH serum concentration, which is a well-known response to maternal deprivation. GH serum levels in the AR pups did not change, suggesting an adaptation phenomenon. A dopamine inhibitory effect of GH secretion was observed in pnd7 cultured somatotropes, suggesting dopamine regulation of GH secretion at this age. Acylated ghrelin serum levels in the AR pups showed an inverted pattern compared to that in the MR pups, which was related to the artificial feeding pattern. IGF-1 serum levels were lower in the AR pups than in MR pups, which was associated with hepatic GH resistance and with low *Igf1* mRNA expression at pnd7. Interestingly, at pnd14, both pup groups showed high hepatic *Igf1* mRNA expression but low IGF-1 serum levels, and this was inverted at pnd21. However, serum glucose levels were lower in the AR pups at pnd14 but reached the same levels as the MR pups at pnd21. Moreover, hepatomegaly and higher hepatic GH-receptor levels were observed in the AR pups at pnd21, which was in agreement with an absence of a solid food meal. During AR, the pups lost the maternal interaction-stimulated GH

secretion, which correlated with lower IGF-1 serum levels during the first week of postnatal development. Later, the AR pups exhibited hepatic responses, in order to satisfy the metabolic demand for the normal weaning, with low carbohydrates levels in their meals.



## Abreviaturas

&	<i>Et</i>
2 ΔΔ	Doble delta
a.a.	Amino ácidos
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosin difosfato
ALS	acid-labile subunit
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Analysis of variance
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
CA	Crianza artificial
CBP	CREB-Binding Protein
CBP-P	(CREB-Binding Protein)-fosforilado
CM	Crianza maternal
CREB	cAMP response element modulator
CV	Coefficiente de variación
D2R	Receptor a dopamina tipo 2
DAP	Dihidroacetona fosfato
dnp	Días postnatales
EIA	Enzyme immunoassays

ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> – y otros; <i>et aliae</i> – y otras; <i>et alibi</i> – y en otra parte
GH	Growth hormone
Gh1ARNm	Ácido ribonucleico mensajero de la Growth hormone
GHBP	Growth hormone Binding Protein
GH-R	Growth hormone receptor
GHRH	Growth hormone-releasing hormone
GHRH-R	Growth hormone-releasing hormone-receptor
Ghsr-1a	Growth hormone secretagogue receptor-1a
GRF	Growth hormone-releasing factor
<i>i.e.</i>	<i>Id est</i>
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor
<i>Igf</i> ARNm	Ácido ribonucleico mensajero del Insulin-like growth factor 1
IGFBP-1	Insulin-like growth factor Binding Protein 1
IGFBP-2	Insulin-like growth factor Binding Protein 2
IGFBP-3	Insulin-like growth factor Binding Protein 3
IP3	Inositol trisphosphate
JAK	Janus kinasa
kDa	Kilo Daltones
LPL	Lipoproteinlipasa
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NAr	Núcleo Arcuato hipotalámico
NPY/AgRP	Neuropeptide Y/agouti-related protein

p.c.	Peso corporal
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Phosphatidylinositol
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
Pit-1	Pituitary-specific positive transcription factor 1
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C-gamma
POU	Pit-Oct-Unc
POU <sub>HD</sub>	(Pit-Oct-Unc)-homeodomain
POU <sub>S</sub>	(Pit-Oct-Unc)-specific
Rn18s	RNA de la Sub-unidad 18S ribosomal
RT-PCR	Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction
SS	Somatostatina
SS-R	Somatostatin-receptor
STAT	signal transducer and activator of transcription proteins
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone

## **2. Introducción**

### **2.1. Eje hipotálamo-hipofisiario**

#### **2.1.1. Hipotálamo**

El hipotálamo es una estructura del Sistema Nervioso Central, localizada por debajo del tálamo y dividida en dos por el tercer ventrículo. El hipotálamo contiene grupos de neuronas que constituyen los llamados núcleos hipotalámicos, estructuras pares que se encuentran a cada lado del tercer ventrículo (Figura 2.1.1A). Fibras nerviosas aferentes y eferentes conectan al hipotálamo con la corteza cerebral, el tálamo, sistema límbico y médula espinal, y es a través de estas conexiones que esta estructura es regulada, junto con diversas señales químicas provenientes de la circulación periférica (Szentágothai *et al.*, 1962). El hipotálamo tiene muy diversas funciones, pero una muy importante es la síntesis y liberación de hormonas y aminas reguladoras cuyas células blanco se encuentran en la hipófisis o en órganos periféricos. Es a través de la liberación de hormonas y aminas que ejercen un papel regulador sobre la secreción hormonal de la hipófisis que se constituye el eje hipotálamo-hipófisis. Las principales hormonas hipotalámicas reguladoras de la hipófisis son: la hormona liberadora de la hormona de crecimiento, la hormona liberadora de corticotropina, la hormona liberadora de tirotropina, la hormona liberadora de gonadotropinas y la somatostatina, y la amina dopamina.

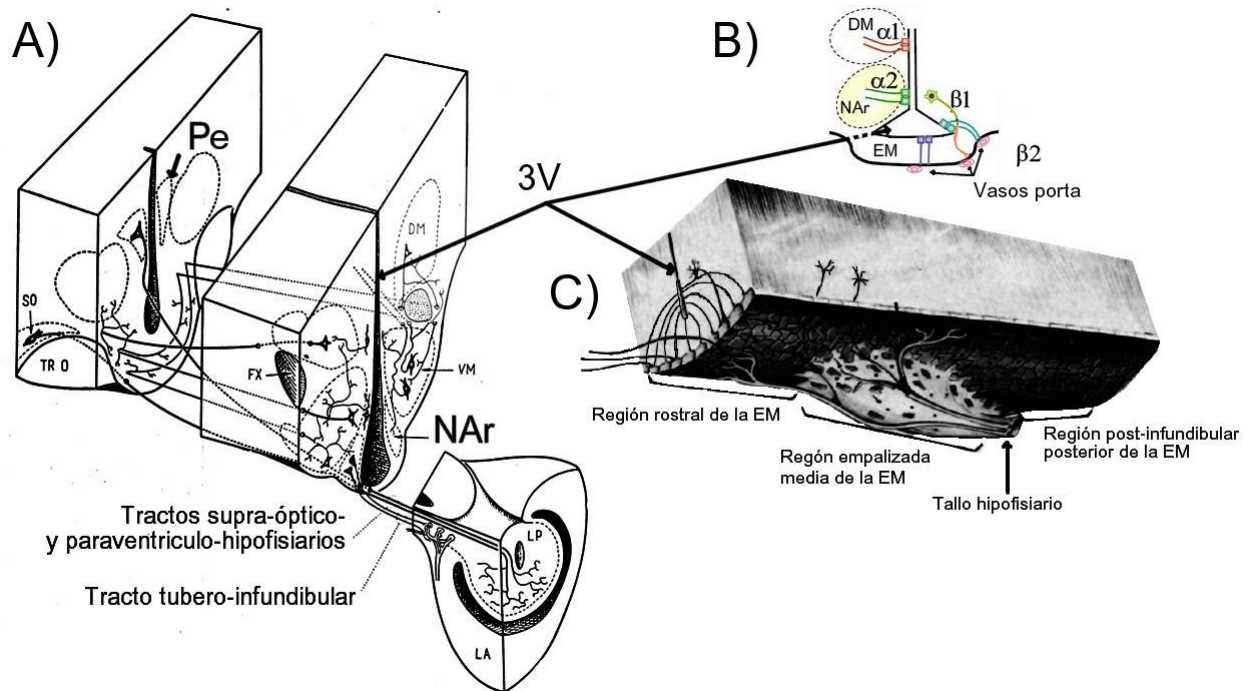


Figura 2.1.1. Localización de los diferentes núcleos hipotalámicos que regulan la secreción hipofisiaria. A) Los núcleos que regulan la secreción hipofisiaria están localizados alrededor del tercer ventrículo cerebral (3V) y sus prolongaciones nerviosas llegan, ya sea hasta la eminencia media (EM) que es una estructura que conforma el piso del 3V (A y C), o se continúan hasta el lóbulo posterior (LP) de la hipófisis (A). En la región media de la EM se localiza el tallo hipofisiario el cual es la prolongación física del piso del 3V (C). La EM está delimitada por células ependimogliales cuya característica distintiva es un proceso distal que yace ya sea sobre el plexo capilar primario, y constituyen los tipos celulares  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , o sobre las células del parénquima hipotalámico, y constituyen los tipos celulares  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ; y poseen un proceso proximal que termina en las paredes del piso del tercer ventrículo y que está en contacto con el líquido cefalorraquídeo (Tomadas y modificadas de Szentágothai et al., 1962 y Rodríguez et al., 2019).

## 2.1.2. Hipófisis

La hipófisis es una glándula endócrina cuyos productos hormonales regulan diferentes procesos fisiológicos. Su nombre lo recibió del médico alemán Samuel Thomas von Sömmerring en 1778 en “Dissertatio de basi encephali et originibus nervorum cranio egredientium libri quinque” (“los orígenes del sistema nervioso y el cerebro en la base del cráneo”) por su ubicación con respecto al cerebro (Véase Figura 2.1.1). La palabra hipófisis se compone de dos vocablos provenientes del griego: 1) *hypo*: que significa “por debajo” y 2) *physis*: que significa naturaleza y que deriva

del griego *phyomai* que significa “crecer”; lo que literalmente significa lo que crece por debajo (del cerebro). Samuel Thomas von Sömmerring también utilizó el nombre de apéndice cerebral (*appendix cerebri*) (Laios *et al.*, 2017). La palabra Pituitaria también ha sido utilizada ampliamente y fue uno de sus primeros nombres en recibir, pues se creía que ayudaba a drenar la pituita o moco cerebral desde el cerebro hasta la nariz (Vesalius, 1543), aunque a la fecha a esta glándula endócrina se le conoce como “la glándula maestra”.

La hipófisis es una estructura bilateral de línea media presente en todos los vertebrados. Esta glándula desempeña un papel central en la regulación de diversas funciones fisiológicas, entre ellas la homeostasis, el metabolismo, la reproducción y el crecimiento. Generalmente la hipófisis es referida como la glándula maestra (directora de orquesta) debido a que sus productos (hormonas trópicas) actúan estimulando o inhibiendo a otros elementos del sistema endócrino tales como: las glándulas, tiroidea, mamaria, y adrenal; las gónadas (testículos y ovarios); y diversos órganos como el hígado, páncreas y estómago (Véase “The Pituitary” por Shlomo Melmed editor en jefe, 2011). No obstante lo anterior, la secreción de hormonal hipofisiaria es regulada por neuro-hormonas y aminoras, las cuales son denominadas genéricamente como secretagogos hipofisiarios.

### 2.1.3. Hormonas hipofisiarias

En la hipófisis se producen fundamentalmente tres tipos de hormonas: 1) **hormonas proteicas**; cuyo peso molecular oscila de 21 hasta 23.5 kDa, dependiendo de la especie, e incluye diversas hormonas como la prolactina u hormona lactógena (PRL) y a la hormona de crecimiento (GH); 2) **hormonas polipeptídicas**, con una composición común entre las posiciones 4 al 10 con una variación entre 13 y 58 ácidos aminados debido a que derivan de la pre-pro-hormona como es la pro-opiomelanocortina (POMC). Estas hormonas se llaman de manera genérica “hormonas POMC” y son la  $\alpha$  y  $\beta$  hormona estimulante de los melanocitos, las hormonas lipotróficas, las endorfinas, y la hormona estimulante de la corteza suprarrenal (adrenocotrotropa o ACTH); y 3) **hormonas glicoproteicas**, que tienen un peso molecular de entre 26 y 30 kDa y están

constituidas por 2 cadenas, una  $\alpha$  y una  $\beta$  que están unidas en forma no covalente por puentes disulfuro. Esta familia de hormonas comprende a la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante o luteotrófica (LH). La diferencia estructural y de actividad se encuentra en la cadena  $\beta$ , ya que la cadena  $\alpha$  es común para las tres hormonas ( $\alpha$ -GSU, alpha-Subunit of glycoprotein hormones).

#### 2.1.4. Anatomía hipofisiaria

La hipófisis se divide física y funcionalmente en una parte neural o **neurohipófisis** y una parte endócrina o **adenohipófisis**. La parte **neural hipofisiaria** es una prolongación del piso del diencefalo (**infundíbulo**) y contiene tanto los axones y terminales de algunas neuronas hipotalámicas, así como las prolongaciones de células ependimogliales (Véase Figura 2.1.1B). La **parte endócrina** contiene a los seis fenotipos celulares secretores de hormonas y un tipo celular no-secretor de hormonas. El fenotipo celular secretor está definido por el tipo de hormona que la célula sintetiza y secreta. Durante el desarrollo prenatal, ambas partes surgen a partir de evaginaciones que finalizan en una unión física de lo que formará la hipófisis. Su ubicación respecto al cerebro es ventral, y está alojada, parcial o totalmente según la especie mamífera de la que se hable, en una concavidad ósea del esfenoideas que se conoce como silla turca. La hipófisis se encuentra sujeta al hueso esfenoideas por una cubierta conformada por capas de tejido conectivo que conforman las meninges, genéricamente nominada como *diaphragma sellae* (diafragma de la silla) y conforma un semi-techo en la fosa hipofisiaria con la región infundibular libre y cubierta únicamente por la piamadre.

La parte neural (**neurohipófisis**) está conformada por:

- 1) **pars nervosa**, que contiene a las terminales nerviosas de las neuronas magnocelulares hipotalámicas que liberan la oxitocina y la vasopresina; asimismo contiene células gliales denominadas pituicitos;

- 2) el **tallo**, que es la prolongación física del piso del tercer ventrículo a la altura donde se forma una depresión en forma de embudo (receso infundibular). Por esta estructura atraviesan los axones nerviosos de las terminales de la neurohipófisis;
- 3) la **eminencia media** (EM) que forma parte del piso del tercer ventrículo cerebral y a su vez se divide en:
  - a. Zona interna. Que está en contacto con el piso del tercer ventrículo y que contiene las asas del plexo capilar primario, los procesos de células polarizadas endimogliales (tanicitos), los pies axónicos de las neuronas hipotalámicas que regulan la secreción de las hormonas de la hipófisis anterior, y una región de la *pars tuberalis*.
  - b. Zona externa. Conformado por el espacio sub-aracnoideo.

La **adenohipófisis**, por su ubicación espacial con respecto a la neurohipófisis y con la hendidura hipofisiaria, se subdivide en tres regiones:

- 1) **hipófisis intermedia** o *pars medialis*. Esta estructura contiene las células que secretan hormonas derivadas de la Pro-opiomelanocortina (POMC), asimismo contiene los pies axónicos de las neuronas hipotalámicas del sistema tubero-hipofisial dopaminérgico (o THDA de sus siglas en inglés) que hacen sinapsis sobre estas células;
- 2) **hipófisis anterior** o *pars distalis*, contiene el resto de los fenotipos secretores adenohipofisarios y el fenotipo no secretor y son las células:
  - i. somatotropas, que secretan la hormona de crecimiento o GH;
  - ii. lactotropas, que secretan la prolactina o PRL;
  - iii. tirotropas, que secretan la hormona estimulante de la tiroides o TSH;
  - iv. somatolactotropas, que secretan GH/PRL
  - v. corticotropas, que secretan la corticotropina o ACTH, hormona derivada de la POMC);
  - vi. gonadotropas, que secretan ya sea la hormona luteinizante o LH (hormona estimulante de las células intersticiales o ICSH en machos), y/o la estimulante de los folículos o FSH;
  - vii. folículo- estelares que son células no secretoras.

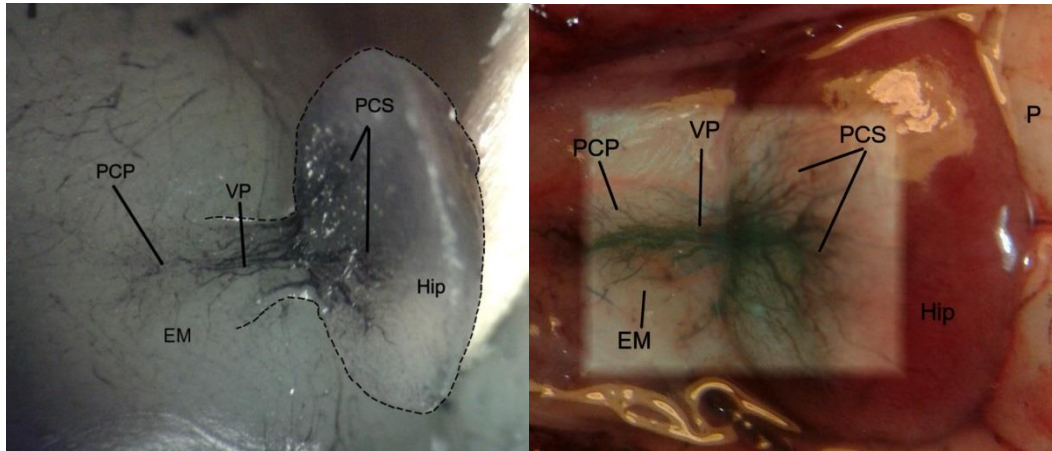


Además de las células bio-hormonales clásicas; gonadotropas y somatolactotropas existe una proporción baja del 1% de células que almacenan y secretan dos o más tipos hormonales (Villalobos *et al.*, 1997), pero esta proporción depende del tipo celular y del sexo, siendo superior la proporción en las hembras adultas (Núñez *et al.*, 2003).

- 3) **hipófisis tuberal** o *pars tuberalis*, característica en todos los tetrátopos vertebrados, es una prolongación de la hipófisis anterior que rodea el tallo infundibular por lo que está en íntimo contacto con el hipotálamo medio-basal. En la rata tiene forma de collar y contiene células positivas a la sub-unidad $\alpha$ -GSU.

#### 2.1.5. Sistema porta-hipofisiario.

Las hormonas hipotalámicas llegan a la hipófisis por vía sanguínea, para ello son liberadas en la vecindad de un lecho capilar llamado **plexo capilar primario**, localizado en la parte más ventral del piso del tercer ventrículo región denominada **eminencia media** (EM), y otros son liberados *in situ* en la parte neural o intermedia de la hipófisis (Schally *et al.*, 1978). Los primeros recorren la **vena porta** localizada en la región ventral-anterior del **tallo hipofisiario** hasta alcanzar un segundo lecho capilar, el llamado **plexo capilar secundario**, localizado en la región adenohipofisiaria (Véase Figura 2.1.5). Por otro lado, los secretagogos que llegan a la neurohipófisis e hipófisis intermedia viajan por transporte axónico en los haces nerviosos que recorren la región posterior-dorsal del tallo hipofisiario.



**Figura 2.1.5 Sistema portal hipotálamo-hipofisiario.** Vista ventral de la región hipotálamo-hipofisiaria de una rata macho de 14 días (A) y adulta (B) que recibieron la administración intracardiaca de tinta china. Siglas: PCP, plexo capilar primario; PCS, plexo capilar secundario; VP, vena porta; EM, eminencia media; Hip, hipófisis; P, puente (obtenidas en el laboratorio).

Los capilares que conforman los plexos primario y secundario, que junto con la vena porta conforman el **sistema porta-hipofisiario**, son capilares **fenestrados** (que significa “ventana” en latín). Esta característica anatómica permiten el suministro sanguíneo, que llega al plexo capilar primario a través de la arteria hipofisiaria superior, recoger los secretagogos hipotalámicos de la zona externa de la eminencia media y los transporta hasta el plexo capilar secundario, en donde, por diferencias de concentración, alcanzan a las células parenquimales hipofisiarias estimulado o inhibiendo la secreción hormonal (Green & Harris, 1949). La red capilar de la hipófisis intermedia recibe aferencias desde la arteria hipofisiaria media y posterior a través del **plexo superficial** de la *pars intermedia*, y drena sus hormonas hacia el plexo capilar secundario (Takeuchi, 2001).

#### 2.1.6. Eminencia media.

Debido a que la eminencia media (EM) es un órgano neurohemal, es decir carente de barrera hematoencefálica, esta estructura podría permitir el acceso de moléculas derivadas de la

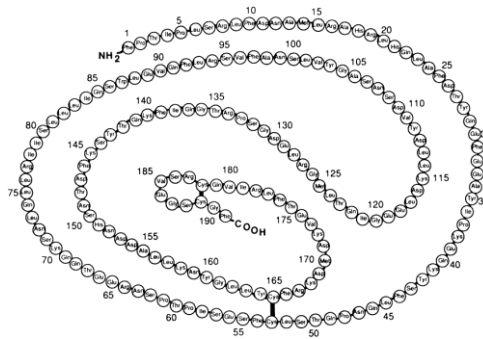
circulación general hacia el hipotálamo. No obstante, esto es impedido por la presencia de cuatro subtipos de células bipolares endimogliales especializadas llamadas tanicitos o células tipo glía radiada. El nombre de tanicitos se compone de la palabra griega *tanus* que significa elongado y *cito* célula. Estas células poseen dos características distintivas: poseen un proceso distal que yace ya sea sobre el plexo capilar primario, y constituyen los tipos celulares  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , o sobre las células del parénquima hipotalámico, y constituyen los tipos celulares  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ; y poseen un proceso proximal que termina en las paredes del piso del tercer ventrículo y que está en contacto con el líquido cefalorraquídeo (Véase Figura 2.1.1B). Tanto la pared ventral como la ventral-lateral del piso del tercer ventrículo contienen exclusivamente cuerpos celulares de tanicitos, mientras que su parte más dorsal contiene únicamente células endimales carentes de procesos celulares. Debido a lo anterior se han denominado estas regiones como zona tanicítica y zona endimal, respectivamente. Existe una tercera zona denominada zona de transición la cual se localiza entre las zonas endimal y tanicítica que contiene tanto tanicitos tipo  $\alpha 1$  como células endimales ciliadas. Los tanicitos  $\alpha 1$  proyectan hacia la zona dorsal del núcleo dorso-medial, que participa en la conducta de ingesta, mientras que los tanicitos tipo  $\alpha 2$  lo hacen hacia el núcleo arcuato (NAr), que contiene neuronas que controlan la secreción adenohipofisiaria, y hacia la región lateral de la *pars tuberalis* proyectan hacia los vasos capilares (Mullier *et al.*, 2010). Algunos procesos distales de los tanicitos tipo  $\beta 2$  separan las terminales nerviosas a nivel del espacio peri-vascular de las neuronas que controlan la secreción de gonadotropinas, regulando el paso de moléculas al plexo capilar (Mullier *et al.*, 2010).

## **2.2.Hormona de crecimiento.**

### 2.2.1. Breve descripción

La GH es una hormona multifuncional cuyas funciones a nivel celular pueden dividirse en tres categorías: metabólicas, mitogénicas y de diferenciación. La hormona GH está compuesta por dos cadenas helicoidales conectadas por asas de varios tamaños y no posee un eje de simetría (Véase Figura 2.2.1). El receptor a la GH (GHR) pertenece a la familia clase 1 de receptores

hematopoiéticos y de citosinas. La GH posee regiones que le permiten la unión a su receptor dimerizado, una región de 11 amino ácidos (a.a.) (sitio 1) que favorece la unión inicial al receptor (GHR), y una segunda región de 31 a.a. (sitio 2) que permite la formación y estabilización del complejo trimérico GHR-GH-GHR.



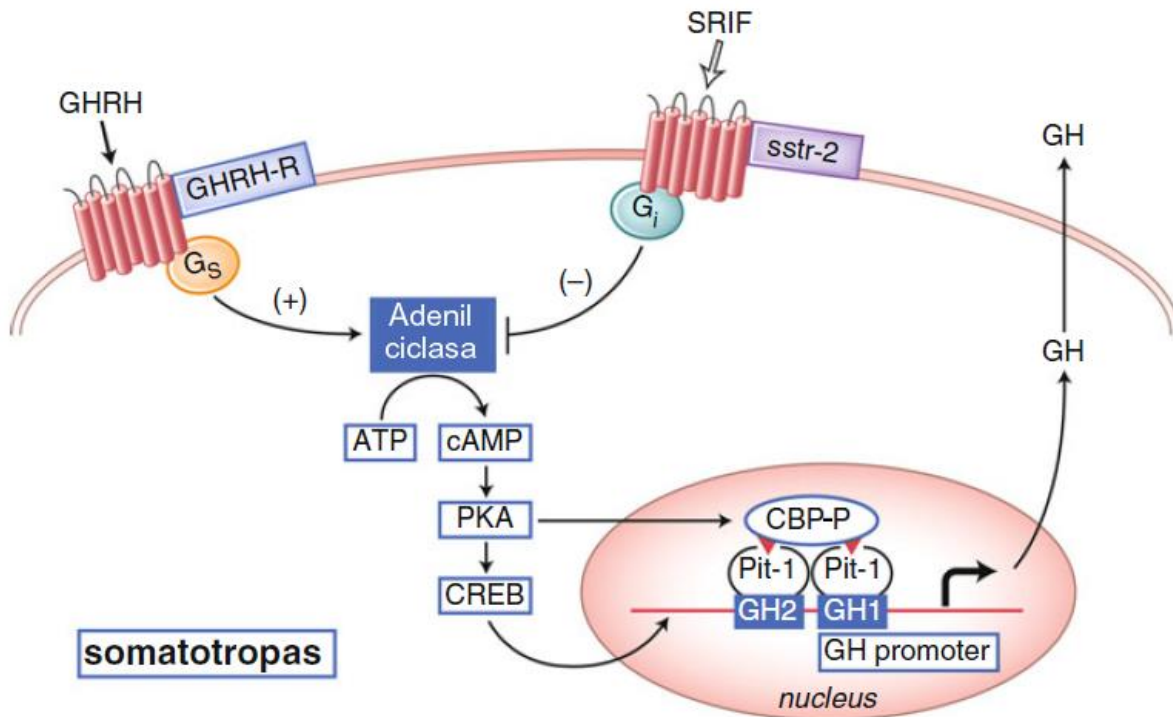
**Figura 2.2.1** La hormona de crecimiento (GH), o somatotropina, es una hormona polipeptídica conformada por 191 amino ácidos (Tomado de Cogan & Phillips, 1995)

### 2.2.2. Control hipotalámico sobre la secreción de GH

En 1973 se identificaron dos factores hipotalámicos que inducían en la célula somatotropa tanto la liberación y síntesis, el factor de liberación de la hormona de crecimiento, actualmente llamado hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH, de sus siglas en inglés) como la inhibición, el factor inhibidor de la hormona de crecimiento actualmente llamado somatostatina (SS). La GHRH es un péptido conformado por entre 40 y 44 a.a., que es sintetizado por neuronas cuyos somas se localizan en el NAr. La SS es un tetradecapéptido sintetizado por algunas neuronas del núcleo para-ventricular hipotalámico (NPV) y del órgano sub-comisural. Tanto la GHRH como la SS de origen hipotalámico son liberadas al sistema porta hipotálamo-hipofisiario, a nivel de la zona externa de la EM, y viajan por vía sanguínea a los capilares del plexo secundario de la hipófisis para alcanzar sus correspondientes receptores en las células somatotropas.

Éstas dos hormonas presentan acciones antagónicas no competitivas, ya que mientras la activación del receptor a GHRH (GHRH-R) activa a la subunidad  $G_{\alpha s}$  de las proteínas G y

activa la vía del AMPc/PKA(3',5'-adenosina monofosfato cíclica/proteína cinasa A) a través de la activación de la adenilato-ciclasa (AC), la activación del receptor a la SS activa a la subunidad  $G_{\alpha i}$  de las proteínas G y media el bloqueo de la síntesis de AMPc por la inhibición de la AC (Figura 2.2.2).



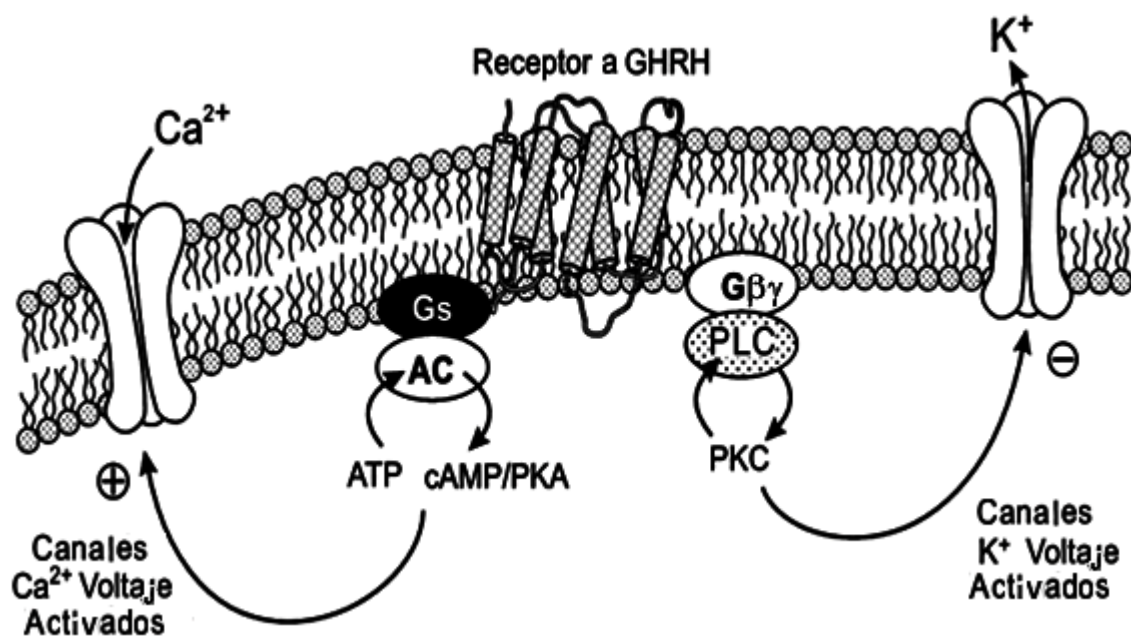
**Figura 2.2.2.** La activación de los receptores a GHRH y a Somatostatina (SRIF) induce acciones antagónicas no competitivas, ya que ambas activan las subunidades de las proteínas G tipo alfa,  $G_{\alpha s}$  y  $G_{\alpha i}$ , respectivamente. Mientras que la activación de la subunidad  $G_{\alpha s}$  estimula la producción de AMPc, la activación de la subunidad  $G_{\alpha i}$  la inhibe (Tomado de Romero y cols., 2013).

La activación de la AC causa un incremento intracelular del AMPc, a partir del ATP intracelular, que permite la activación de la PKA. La PKA fosforila los canales de calcio voltaje dependientes induciendo su activación junto con el proceso de despolarización inducido por la fosforilación-inhibición de los canales de potasio rectificadores por la proteína cinasa C (PKC, de sus siglas en inglés). Este último evento depende de la activación de la vía de la fosfolipasa C (PLC)-PKC por el complejo  $\beta\gamma$  del complejo de proteínas G activado por el receptor (Figura 2.2.3). La activación de esta vía incrementa aún más el calcio citosólico al liberarse el inositol trifosfato (IP3) del fosfoinositol difosfato (PIP2), por la acción de la PLC, y activar a su receptor-canal de calcio en

el retículo endoplásmico. Los incrementos en las corrientes de calcio y la salida del calcio del retículo endoplásmico inducidas por la activación del GHRH-R conducen a un incremento en calcio intracelular y la secreción de GH (Chen *et al.*, 2000).

Por el contrario, los receptores a somatostatina (SS-R) de las células somatotropas, que también pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G se acoplan al complejo G $\alpha$ i/o activándolo, el cual interacciona con la AC inhibiéndola, lo que causa una disminución en los niveles de AMPc y una reducción en la activación de los canales de Ca $^{2+}$  (Law *et al.*, 1993).

A nivel de expresión del gen de la GH, mientras que la activación del GHRH-R involucra la fosforilación de CREB y la regulación positiva del gen Pit-1, la SS no afecta la expresión del gen a GH o la producción de la hormona GH (Müller *et al.*, 1999).



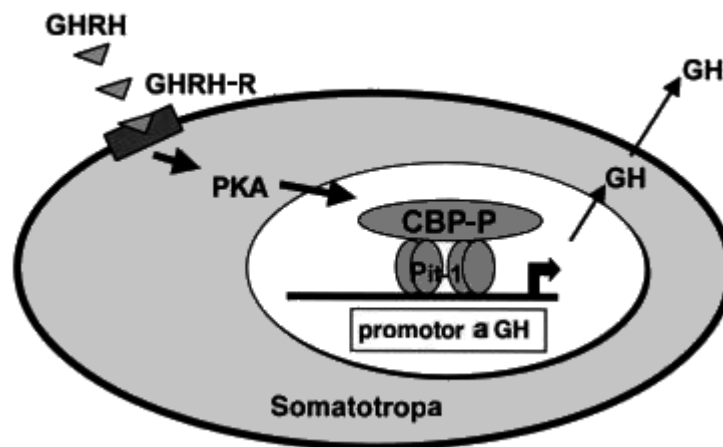
**Figura 2.2.3.** El GHRH-R es miembro de la familia de receptores B-III (que poseen homología en su dominio N-terminal extracelular) que a su vez pertenece a la súper-familia de receptores hepta-transmembranales acoplados a proteínas G. El GHRH-R se asocia a proteína G $\alpha$ s que activa al menos dos vías de señalización, 1) la vía de la adenilato ciclasa/AMPC/PKA AMPc-mediada, a través de la subunidad G $\alpha$ s, y 2) una vía independiente de AMPc mediada a través de la G $\beta\gamma$  que activa a la PLC y modifica las conductancias de los canales de potasio rectificadores (Tomado de Chen *et al.*, 1990).

### 2.2.3. Expresión del gen a GH

El transcripto de la GH contiene cinco exones y cuatro secuencias de intervención (intrones) con codones de inicio y paro de la traducción, los cuales están localizados en el exón 1 y 5, respectivamente. El gen de la GH pertenece a la familia de genes de “la hormona de crecimiento” (o familia somatotropina/prolactina), los cuales incluyen a la PRL, la somatotropina coriónica 1 y 2, y la somatotropina coriónica tipo-1. El gen de la GH contiene un promotor hipófisis-específico que contiene dos sitios para Pit-1 (GH-I y GH-II). Casi todos estos genes, salvo el gen de la PRL que se expresa en el cromosoma 6p22.3, son expresados en el cromosoma 17q23.3 de forma tejido-específica. En la hipófisis, la activación del gen a GH (así como de gen de la PRL y de la THS) requiere del factor de transcripción Pit-1, el cual es un factor de 291 a.a. y 33 kDa perteneciente a la familia de factores de transcripción POU (Pit-Oct-Unc) y que es hipófisis-específico, cuyo papel es el de incrementar la actividad del promotor a GH. Este factor, también llamado factor 1 de la hormona de crecimiento, contiene dos dominios proteicos separados por una región no conservada de 15 a.a., ambos dominios son necesarios para la unión por alta afinidad al ADN. El primer dominio, llamado POU-específico (POU<sub>S</sub>), comprende una región de 75 a.a. aproximadamente y forma cuatro  $\alpha$ -hélices; el segundo dominio, llamado POU-homeo (POU<sub>HD</sub>), comprende una región de 60 a.a. cercana al C-terminal y forma tres  $\alpha$ -hélices (Cohen *et al.*, 2006).

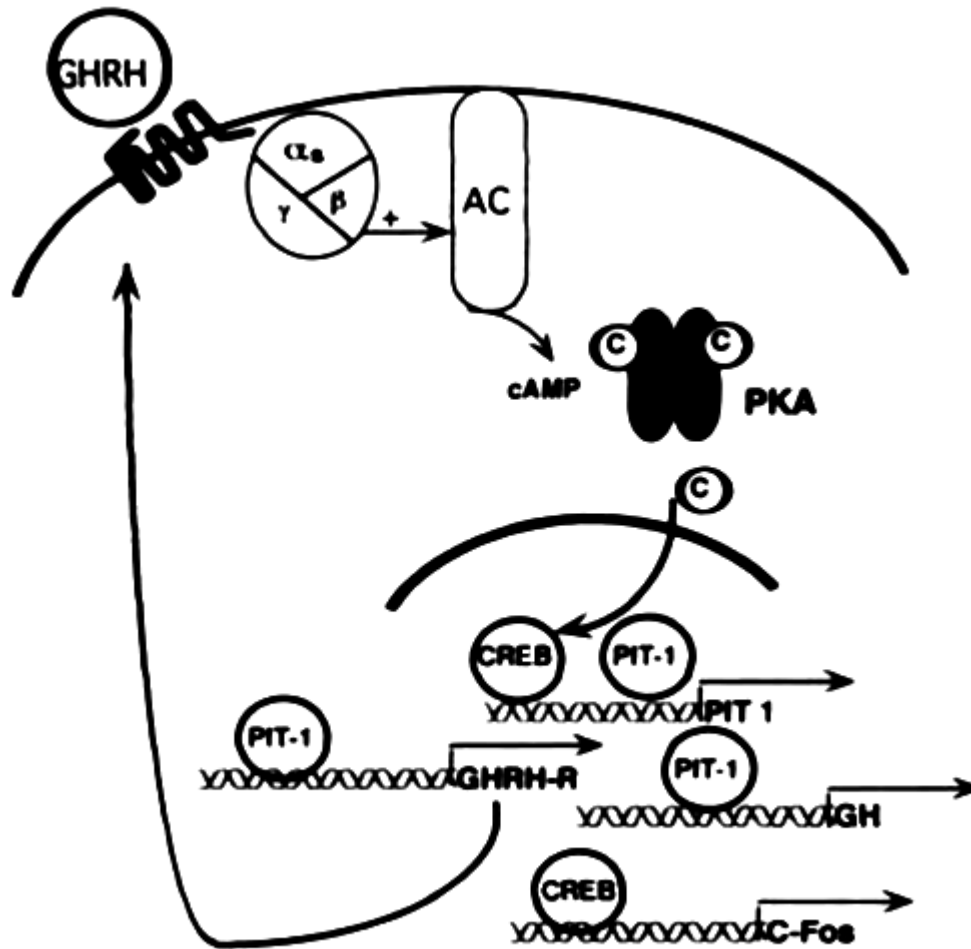
Pit-1 forma dímeros sobre el ADN mediante la interacción de su dominio POU<sub>S</sub> de una molécula con el C-terminal del dominio POU<sub>HD</sub> de la otra molécula. Pit-1 contiene un dominio de trans-activación con residuos de serina y treonina en la región N-terminal que es necesario para reclutar a la proteína de unión a la “proteínas de unión a elementos de respuesta al AMPc” (CREB, de sus siglas en inglés) (CBP) en su estado fosforilado (CBP-P) (Figura 2.2.3). CBP, que es una proteína nuclear de 270 kDa y que posee dos sitios de unión a Pit-1, estando fosforilada en la región carboxilo terminal activa la trans-activación dada por CREB y Pit-1, aunque un sitio de fosforilación altamente conservado en Ser436 sirve de control para inducir la transcripción génica por la vía CBP-dependiente/CREB-independiente (Cohen *et al.*, 1999, Romero *et al.*, 2012).

Una vez activada CBP, ésta interactúa con las proteínas de unión a elementos de respuesta a AMPc tipo a (Cyclic AMP Response Element Binding Protein, CREBa, de sus siglas en inglés) fosforiladas, y junto con otro co-activador p300, se unen a secuencias consenso de ADN (TGACGTCA) presentes en la región proximal al gen promotor de la GH (Cohen *et al.*, 2006). La fosforilación de CREBa (en la Ser133) ocurre por la trans-localización al núcleo de las subunidades catalíticas de la PKA, las cuales previamente fueron liberadas por la unión del AMPc a cada una de sus dos subunidades reguladoras (Figura 3.2.5) (Bertherat, 1997). No obstante lo anterior, en humanos la CBP ha mostrado actuar de manera independiente de CREB, como un co-factor para la activación dependiente de Pit-1 de regiones promotoras de gen a GH mediante la vía de señalización activadas por la GHRH (Cohen *et al.*, 2006). La activación de CREB también promueve la expresión del factor de transcripción Pit-1, el cual incrementa también la transcripción del gen al GHRH-R (Figura 2.2.4) (Soloso *et al.*, 2008).



**Figura 2.2.3.** La síntesis y secreción de la GH a través de activación del GHRH-R depende de la fosforilación tanto de CBP como de CREBa. Por un lado, la activación río abajo del GHRH-R induce la liberación AMPc-mediada de las subunidades catalíticas de la PKA y su trans-localización al núcleo en donde fosforila a CREBa. Mientras que por el otro lado CBP fosforilada es reclutada por Pit-1, y entonces interactúan con CREBa fosforilada para unirse a secuencias consenso de ADN (TGACGTCA) presentes en la región proximal al gen promotor de la GH (tomado de Cohen *et al.*, 2006).





**Figura 2.2.4.** La transcripción del gen a GH depende de la acción de CREB (y Pit-1) que depende de la vía de la adenilato ciclasa/AMPC/PKA, AMPC-mediada por la activación del GHRH-R. Asimismo, la activación de CREB también promueve la expresión del factor de transcripción Pit-1, el cual incrementa también la transcripción del gen al GHRH-R (Tomado de Bertherat *et al.*, 1995).

## 2.3. Control periférico de la secreción de GH hipofisiaria por la grelina y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF)-1.

### 2.3.1. Grelina

La grelina es un secretagogo endógeno de la GH cuyo nombre proviene de ghre, una raíz indoeuropea que significa crecimiento (Kojima *et al.*, 1996), es una hormona peptídica de 28 a.a. (GSSFLSPEHQ-KAQQRKESKK-PPAKLQPR) y la grelina murina difiere de la forma humana en dos a.a. en las posiciones 11 y 12. La forma activa (grelina acilada) posee un motivo O-n-octanoil que es una cadena de ácidos grasos saturada (ácido octanoico) unida a la serina 3 (SER3) y que es agregado durante el procesamiento pos-transcripcional (Kojima *et al.*, 1996). En la circulación general la vida media de la grelina es de 10 a 30 minutos, para la grelina acilada y la des-acilada, respectivamente. La grelina activa representa entre el 10-20% de la grelina total (Chanoine, 2005) y es secretada a la circulación mayor por células entero-endócrinas de la capa mucosa del *fundus* estomacal como respuesta a periodos prolongados de ayuno (Lee *et al.*, 2002).

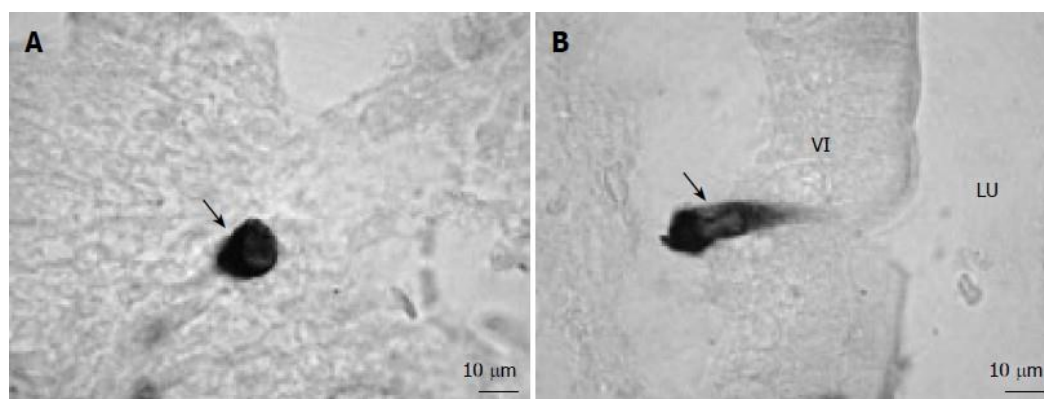
En humanos adultos, el tratamiento con GH o la vagotomía disminuyen los niveles de expresión estomacal de grelina. Mientras que una dieta rica en grasas disminuye los niveles plasmáticos de grelina, una dieta hipo-proteica los incrementa (Lee *et al.*, 2002).

El receptor a grelina es un receptor a secretagogos de GH tipo 1a (GH Secretagogue receptor GHSR de sus siglas en inglés), es un receptor hepta-transmembranal asociado a la proteína G con tres asas tanto intra- como extra-celulares. Aunque se ha reportado que existen dos subtipos de receptores a grelina, uno con actividad biológica, que es conocido como Ghsr-1a, y otro sin aparente actividad biológica denominado Ghsr-2b. La activación del Ghsr-1a induce un incremento en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular (Camiña *et al.*, 2003) mediante la activación de la vía del fosfatidil-inositol/fosfolipasa C (PI-PLC) a través de la actividad de su subunidad  $G11\alpha$ , lo que consecuentemente induce potenciales de acción a través de canales de calcio tipo L y T (Stojilkovic, 2012). El Ghsr-1a se expresa en las neuronas GHRH-érgicas del NAr hipotalámico (Albarrán-Zeckler & Smith, 2013), en la hipófisis, páncreas, corazón, glándula adrenal, y tiroides (Guan *et al.*, 1997).

### 2.3.2. Secreción de grelina entérica

La grelina estimula la secreción de GH, la ingesta de alimento, la ganancia de peso corporal y estimula la motilidad gástrica.

Las células entero-endócrinas presentan los niveles de expresión y contenido hormonal más altos del tracto digestivo, mismos que van en decremento conforme se recorre el tracto, siendo la región del colón la que expresa los niveles de grelina más bajos (Lee *et al.*, 2002). Existen dos tipos de células que secretan grelina dentro del tracto digestivo, unas son células del tipo abiertas hacia el lumen y las otras son del tipo de células cerradas hacia al lumen (Figura 2.3.2). La densidad de ambos tipos celulares va disminuyendo desde el estómago hasta el colón y el número del tipo celular abierta incrementa con la edad (Zhao & Sakai, 2008). La grelina también participa en la regulación central de la secreción de ácido gástrico y la motilidad duodenal a través de la activación de neuronas de los núcleos del tracto solitario y del núcleo dorsal motor del vago (Date *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 2000).



**Figura 2.3.2.** Existen dos tipos de células entero-endócrinas grelina positivas, unas son células del tipo cerradas hacia el lumen (flecha en A) y las otras son del tipo de células abiertas hacia al lumen (flecha en B). VI: vellosidad, LU: lumen. Tomada de Zhao & Sakai (2008).

### 2.3.3. Factor de crecimiento tipo insulina (IGF)-1

El IGF-1 es una proteína de 70 a.a. cuyas acciones, a corto y largo plazo, involucran efectos metabólicos y acciones que promueven el crecimiento, respectivamente. El receptor de la IGF-1 (IGF-1R) se expresa de forma ubicua, salvo en los linfocitos maduros, el tejido adiposo, y los hepatocitos. Aunque en estos últimos se expresan hasta la segunda semana de vida postnatal y lo re-expresan durante un daño hepático (Caro *et al.*, 1988; Beyer *et al.*, 2008).

El IGF-1, liberado principalmente desde el hígado (75 %) actúa sobre un receptor (IGF-1R) de naturaleza glicoprotéica. A diferencia de la mayoría de los receptores a factores de crecimiento que son polipéptidos monoméricos trans-membranales de una sola cadena, el receptor al IGF-1, así como el de la insulina, es un dímero que está compuesto por dos subunidades extracelulares y dos subunidades trans-membranales que forman un hetero-tetrámero conformado por: dos subunidades extracelulares alfa que poseen el dominio de unión al ligando, y por dos subunidades beta trans-membranales las cuales poseen dominios con actividad tirosina cinasa (configuración  $\alpha 2\text{-}\beta 2$ ). La unión del IGF-1 al IGF-1R induce la auto-fosforilación y activación del receptor, dando como consecuencia su interacción con moléculas citoplasmáticas a través de la unión del dominio B amino terminal de 29 a.a. Las dos principales vías que se activan son Ras/Raf/MAPK y la vía de la fosfatidil-inositol 3 (PI3). La señalización del IGF-1R incluye la fosforilación de Shc y del sustrato del receptor a insulina (IRS)-1, -2, -3, y -4, y que sirven como proteínas de andamiaje para activar vías como PI3K, Akt, MAPK, entre otras (Eppler *et al.*, 2007; Kappeler *et al.*, 2008).

Tanto la grelina acilada como el IGF-1 hepático, regulan la secreción de GH (Yamazaki *et al.*, 2001; Skottner, 2012), y a diferencia del fenómeno antagónico entre la GHRH y la SS, estas hormonas no presentan efectos antagónicos directos en la secreción de GH. Esto se debe a que la unión de grelina acilada a su receptor Ghsr-1a, que dentro de la hipófisis se localiza exclusivamente en las somatotropas, estimula la secreción de GH, mientras que la activación de los receptores a IGF-1, que se expresan tanto en las somatotropas como en algunas corticotropas, inhibe la expresión de la GH (Honda *et al.*, 1998, Eppler *et al.*, 2007). Es decir, mientras que la activación del Ghsr-1a induce el incremento en los potenciales de acción espontáneos

(Domínguez *et al.*, 2007; Stojilkovic, 2012), la activación del IGF-1R reduce la tasa de transcripción de la GH a través de activar la vía de la PLC $\gamma$ -PKC, pero no Pit-1, lo que trae como resultado una disminución en la afinidad de la CBP por Pit-1, y en consecuencia, la disminución del complejo Pit-1/CBP y por lo tanto la transcripción de la GH, sin afectar los niveles de ARNm de Pit-1 (Romero *et al.*, 2012; Voss *et al.*, 2000). De manera interesante se ha reportado que la activación del IGF-1-R por el IGF-1 puede modular la secreción de GH a través de modificar los niveles de expresión de los GHRH-R y GHS-R (Wallenius *et al.*, 2001).

La activación del Ghsr-1a hipofisiario tiene un menor efecto y con menor duración que la GHRH sobre la liberación de GH *in vitro*, y aunque son mecanismos de acción diferentes la co-estimulación de grelina acilada con la GHRH no tiene efecto sinérgico ni aditivo (Yamazaki *et al.*, 2002). Sin embargo, el pre-tratamiento de células hipofisiarias con SS abole la secreción de GH tanto la inducida por la GHRH como por la grelina (Yamazaki *et al.*, 2002).

Por otro lado, una sola administración de grelina o su administración crónica, por mini-bombas osmóticas, no modifican los niveles de ARNm de la GH, contrario al efecto de la GHRH que no sólo estimula la liberación de GH, sino también incrementa sus niveles de ARNm (Dale *et al.*, 2000). En ese mismo tenor, la administración crónica de grelina durante seis días incrementa 100 veces las concentraciones plasmáticas de GH, pero un mayor tiempo de estimulación conduce a una disminución en sus concentraciones (Dale *et al.*, 2000). Lo anterior indica que las células somatotropas son refractarias a la acción continua de la grelina acilada, posiblemente a través de mecanismos de internalización del receptor, esto se infiere ya que la estimulación con KCl induce liberación de GH (Yamazaki *et al.*, 2002).

A nivel central, la grelina acilada actúa sobre receptores presentes en las neuronas GHRHérgicas del NAr del hipotálamo (Albarrán-Zeckler & Smith, 2013) estimulando la liberación de GHRH pero no la de SS (Dickson & Robinson, 1993). La grelina también induce la despolarización e hiper-polarización de las neuronas del NAr tanto orexigénicas (que coproducen NYP y el péptido relacionado al agouti (AgRP), NYP/AgRP) así como anorexigénicas (que contienen péptidos derivados del POMC), respectivamente. El ARNm de la grelina incrementa durante el ayuno y durante el estrés (Asakawa *et al.*, 2001), y la administración de la hormona induce la conducta de ingesta a través de su acción sobre las neuronas NPY/AgRP. Estas neuronas también son reguladas por la leptina y sus proyecciones van al núcleo para-ventricular hipotalámico (NPVh),

al núcleo dorso-medial del hipotálamo, y al área hipotalámica lateral, mismas que se desarrollan durante las tres primeras semanas de vida (Morash *et al.*, 2003; Steculorum *et al.*, 2015).

#### 2.3.4. La grelina durante el desarrollo

La hipófisis de los roedores expresa el gen de la grelina en mayor medida durante el desarrollo fetal y disminuye durante el desarrollo post-natal, y la expresión de su receptor fluctúa durante el desarrollo postnatal (Kamegai *et al.*, 1999). A nivel del NAr, el Ghsr-1a se expresa desde el día 6 de vida, pero es hasta el inicio de la ablactación (transición de una dieta exclusivamente láctea a una sólida), entre los días 10 y 14 de vida postnatal, que la grelina acilada favorece un incremento en las proyecciones nerviosas del NAr, independientemente de si las crías se alimentan normalmente o si son sometidas al ayuno (Steculorum *et al.*, 2014). De manera interesante, aunque la leptina en el adulto ejerce un efecto contrario al de la grelina sobre las neuronas NYP/AgRP, durante el periodo pre-destete la leptina ejerce un efecto estimulador sobre tales neuronas (Baquero *et al.*, 2014).

En la rata, durante el desarrollo fetal la grelina de origen pancreático es la principal fuente de grelina circulante siendo de 6-7 veces mayor que la grelina entérica (Chanoine & Wong, 2004), y su expresión no se detecta en hígado ni riñón (Chanoine, 2005). Niveles detectables del ARNm de la grelina en el estómago se observan hasta el día 17 embrionario (17e) (Torsello *et al.*, 2003), y la detección de células grelina inmuno-reactivas se observa hasta el día 18e (Nakahara *et al.*, 2002). Durante la primera semana de vida postnatal los niveles de expresión de la grelina pancreática disminuyen mientras que los de la grelina entérica, hipotalámica y del riñón se incrementan (Steculorum & Bouret, 2011). Esta disminución del ARNm de la grelina pancreática es paralela a una disminución abrupta, de seis veces, en los niveles de grelina total al nacimiento y que se mantienen así durante el periodo postnatal pre-destete (Chanoine & Wong, 2004). Sin embargo, los niveles circulantes de la forma activa de la grelina incrementan aproximadamente tres veces entre el día 21e y el primer día postnatal, pero decaen al inicio de la segunda semana de vida a niveles pre-natales (21e, 20 ng/g), con un pico al día 6 de vida (122 ng/g) de la grelina acilada de origen pancreático (Chanoine *et al.*, 2006).

Los niveles de expresión del ARNm de la grelina entérica incrementan al doble de sus valores entre la primera y segunda semana de vida, y a partir de este periodo puede observarse un patrón sexualmente dimórfico. Mientras que en los machos el incremento en la expresión de la grelina es gradual, en la hembra alcanzan niveles semejantes al adulto a partir de la tercera semana de vida (Sakata *et al.*, 2002; Zhao & Sakai, 2008). Lo anterior concuerda con un incremento en la densidad de células entéricas grelina-positivas, ya que los machos muestran un incremento dependiente de la edad, mientras que las hembras presentan un incremento significativo desde la primera semana de vida postnatal y cuyos valores son igualados en los machos hasta la quinta semana de vida (Zhao & Sakai, 2008).

### 2.3.5. El IGF-1 durante el desarrollo

El IGF-1 es secretado por la placenta durante el proceso de gestación y estimula en este órgano el transporte de todos los nutrientes que requiere el individuo en formación. Por otra parte, el feto sintetiza el IGF-1 y presenta concentraciones circulantes que se incrementan hasta el día del parto. La concentración del IGF-1 que presenta el neonato está directamente relacionada con su masa corporal. Los animales “knockout” al gen de la IGF-1 mueren (Liu *et al.*, 2000). En humanos se han reportado algunos casos de anormalidades genéticas del IGF-1, en los que se ha observado una función parcial del factor de crecimiento, y presentan restricción severa del crecimiento intrauterino así como microcefalia, sordera sensorial, retardo en el desarrollo y anormalidades metabólicas. Es bien conocida la función determinante del IGF-1 en el crecimiento fetal y postnatal temprano. En el desarrollo del Sistema Nervioso Central, se sabe que el IGF-1 se expresa abundantemente en muchas regiones del cerebro, teniendo un papel muy importante en los procesos de proliferación y organización del tejido neural. Por otra parte, el IGF-1 sérico atraviesa la barrera hemato-encefálica, participando en la señalización propioceptiva metabólica para que los centros nerviosos respondan a las variaciones en las condiciones del medio interno, como son los cambios en las concentraciones séricas de aminoácidos y glucosa (Schwartz *et al.*, 2000).

## 2.4. El efecto somatogénico y metabólico de la GH

La GH puede estimular la gluconeogénesis 1) a través de la conversión de aminoácidos glucogénicos, o a través de intermediarios como la conversión del lactato a glucosa (a través del ciclo de cori), o 2) mediante la glucólisis hepática a través del proceso de despolimerización del glucógeno a glucosa (Brooks *et al.*, 2007).

La producción de glucosa se da a nivel del hígado y de los riñones, y el principal regulador de sus niveles circulantes es la insulina. Durante el periodo postprandial existe un incremento en la insulina circulante que incrementa la captura de glucosa en los tejidos periféricos y disminuye la gluconeogénesis. La GH contrarresta los efectos de la insulina ya que incrementa los niveles séricos de glucosa y ácidos grasos, por lo tanto presenta una acción diabetogénica. La GH contrarresta en general los efectos de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos, pero comparte las propiedades anabólicas con la insulina. En circunstancias fisiológicas, la GH no afecta directamente el recambio total de glucosa. Sin embargo, hay evidencia de que la GH disminuye la oxidación de la glucosa, secundaria a aquella a la que estimula un aumento en la oxidación de los lípidos, además de inhibir la captación muscular de glucosa, sugiriendo que la GH redistribuye los flujos de glucosa a una vía no oxidante. Como la secreción de GH se inhibe por la ingestión de alimento, estas acciones son principalmente importantes en el periodo postprandial tardío o de ayuno (Wu *et al.*, 2010).

### 2.4.1. Receptor a GH

El efecto somatogénico y metabólico de la GH es mediado por dos proteínas codificadas por un sólo gen, que son el receptor a GH (GHR) de 4.2-4.7 kb y su forma soluble de 1.4 kb conocida como proteína de unión a GH (GHBP), esta última presenta mayor afinidad por la isoforma de 22 KDa de la GH. El GHR y su forma soluble difieren, dependiendo de la especie, ya sea a nivel de un corte alternativo del ARNm (1-1.4 kb en roedores) (Smith *et al.*, 1989; Baumbach *et al.*, 1989) o por un corte proteolítico en su forma anclada a nivel de membrana (humanos), en esta última el dominio extracelular es semejante pero el dominio trans-membranal y citoplasmático es



reemplazado por una sección corta de aminoácidos hidrofílicos que le confieren su secreción (Dannies, 2001; Frago & Chowen, 2005).

El GHR es un receptor superficial de un sólo paso trans-membranal N-glucosilado que carece de actividad cinasa. Este receptor se clasifica dentro de la súper-familia de receptores hematopoiéticos y de citosinas clase 1. La unión de la GH a un homo-dímero (GHR-GHR) pre-formado, a través de sus epítopes funcionales de 11 a.a. (sitio 1) y de 31 a.a. (sitio 2), induce un cambio conformacional en la región citoplasmática del receptor. Este cambio induce la activación de la cinasa de tirosina janus citoplasmática (JAK, de sus siglas en inglés), la cual se encuentra constitutivamente asociada a la región Box1, y que está contenida en los primeros 46 residuos de la porción citosólica de cada receptor (Kopchick, 2016). Una vez activado JAK2, fosforila los residuos de tirosina 487, 534, 566 y 627 en la cola citoplasmática del GHR que son sustrato del traductor de señal y activador de la transcripción (STAT, de sus siglas en inglés). El reclutamiento de STAT al complejo JAK2-GHR-GH-GHR-JAK2 provoca la fosforilación de STAT por JAK2 en el residuo Tyr699 con la consecuente disociación del complejo JAK2/STAT. Esta vía a nivel hepático, particularmente la vía de JAK2/STAT5b, regula la transcripción del IGF-1 y de la proteína ácido lábil (ALS, de sus siglas en inglés) del hígado (Zhu et al., 2001; Woelfle & Rotwein, 2004).

En roedores la GHBP se libera principalmente desde el hígado y su expresión así como del GHR incrementa con la edad (Tiong & Herington 1992). La GH sérica incrementa el ARNm del GHR y de la GHBP hepáticos así como también los niveles plasmáticos de GHBP y de la ALS, esta última estabiliza el complejo IGF/IGFBP (Carmignac *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 2007; Maiter *et al.*, 1992; Scott & Baxter, 1991).

#### 2.4.2. Regulación del ARNm del IGF-1 por la GH

La regulación del gen del IGF-1 es tejido específico y en la mayoría ellos la GH es el principal factor que induce su transcripción. No obstante, el 75 % de los niveles circulantes de IGF-1 se da como respuesta de la unión de la GH a su receptor hepático (Scott *et al.*, 1985; LeRoith *et al.*, 2001). En otros tejidos, como el adiposo, los niveles de expresión del ARNm de la IGF-1 son

significativos y dependen de la GH hipofisiaria (Yakar *et al.*, 1999), y durante el periodo postnatal pre-destete se encuentran en el mismo orden de expresión que en el hígado (Peter *et al.*, 1993).

Las acciones de la GH son rápidas y pasajeras, una inyección (i.p. 250 µg) de GH incrementa a las cinco horas los niveles de expresión del ARNm del IGF-1, alcanzando un máximo a las 10h, y descienden a las 30h, a niveles pre-inyección (Hepler *et al.*, 1990).

El gen de la IGF-1, con una longitud de 90 kb, consiste de seis exones que darán origen a una forma madura conformada por 70 a.a. de la IGF-1, a partir de múltiples transcriptos (Holthuizen *et al.*, 1991). El péptido maduro contiene cuatro dominios nombrados de forma similar que los dominios de la insulina. Un dominio B amino terminal de 29 a.a que se une al IGF-1R y a la IGFBP, un dominio C, un dominio A de 12 a.a., y un dominio D carboxilo (8 a.a.). Aunque la secuencia de estos dominios varía entre las especies, el IGF-1 y la IGFBP-3 son altamente conservados.

Los dos primeros exones, 1 y 2, del gen de la IGF codifican secuencias líderes 5' prima no traducidas, 5'UTR, o ARNm líder, que son mutuamente excluyentes y que contienen múltiples codones de inicio. El exón 1, en la rata, posee cuatro sitios de iniciación dispersos, 382, 343, 245, y de 30-40 pares de bases correspondientes a los sitios de inicio ss1, ss2, ss3, y ss4, respectivamente, y que están presentes en el extremo 3' prima del exón. En el exón 2, existe una agrupación de sitios de inicio de 50-70 pares de bases en el extremo 3' prima referidos conjuntamente como HS7 (Adamo *et al.*, 1991). Los transcriptos que utilizan los ss2, ss3, y ss4 generan un péptido-sígnal de 48 a.a., mientras que el transcripto que utiliza el ss1 del exón 1 o el HS7 del exón dos generan un péptido-sígnal de 22 y 21 a.a., respectivamente. De forma general, si el transcripto deriva del exón 1 se denomina ARNm tipo A (ARNm-A) o de clase 1, y si deriva del exón dos se denomina ARNm del tipo B (ARNm-B) o de clase 2. Este último genera una diversidad de transcriptos del IGF-1, 18 en la rata, cada uno con diferencias en su estabilidad y van de 1 a 10 kb de largo.

A diferencia de los primeros exones, los exones 3 y 4 son altamente conservados y dan origen a los dominios B, C, A, y D de la forma madura de la IGF-1. El dominio B se origina del exón 3 y los dominios C, A, y D del exón 4. El carboxilo terminal constituye un péptido E, con 16 a.a. derivados del exón 4 y con una secuencia variable derivada por inclusión/exclusión de los exones 5 y 6. La exclusión del exón 5 en la rata da origen al péptido Ea con 35 a.a. y con dos

posibles sitios de N-glicosilación; la inclusión del exón 5 genera un péptido de 41 a.a. llamado Eb; ambas conformaciones de los exones 5 y 6 tienen una secuencia 3'UTR común, aunque el axón 6 es un sitio de poliadenilación (Oberbauer, 2013).

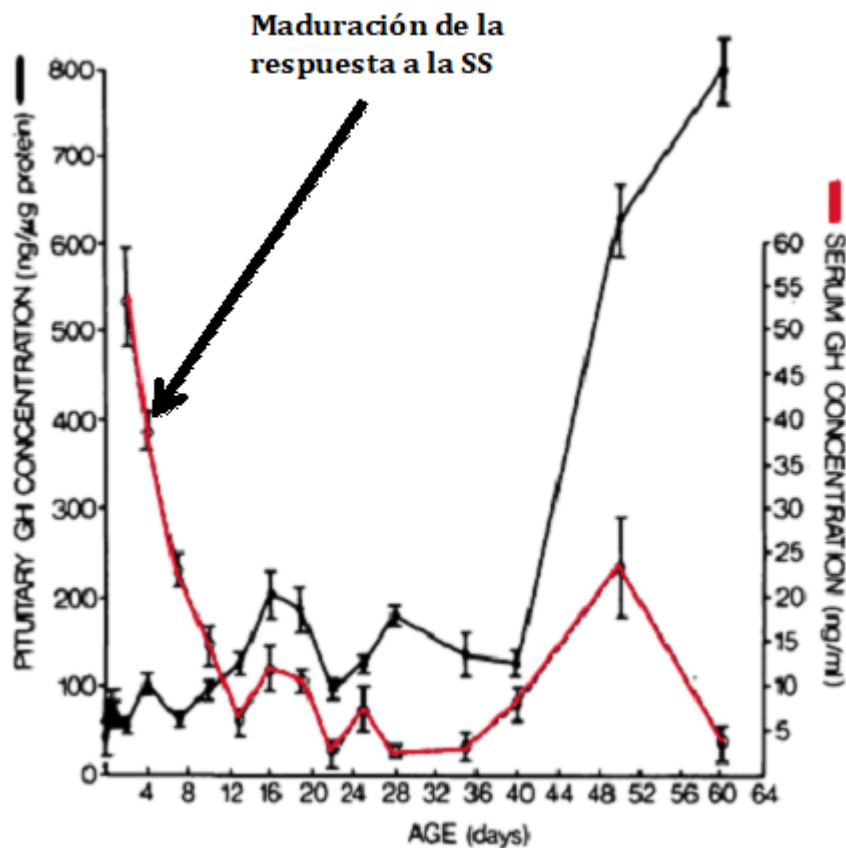
#### 2.4.3. Proteínas de unión a la IGF-I (IGFBPs).

La IGF-1 sérica se une principalmente a la IGFBP-3 y en menor medida a la IGFBP5, y junto con la ALS forma una terna que prolonga la vida media de la IGF-1. Durante el desarrollo fetal abunda la IGFBP1 y 2, mientras que es baja la IGFBP3.

#### 2.4.4. Desarrollo postnatal del eje GH-IGF-1

Como ya se mencionó anteriormente, los roedores presentan dos fases en el crecimiento, una que es independiente de la GH y otra que es dependiente de la GH. Esta última es evidente en la etapa juvenil. No obstante lo anterior, las señales que controlan la secreción de la GH se establecen antes del nacimiento, y una regulación fina sobre el control inhibitorio por parte de la SS se establece durante la primera semana de vida. Durante este periodo postnatal temprano las células somatotropas cambian su sensibilidad ante la SS y ante la GHRH (Figura 2.4.4). Es decir, en ratas de 5dpn dosis bajas (1 ng/100 g de peso corporal) de un compuesto sintético (hpGRF-40) que provoca la liberación de GH, induce un incremento de 3 veces en la liberación de esta hormona, mientras que en ratas de 25 dpn se requiere de una mayor dosis (500 ng/100 g p.c.) para inducir apenas un incremento al doble (Cella *et al.*, 1985). Esto se debe a que durante la primera semana de vida las concentraciones hipotalámicas de SS son bajas, es decir al 2dpn son 9 veces menores que al día 28. Asimismo, la respuesta ante la SS en las células somatotropas se observa a partir del 5 dpn (Rieutort, 1981). De manera interesante, durante este periodo las concentraciones séricas de GH son altas ( $53.5 \pm 5.7$  ng/ml, al 2dpn) y van disminuyendo progresivamente, desde un 50 % al día ocho de vida hasta una caída de 9 veces al día 13dpn respecto del día dos de vida (Walter *et al.*, 1977) (Figura 3.4.1). Por el contrario, el contenido de GH hipofisiario es bajo y va incrementando con la edad, esto debido a que las células

somatotropas están bajo la acción constante de la GHRH y el efecto de la inhibición por parte de la SS es mínimo.



**Figura 2.4.4. Durante el desarrollo pre-natal y postnatal temprano la GH no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento.** En la gráfica se observa que las concentraciones de GH séricas (línea roja, eje vertical derecho) decaen hasta un 50 % al día 8 de vida, no obstante, el contenido hipofisiario de GH es bajo e incrementa hasta después del primer mes de vida. La caída en los niveles séricos de GH puede explicarse en respuesta a la maduración de la respuesta de las células somatotropas ante la acción de la somatostatina (SS) entre los días 5-7 de vida. Asimismo, las concentraciones de GH hipofisiarias (línea negra, eje vertical izquierdo) van incrementando con la edad. Tomado de Walter *et al.*, 1977

Aunque los niveles séricos de GH son altos durante los primeros días, la participación del IGF-1 sérico, estimulada por la activación del GHR hepático, no toma relevancia sobre el crecimiento longitudinal sino hasta la etapa adulta. Ratones que carecen de STAT5b hepática muestran diferencias significativas en los niveles del IGF-1 hepático, mientras que aquellos mutantes que

sobre expresan la GH muestran un incremento significativo en la talla y en las concentraciones del IGF-1 respecto del fenotipo silvestre hasta las 12 semanas de vida (Teglund *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2015). Asimismo, tanto los ratones mutantes deficientes en el IGF-1 hepático (LID, de sus siglas en inglés) así como los ratones transgénicos con bloqueo de la expresión del *igf-1* hepático (con una reducción del 75% del IGF-1 circulante), no muestran diferencias en el crecimiento esquelético apendicular (*id est*, extremidades), aunque sí en el crecimiento esquelético axial durante la etapa adulta respecto al fenotipo silvestre. Asimismo, muestran un incremento en los niveles séricos de GH con hiper-insulinemia e insensibilidad muscular a la insulina (Yakar *et al.*, 1999, 2001; Tang *et al.*, 2005). Estos trabajos muestran que la acción de la GH sobre el crecimiento somático en roedores, mediado por la expresión y síntesis del IGF-1, es mínima durante las primeras semanas de vida.

#### 2.4.5. Papel de la GH durante el periodo postnatal temprano (lactancia)

Las hormonas esteroideas, los ácidos grasos, y la glucosa, también participan en la secreción de GH, pero dado que son metabólicamente regulados por la GH, esta hormona se considera una hormona metabólica (Sperlin, 2016). Se conoce que la GH promueve el crecimiento a través de la acción de la IGF-1, no obstante, muchas de sus acciones son ejercidas de manera directa sobre diferentes tejidos (Le Roith *et al.*, 2001a; Møller & Jørgensen, 2009; Berga-Roller & Sheridan, 2017). Aunque las acciones de la GH no son indispensables para el crecimiento prenatal, son cruciales para el crecimiento postnatal (Le Roith *et al.* 2001). De manera interesante las concentraciones séricas de GH son altas durante los primeros días de edad, pero decaen a cerca de la mitad de su valor a partir del cuarto día de vida y continúan cayendo hasta el final de la segunda semana de vida para mantenerse así durante el resto del periodo de ablactación (Kacsoh *et al.*, 1989).

En el periodo post-destete los niveles de GH incrementan nuevamente y en la etapa juvenil, con la maduración del tejido gonadal, los niveles de GH circulante alcanzan picos de concentración mayores a los observados durante el periodo de amamantamiento (Edén, 1979).

#### 2.4.6. La relación madre-cría en los roedores y las concentraciones séricas de GH

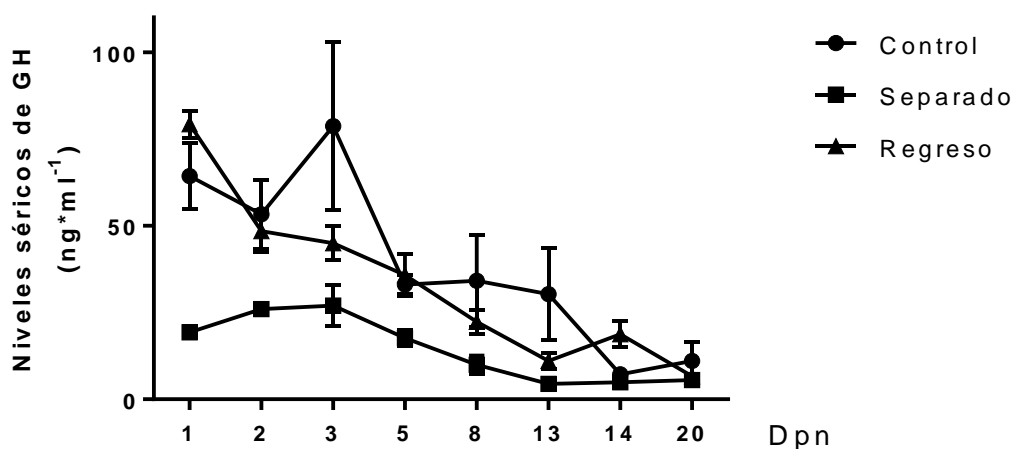
Junto con los cambios en la regulación neuroendócrina de la secreción de GH, que ocurren durante el periodo del desarrollo postnatal previo al inicio de la ablactación, y en el que se observa una hipersecreción de GH (Figura 2.4.4 y Figura 2.4.6, círculos cerrados), algunos factores maternos contribuyen a la regulación de su secreción (Kuhn *et al.*, 1978; Nagy *et al.*, 1986; Kacsóh *et al.*, 1990). Esto queda de manifiesto cuando a las crías se les separa de sus madres por dos horas, y se observa que presentan una caída significativa en los niveles séricos de GH. Este fenómeno está presente en los animales neonatales y hasta el 13dpn (Figura 2.4.6, cuadros cerrados). No obstante, esta caída en los valores séricos de GH se reestablecen si a las crías se les permite succionar por 30 minutos posterior a esta separación (Figura 2.4.6, triángulos cerrados). La disminución en las concentraciones séricas de GH no está en función del tiempo que las crías permanecen separadas, ya que se ha observado que la separación materna, por al menos 60 minutos y hasta seis horas en crías de 10dpn, induce una disminución del 57 % en las concentraciones séricas de GH y una disminución del 45 % en la actividad de la ornitina descarboxilasa cerebral (ODC) en relación al grupo control, o sea las crías no separadas. Esta enzima es un indicador de crecimiento y diferenciación (Tabla 1). Es más, la disminución tanto en las concentraciones séricas de GH así como en la actividad de la OCD pueden ser revertidas si a las crías se les regresa con sus madres por al menos 15 minutos (Kuhn *et al.*, 1978).

**Tabla 1. La separación de la madre induce una reducción en las [GH] séricas y de la actividad de la ODC cerebral en la cría (10dpn).**

Condición experimental		Hormona de crecimiento		Actividad de ODC cerebral
	N	% del control $\pm$ EEM ( $29 \pm 1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} = 100\%$ )	n	% del control
Sin separación materna	30	$100 \pm 3$	40	$100 \pm 10$
Separación materna				
1 hora	10	$53 \pm 8^*$	6	$58 \pm 7^*$
2 horas	16	$60 \pm 6^*$	6	$36 \pm 7^*$
6 horas	5	$59 \pm 12^*$	6	$41 \pm 3^*$
Separados y reunidos				
15 minutos	5	$155 \pm 32$		
1 hora	8	$99 \pm 7$	6	$252 \pm 17^*$
2 horas	13	$94 \pm 7$	6	$268 \pm 31^*$
4 horas	5	$100 \pm 4$	6	$150 \pm 8^*$

\* Diferencias estadísticas respecto del control ( $P < 0.05$ , prueba t de Student). Los valores se expresan como el porcentaje de las ratas no separadas (control)  $\pm$  error estándar de la media. Tomada de Kuhn *et al.*, 1978

En relación a este fenómeno, se ha reportado que la estimulación táctil, que consiste en la estimulación táctil sobre el dorso de la cría a través del uso de un pincel y realizando movimientos de manera antero-posteriores que simulan el lamido materno (Shanberg *et al.*, 1984), previenen la caída abrupta de los niveles circulantes de GH observados ante la separación materna (Kuhn *et al.*, 1978).

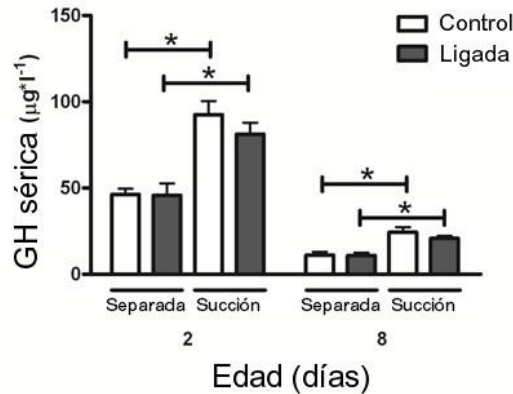


**Figura 2.4.6.** Efectos de la separación materna y el subsecuente regreso sobre los niveles séricos de GH durante el periodo de lactancia en ratas (los datos representan la media  $\pm$  EEM). Como se mencionó anteriormente, los niveles séricos de GH son elevados durante la primera semana de vida, no obstante, van disminuyendo hasta alcanzar valores del 93% menores al 14dpn con respecto al 1dpn. A un grupo “separado” (por 2h) se le permitió succionar (regreso) por 30 minutos. Entre el 1dpn y 14dpn existen diferencias estadísticas entre los grupos experimentales. Tomado y modificado de Kacsóh *et al.*, 1989.

A pesar de lo anterior, Kacsóh y colaboradores (1990) concluyeron que la succión es el componente crítico que modula los cambios en los niveles de GH séricos ante la separación materna. Ellos observaron que después de la separación, las concentraciones de GH circulantes se elevan si a la cría se le permitía succionar un pezón ligado, a nivel del ducto lácteo principal, o un pezón que aporta leche (Figura 2.4.6.1).

Otro componente importante que modifica los niveles de GH es la leche materna (Kacsóh *et al.*, 1992). Aunado a sus componentes nutricionales (Keen *et al.*, 1981) la leche contiene hormonas y

factores de crecimiento que incluyen a la hormona liberadora de GH (GHRH) (Kacsóh *et al.*, 1989; véase también Melo, 2015).



**Figura 2.4.6.1.** Efectos de la succión con o sin ingesta de leche sobre los niveles séricos de GH en ratas de 2dpn y 8dpn (los datos representan la media± EEM). A madres en día de lactancia 2 u 8, y cuyo ducto principal de leche les fue ligado (barras grises) o no (barras blancas), se les permitió amamantar por 30 minutos a crías de 2dpn y 8dpn posterior a una separación del nido de 6h. \*P< 0.0001. Tomado y modificado de Kacsóh *et al.*, 1990.

En el estudio realizado por Kacsóh y Grosvenor (1991), en el que se analizaron las vías colinérgicas y serotoninérgicas que regulan la secreción basal de GH, se determinó que la caída en las concentraciones séricas de GH está mediada por un mecanismo de control independiente de la regulación hipotálmica GHRHérgica o Somatostatinérgica, mismo que se propone está sostenido por la succión a través de mecanismos aún desconocidos.

#### 2.4.7. Variaciones en la dieta de las crías de roedores durante la lactancia

Durante el periodo de ablactación el incremento de carbohidratos en la dieta requiere cambios en la regulación del metabolismo energético (Blass & Teicher, 1980; Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006). La transición de dieta láctea a sólida (ablactación) va acompañada de cambios, tanto morfológicos como a nivel de la función enzimática y digestiva del intestino. Con base en lo anterior, el periodo de desarrollo postnatal se ha dividido en tres periodos: 1) periodo de amamantamiento (lactancia temprana), en el cual sólo se ingiere leche; 2) periodo de ablactación



(lactancia media y tardía), en el cual se ingiere tanto leche como dieta sólida y agua; y 3) periodo post-destete, en el cual se ha dejado de ingerir leche (Tabla 2). La transición de un periodo a otro representa en si un cambio en la proporción de macro-nutrientes ingeridos, *i.e.*, carbohidratos, grasas y proteínas, y por ende un cambio en el aporte calórico. Esto es, un cambio que va de una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos, a una dieta alta en carbohidratos y baja en grasas que ocurre durante la ablactación, hasta llegar a una dieta cuyo aporte calórico es principalmente de carbohidratos.

<b>Tabla 2. Cambios en el aporte calórico a lo largo del desarrollo postnatal temprano con respecto a los macro-nutrientes.</b>			
Macro-nutrientes	Periodo		
	Succión	Ablactación	Destete
Carbohidratos	11	35	50
Grasas	64	40	25
Proteínas	25	25	25

Los datos se expresan en término de porcentajes con respecto al aporte calórico recibido. Los datos fueron tomados de Hahn & Koldovský, 1966.

En cuanto a la proporción de proteínas ingeridas, ésta se mantiene sin cambios durante todo el periodo de amamantamiento (Tabla 2) (Koldovský *et al.*, 1960, 1963; citado por Hahn & Koldovský, 1966).

Esta transición en la proporción de macro-nutrientes a lo largo del periodo de lactancia está relacionada con el desarrollo del intestino, el cual es un proceso topológico y temporalmente organizado que debe cumplir funciones digestivas y de absorción acorde a la dieta. Por ello, el desarrollo ontogénico del intestino se ha dividido en cinco fases (Pácha, 2000): 1) morfogénesis, 2) cito-diferenciación y desarrollo fetal, que incluye la preparación del epitelio para la absorción del calostro, 3) periodo de succión temprano, 4) succión y 5) destete. Las primeras dos etapas ocurren durante la fase del desarrollo fetal y las tres restantes, coinciden con los cambios en la composición de la dieta ingerida. Durante el periodo de succión, el tracto gastrointestinal inmaduro recibe una dieta rica en grasas, y durante el periodo de ablactación existen modificaciones profundas en las funciones digestivas y de absorción, perdiendo las propiedades neonatales y adquiriendo las maduras hasta el periodo del destete. Además del intestino, el hígado también exhibe un patrón de desarrollo, en este caso metabólico a lo largo de la ablactación (Henning, 1981). Con relación al desarrollo enzimático hepático se han identificado

tres periodos: el tardío fetal, el neonatal y el tardío del amamantamiento. Durante el periodo de amamantamiento las crías reciben una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos, el metabolismo se encuentra asociado a la oxidación de los ácidos grasos en el hígado y a altas concentraciones de cuerpos cetónicos. Las vías enzimáticas relacionadas declinan en la tercera semana postnatal hasta alcanzar los niveles del animal adulto. El desarrollo del patrón metabólico de utilización de los carbohidratos está coordinado con el destete. Durante el amamantamiento el hígado es eficiente para transformar la lactosa en glucosa, pero debido que no es suficiente el nivel de glucosa, durante todo el periodo de lactancia se encuentra estimulada la gluconeogénesis, de manera más significativa durante los primeros diez días de vida postnatal. Al tiempo del destete, la gluconeogénesis declina y el hígado cambia al patrón enzimático del adulto con abundancia de carbohidratos. De manera importante se conoce que la cría de roedor nace expresando la enzima hexocinasa, que fosforila en el carbón 6 a la glucosa, permitiendo que ésta ya no pueda salir del hepatocito y pueda seguir las diferentes vías metabólicas (Jamdar & Greengard, 1970). La actividad de esta enzima se ve limitada por su producto impidiendo que se acumule. A partir de la segunda semana de vida postnatal aparece la glucocinasa con la misma acción que la hexocinasa, sólo que no limita su actividad a la acumulación de glucosa 6-fosfato, permitiendo que su producto se acumule.

Teniendo en cuenta que la GH está involucrada en la regulación del metabolismo energético, nos preguntamos si los cambios en la GH se producen en las ratas criadas en ausencia de leche materna usando un procedimiento de crianza artificial (CA). Este procedimiento permite privar a las crías de la interacción con la madre y/o compañeros de camada, las cuales son alimentadas con leche de fórmula a lo largo del período de lactancia.

### **3. Hipótesis**

Las crías mantenidas en el sistema de crianza artificial durante el periodo lactancia, presentan menores concentraciones séricas de GH en comparación con los animales criados, durante el mismo periodo, con una madre.

### **4. Objetivo General**

Analizar las concentraciones séricas de GH, IGF-1 y grelina en animales criados artificialmente, y en aquellos criados por una madre, durante el periodo de lactancia.

#### **4.1. Objetivos Particulares: en ratas criadas por una madre (CM) y criadas de forma artificial (CA) de 7, 14 y 21 dpn...**

- Evaluar la respuesta a la separación de la madre y del nido sobre los niveles séricos de GH
- Evaluar la secreción basal y estimulada con bromocriptina de GH en cultivos primarios de hipófisis
- Evaluar los niveles séricos basales de las hormonas que participan en la retroalimentación de la secreción de GH: IGF-I total y grelina acilada
- Medir los niveles de expresión relativa del gen de la GH en tejido hipofisiario, y de IGF-1 en el tejido hepático.
- Cuantificar el receptor a GH hepático.
- Analizar los niveles de glucosa sérica, así como de glucógeno y triacilglicéridos (TAGs) a nivel hepático.
- Obtener parámetros morfométricos del hígado y el hueso.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Animales

Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa Wistar de 90 días de edad y los machos de sus camadas, todos provenientes de bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN unidad Zacatenco. Los animales fueron mantenidos bajo temperatura ambiente y humedad constantes ( $21\pm 1$  °C, 55%) y con un ciclo de luz/obscuridad de 12 h (la fase obscuridad comenzaba a las 18:00 h). Los animales fueron mantenidos con alimento (Purina Rat Chow, México) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos descritos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL, # 0267-05) siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la Guía de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) EUA, N.º 8023).

#### Procedimiento de Crianza Artificial (CA)

Al día del parto (día postnatal 0; dpn0), las camadas fueron ajustadas a 8 machos y no se perturbaron hasta el día del procedimiento. Al dpn 3.5 se tomaron machos de tres a cuatro camadas y fueron asignados aleatoriamente para ser criados ya sea por una nodriza (control de crianza denominado crianza materna, CM) o para recibir un implante con cánula en el carrillo y ser colocados en el sistema de crianza artificial (animales bajo crianza artificial, CA). La cirugía que las crías CA recibieron consistió en el implante de una cánula a través de la mejilla a través de la cual se les suministró la fórmula láctea (Aguirre-Benitez *et al.*, 2017; Zemportalteca *et al.*, 2018). La fórmula láctea (dieta Messer, Messer *et al.*, 1969, Smart *et al.*, 1983; véase anexo 1) fue suministrada con la ayuda de una bomba de infusión programable Harvard (PHD 22/2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA), la cual fue programada para infundir la fórmula láctea durante 10 minutos por 50 minutos de pausa por 24 h durante el tiempo que duró la crianza.

El volumen de leche infundido por día se basa en una fracción del peso promedio de las crías, la cual en crías con 3 dpn fue del 33% del peso corporal y este volumen aumentó un 1% por día hasta un máximo de 45% del peso corporal promedio al 21dpn. Para estimular la micción y la

defecación las crías fueron estimuladas en su región ano-genital dos veces por día durante 30-40 segundos por vez. El procedimiento anterior se realizó con la ayuda de un pincel de “pelo de camello” que fue humedecido con agua caliente y pasado sobre la región ano-genital en movimientos antero-posterior de dos ciclos/s hasta estimular la micción y la defecación (08:00 horas y 20:00 horas). Asimismo las crías recibieron estímulos con el pincel en su región dorsal con movimientos antero-posteriores durante 45 segundos, cinco veces al día, diariamente hasta el final de la crianza (Melo *et al.*, 2006). El encamado presente en las cajas que alojaban a las madres fue utilizado como estímulo odorífero y el procedimiento de crianza artificial se desarrolló en el mismo cuarto que alojó a las nodrizas con el fin que recibieran estímulos auditivos provenientes de ellas y de las camadas. A no ser que se indique lo contrario, las crías fueron separadas del nido o de la copa por cuatro horas antes del sacrificio (período de ayuno) ya sea al día 7, 14 o 21 postnatal. En el caso de los animales CM, permanecieron con sus compañeros de camada y con material del nido a 38 °C, y en el caso de las ratas CA éstas fueron reunidas y mantenidas en condiciones semejantes a las ratas CM. Todos los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 16:00 y las 18:00 h.

## **5.2. Cuantificación de GH, IGF-1 y Grelina**

Las concentraciones de GH se determinaron, tanto en suero como en medio de cultivo proveniente de cultivos primarios de células hipofisarias, mediante el uso de un kit de inmunodetección multiplex de Milliplex® y cuyos coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron de 5.4 y 3.0 %, respectivamente (Millipore Corp, Billerica, MA, EUA). Para lo anterior se utilizó un equipo con tecnología Luminex xMAP (Mag pix, Luminex Instruments, Millipore) y se requirieron de 25 µl de muestra por ensayo tanto para muestras de suero (por cría) o por sobrenadante de cultivo primario, realizándose lecturas por duplicado. Las concentraciones séricas del IGF-1 total (IGF-1 libre más la unida a complejos IGFbPs-ácido lábil) se midieron mediante un kit de ELISA para IGF-1 de ratón con una sensibilidad inferior a 4 pg/ml y una recuperación del 98% (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las muestras de suero se extrajeron con una solución ácido-etanol siguiendo las instrucciones del proveedor. La grelina fue medida

en su forma acilada (activa) utilizando el kit de EIA con una sensibilidad de menos de 1.56 pg/ml y un CV intra- e inter-ensayo > 8 y <10%, respectivamente según los proveedores (MyBiosource, San Diego, CA, EUA).

### **5.3. Ensayo de secreción en células de cultivo primario hipofisiario**

Con el fin de analizar la secreción de GH de las células hipofisiarias de las crías CM y CA se utilizó el procedimiento experimental de cultivos celulares primarios descrito por Bello y cols. (1999) con modificaciones menores. Se sembraron  $3 \times 10^4$  células por pozo en cajas de 48 pozos (Costar, Corning Inc., Corning, NY, EUA). Cada pozo contenía 1 ml de medio de cultivo compuesto por medio 199 (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), este medio fue enriquecido con suero fetal bovino al 10% (v/v) (Gibco). Los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones estándar pero al término de 24 horas el medio fue reemplazado con 0.5 ml de medio libre de suero e incubado durante 60 minutos. Este medio (condición basal de secreción) fue tomado del pozo y sustituido por un medio semejante salvo que contenía el agonista dopaminérgico bromocriptina con una concentración de 100 nM (Sigma-Aldrich, EUA). Este medio con bromocriptina fue incubado por otros 60 minutos y al final de este período de tiempo fue recogido y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se analizaron las concentraciones de GH. Al final del procedimiento las células fueron lisadas y el contenido de proteína se midió mediante el ensayo de micro BCA (ThermoSci., Rockford, IL, EUA). Los valores de GH se normalizaron con respecto a la proporción de células GH-positivas (véase sección 5.6) presentes en un cultivo primario correspondiente a cada edad.

#### 5.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para *Gh* e *Igfl*

Se extrajo el ARN total tanto de homogenados hipofisarios como de hepáticos mediante el uso del reactivo “Tri” (Sigma-Aldrich, EUA), esto en concordancia con las instrucciones del fabricante. Los homogenados de tejidos fueron provenientes de crías CM y CA correspondientes a cada una de las edades evaluadas. El ARN total utilizado (250 ng/ $\mu$ l) se transcribió de forma inversa hacia ADN complementario (ADNc) mediante el uso de la transcriptasa inversa proveniente del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV, New England Biolabs, EUA). Los niveles de expresión del *Gh* e *Igfl* se estudiaron mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) partiendo de 2  $\mu$ l de ADNc. Para medir la expresión de la *gh* se utilizó el sistema de detección “SYBR Green” así como los reactivos del kit Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemania). Para medir la expresión de *igfl* se utilizó el sistema de detección TaqMan y los reactivos del kit Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Life Technologies, EE.UU.). Para la expresión de la *Gh* se utilizó el cebador desarrollado por la Dra. Maricela Luna (Arellanes-Licea *et al.*, 2018): Forward: GGCCCAGCAGAGAACTGACAT; Reverse: ATCAGAGCCTGGATGCCCTC. Los ensayos pre-desarrollados por Life Technologies utilizados fueron los siguientes: para el *Igfl* de rata el ensayo fue el “Rn00710306\_m1”, y para la GAPDH, que se usó como un gen constitutivo para el *Igfl*, el ensayo fue el “Rn01775763\_g1”. Para la Rn18s, el cual se usó como gen constitutivo de la *Gh*, la secuencia del rRPS18qf es: Forward TTCAGCACATCCTGCGAGTA; Reverse TTGGTGAGGTCAATGTCTGC (Sigma-Aldrich Che. C., St. Louis, MO, EUA). Tres muestras independientes de ADNc por cada condición (crianzaXedad) se analizaron y la muestra correspondiente de ARNm sin transcriptasa inversa se incluyó como control negativo. El ADNc de ratas macho adultas se usó como control positivo y la relación de amplificación se obtuvo usando el método del  $2\Delta\Delta$ . La secuencia de ADN de cada producto de PCR por cada muestra se determinó mediante la reacción de marcador de colorante marcado con fluorescencia usando un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Los protocolos de PCR fueron: 95 ° C durante 10 min, 94 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 30s y 72 ° C durante 30 s (40 ciclos) para *Gh*, y 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 60 s (40 ciclos ) para *Igfl*.



## **5.5. Cuantificación del receptor a GH hepático por Western Blot**

Para cuantificar la cantidad de receptor (GHR) presente en el hígado de las crías CM y CA en las diferentes edades, se utilizó el siguiente protocolo: una vez extirpado el hígado este se homogeneizó en un amortiguador de “ensayo para radio-inmuno-precipitación” (RIPA) [NaCl 150 mM, Tris 50 mM, 10 % (v/v) de glicerol, 0,1% (v/v) SDS, 1% (v/v), ácido desoxicólico 23 mM, NaF 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, cóctel inhibidor de proteasa (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, EE.UU.) y 4 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pH 7,4]. Después de la cuantificación proteica mediante un ensayo por ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Thermo Fisher Sci., Rockford, IL, EUA), alícuotas de 45 µg de proteína fueron separadas mediante el uso de un gel SDS-PAGE al 10%. Muestras provenientes de hígados de animales adultos del mismo sexo sirvieron como control positivo, y como control negativo se utilizó un enriquecido de membrana de eritrocitos proveniente de ratas adultas. El receptor a GH se determinó mediante la técnica de electro-transferencia (Western blot), utilizando como anticuerpo primario una policlona levantada en conejo dirigida contra GHR de rata a una dilución de 1:1000 (MyBio Source, San Diego, CA, EUA). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo conjugado levantado en cabra y dirigido contra conejo a una dilución 1:20,000 (Invitrogen, Thermo Fisher Sci., Eugene, OR, USA). Como control de carga se utilizó la actina, y para detectarla se utilizó (anticuerpo) una mono-clona levantada en ratón a una dilución de 1:2000 (donado por el Dr. Manuel Hernández, CINVESTAV) y un anticuerpo secundario levantado en cabra contra ratón a una dilución de 1:20,000 (Invitrogen).

## **5.6. Inmunocitoquímica para los receptores, tanto de GH (GHR) como para dopamina (del tipo D2; D2R)**

Se utilizó un cultivo primario hipofisiario, que fue obtenido como anteriormente se menciona (sección 5.3), para detectar inmuno-fluorescencia de GH y PRL en las células. Para ello se

sembraron  $3 \times 10^4$  células sobre cubre-objetos, previamente cubiertos con poli-D-lisina, y se mantuvieron bajo condiciones estándar. Transcurridas 24 h de incubación, las células fueron fijadas en para-formaldehído al 3.5% (disuelto en PBS) durante 30 minutos, para posteriormente permeabilizarse con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 min. Con el fin de bloquear la unión inespecífica se utilizó albúmina libre de IgG al 1% durante 30 minutos. El anticuerpo primario contra GH (de rata) fue levantado en cobayo, mientras que el utilizado contra PRL (de rata) fue levantado en conejo, utilizándose a una dilución de 1:4000 y 1:10,000, respectivamente. Ambos anticuerpos se obtuvieron del Dr. Parlow (Pituitary Hormones & Antisera Ctr., Harbor-UCLA Med. Ctr., Torrance, CA, EUA), mientras que el anticuerpo primario contra el receptor a dopamina del tipo D2 (de humano, que fue levantado en conejo) se utilizó a una dilución de 1:1000, mismo que fue adquirido de Millipore (AB5084P, Merck, NJ, EUA). Los anticuerpos primarios fueron incubados por toda la noche a 4°C, seguido de una incubación de 60 minutos con anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente. Estos anticuerpos secundarios fueron: TRITC de burro anti-cobayo y TRITC de burro anti-conejo (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, EUA); y Alexa Fluor 488 de burro anti-conejo (LifeTechnology, Eugene, OR, EUA), todos ellos a una dilución de 1:400. Para observar los núcleos celulares se utilizó DAPI (Vector, Lab. Inc., Burlingame, CA, EUA). Una vez terminado el procedimiento, las células se montaron con medio anti-desvanecimiento (Vectashield, Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, EUA). Para identificar al tipo celular secretor de hormonas que expresa los receptores a dopamina D2, las células fueron fijadas y bloqueadas por una segunda vez y se procesaron para teñir GH o PRL. La proporción de células positivas para GH en los cultivos se obtuvo contando las células positivas y el núcleo en un microscopio de epifluorescencia (Observer.Z1, Zeiss, Göttingen, Alemania) con un objetivo 40x, se contaron 10 campos por cada cubreobjetos. La localización del receptor a dopamina tipo D2 se visualizó utilizando un microscopio confocal (TCS-SP 2, Leica, Alemania) con un objetivo de inmersión en aceite 63x.

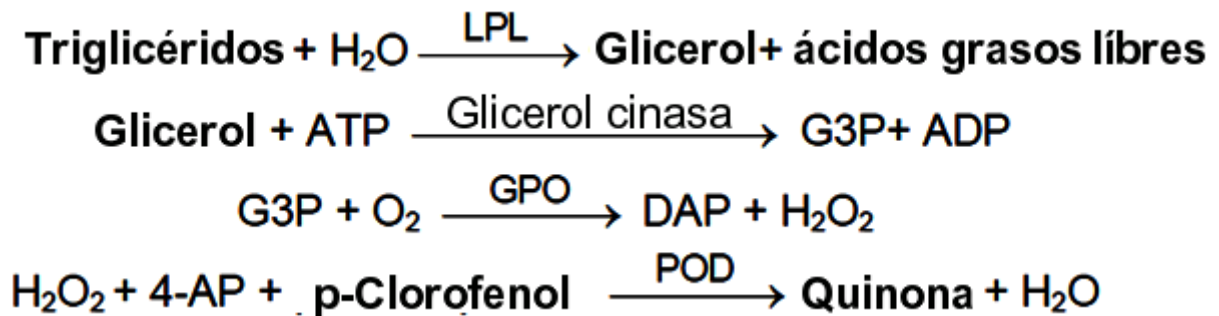
## 5.7. Citoquímica del tejido hepático

El hígado de las ratas CM y CA, de cada una de las diferentes edades evaluadas, se diseccionó y pesó para posteriormente colocarse en paraformaldehído al 10% en PBS (v/v) para su fijación. Posteriormente el tejido hepático se deshidrató en etanol a diferentes concentraciones, y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes en secciones de 5 a 10  $\mu\text{m}$ . Las secciones obtenidas fueron teñidas con hematoxilina/eosina y fotografiadas con la ayuda de un microscopio óptico (Observer Axio.Z1 Zeiss, Jena, Alemania) a través de una cámara digital (AxioCamMRc, Zeiss) y mediante el uso del software AxioVision real.4.8 (Zeiss). Las imágenes se tomaron a través de un objetivo Neofluar 63x de inmersión y con un aceite Plan LCI. Después de la adquisición de las imágenes (doble ciego), se midió el área celular usando el software libre ImageJ v1.47 (NIH, EUA)

## 5.8. Análisis del contenido de Triacilglicéridos (TAGs) en el tejido hepático

Entre 100-300 mg de tejido hepático fueron reducidos a pequeñas partes, las cuales fueron mezcladas con 500  $\mu\text{l}$  de hidróxido de potasio (30%) etanólico (1:2v/v, KOH:EtOH). Luego las muestras fueron agitadas en un vortex hasta observar un homogenizado (*i.d.*, digestión del tejido) e incubadas toda la noche a 55 °C. El volumen de la muestra fue aforada a un ml con etanol:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v), agitada en un vortex y centrifugada durante 10 min (20000xg) a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y llevado a un volumen de 1.2 ml con la solución de etanol:H<sub>2</sub>O. Una alícuota de 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante fue mezclada con 215  $\mu\text{l}$  de cloruro de magnesio 1 M (MgCl<sub>2</sub>) y agitada en un vortex e incubada por 10 minutos en un baño de agua fría. La muestra fue centrifugada por 10 minutos (20,000xg) a 4 °C y el sobrenadante fue recuperado para la cuantificación del glicerol. Se utilizó el kit “Triglycerides-LQ” de Spinreact (Girona, España), el cual contenía las enzimas: glicerol cinasa, glicerol fosfato oxidasa y peroxidasa.

El glicerol es convertido a glicerol-3-fosfato (G3P) + ADP por la glicerol cinasa + ATP, y la glicerol fosfato deshidrogenasa (GPO) entonces convierte el G3P a dihidroacetona fosfato (DAP) + peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este último reacciona con la 4-aminofenazona (4-AP) y la p-clorofenol en presencia de la enzima peroxidasa para dar una quinona de coloración roja que se cuantificó a 505 nm. La intensidad del color fue proporcional al contenido de TAGs y las unidades fueron expresadas en microgramos de TAGs por mg de tejido hepático húmedo.



## 5.9. Análisis de los datos

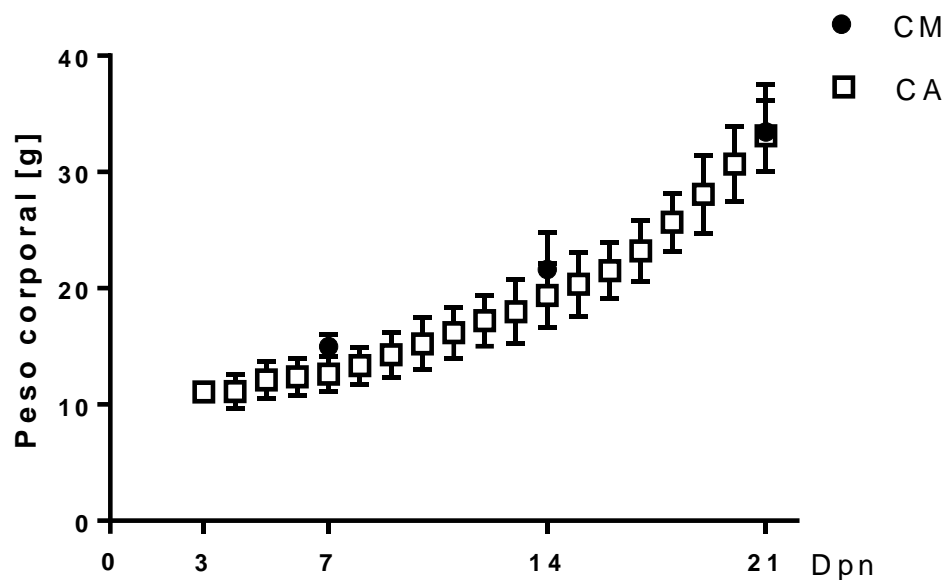
Todos los valores son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media ( $X \pm \text{EEM}$ ), y al menos se realizaron 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó para establecer diferencias entre los grupos CM y CA lo largo de las edades, así como las variaciones dentro de cada grupo a lo largo del tiempo. Para cumplir con lo anterior se realizó una ANOVA de dos vías seguido de dos pruebas *post-hoc* de comparaciones múltiples; siendo una de ellas la prueba de Sidak que se utilizó para determinar diferencias debidas a la crianza y la prueba de Tukey para determinar diferencias entre las edades para cada grupo de crianza. Para los experimentos con células cultivadas, el análisis entre grupos, edades y tratamiento con bromocriptina se realizó mediante ANOVA de tres vías seguido de una post-prueba de Holm-

Sidak (Graph Pad Prism 7, San Diego, CA, EUA). Las diferencias estadísticas entre los grupos se consideraron significativas con  $p < 0.05$ .

## 6. Resultados

### 6.1. Ganancia de peso corporal

La comparación en el aumento del peso corporal entre los grupos CM y CA a lo largo del periodo pre-destete (Figura 6.1) no arrojó diferencias significativas. Ambos grupos mostraron un incremento semejante en la tasa de crecimiento presente entre la segunda y tercera semana (intervalo pnd14-pnd21,  $14.1 \pm 0.56$ ) la cual fue estadísticamente significativa respecto a la tasa de crecimiento observada entre la primera y segunda semana de vida (intervalo comprendido entre el 7dpn y el 14dpn,  $7.0 \pm 0.35$ ).



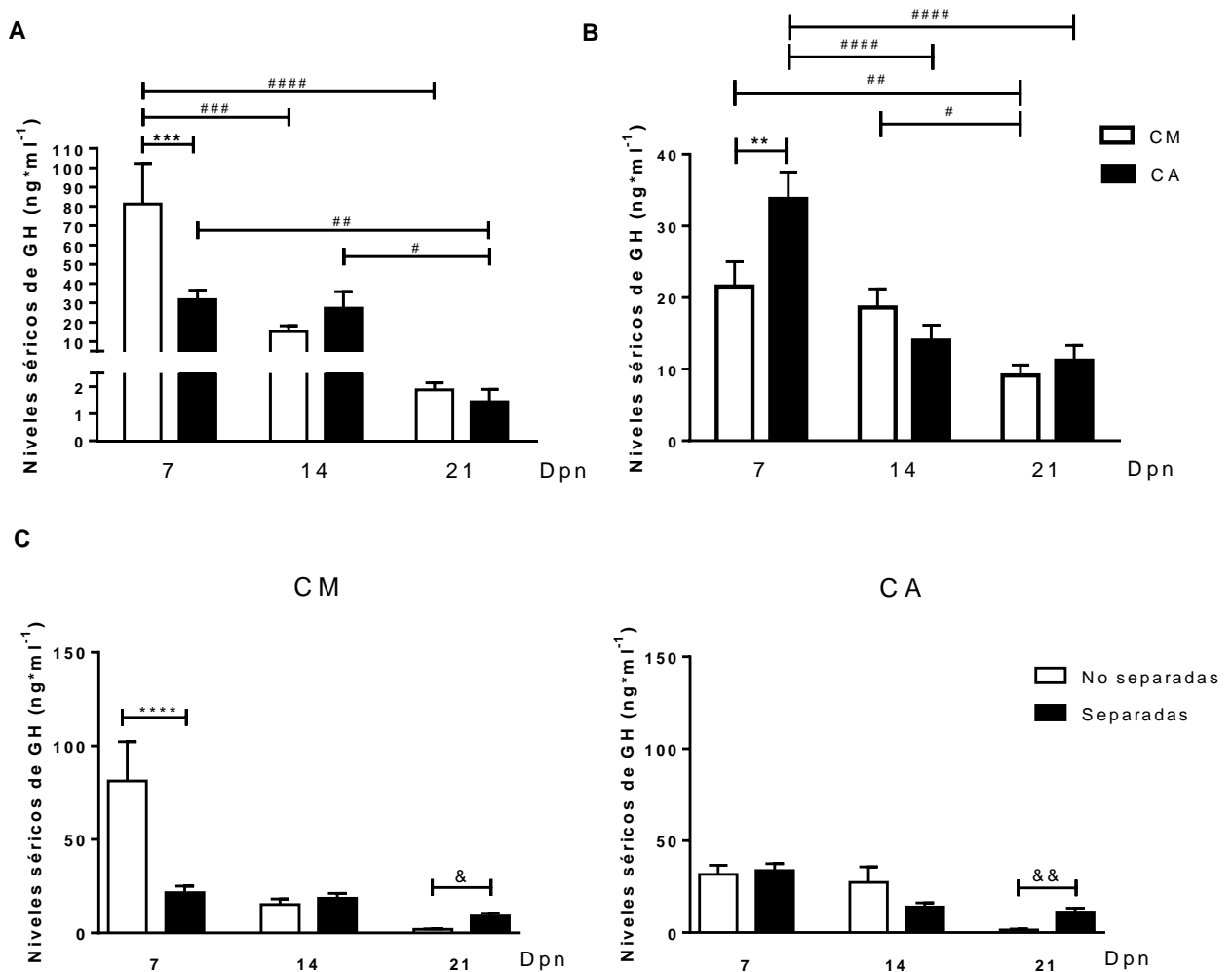
**Figura 6.1. Peso corporal en ratas CM y CA a lo largo del periodo de lactancia.** Las crías CM (círculos llenos) fueron pesados a los 7dpn, 14 dpn y 21 dpn, mientras que las crías CA (cuadros abiertos) fueron pesados diariamente desde el 3.5 dpn hasta el 21dpn. Fueron 53 crías CM para cada edad, y 202 crías CA durante el periodo de lactancia

## 6.2. Concentraciones séricas de GH

Con el propósito de conocer las concentraciones séricas de GH en las crías con un mínimo de disturbio, animales de 7dpn, 14dpn, y 21dpn fueron tomados, ya sea del nido o de la copa, y fueron inmediatamente sacrificados (crías sin ayuno). En la Figura 6.2A, puede observarse una disminución del 81 % en los valores séricos de GH en el grupo CM (barras blancas) entre el 7dpn y 14dpn, y esta disminución continúa hasta el 21dpn, alcanzando valores del 2.3 % respecto del 7dpn. Asimismo, los valores en las concentraciones séricas de GH a esta edad (21dpn) fueron 87 % menores respecto al 14dpn. Dentro del grupo CA (Figura 6.2A, barras negras), los valores de las concentraciones séricas de GH observados en ratas de 7dpn fueron similares a aquellos observados al 14dpn. No obstante lo anterior, al comparar estos valores con aquellos obtenidos de las crías CM, observamos una diferencia del 61 %, siendo menor en las crías CA (Figura 6.2.A, 7dpn). Para el 21dpn ya se ve una caída significativa del 95 % en los valores séricos de GH de las crías CA.

Para estudiar los efectos de la separación materna y un ayuno de cuatro horas (4h) sobre los niveles séricos de GH, comparamos los valores de las crías CM *versus* CA en los días 7, 14, y 21dpn (Figura 6.2B). Las crías CM bajo 4h de ayuno (barras blancas), no mostraron cambios en los niveles séricos de GH al 7dpn y 14dpn, pero se observó una caída del 50 % al 21dpn. Por otro lado, las crías CA bajo 4h de ayuno (barras negras) mostraron una caída del 60 % en los niveles séricos de GH entre el 7dpn y 14dpn, sin mostrar diferencias entre la segunda y tercera semana de vida postnatal. La comparación entre los valores séricos de GH entre ambos grupos de crías, reveló diferencias significativas al 7dpn, siendo el grupo CA el grupo que mostró los valores más altos (Figura 6.2.B). Sin embargo, al comparar los niveles circulantes de GH de los grupos inmediatamente sacrificados *versus* aquellos valores provenientes de animales

sacrificados 4h después de la separación (Figura 6.2.C), se observó que en el grupo CM sin ayuno (gráfica de la izquierda barras blancas), los valores fueron 3.8 veces mayores en comparación a los del grupo CM con ayuno de 4h (barras negras) (2W-ANOVA, seguido de una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak,  $P < 0.0001$ ). De manera interesante, ninguna diferencia estadística fue encontrada entre los valores séricos de GH dentro de los grupos CM o CA al 14dpn (Figura 6.2.C). Finalmente, y no menos muy importante, los niveles de GH circulantes en las crías tanto CM como CA que fueron sacrificadas 4h después de la separación fueron mayores respecto de las crías inmediatamente sacrificadas al 21dpn (4.8 y 7.6 veces mayores, respectivamente).



**Figura 6.2. Concentraciones séricas de GH en ratas al 7, 14, y 21dpn.** (A) las concentraciones séricas de GH en las crías sacrificadas inmediatamente después de ser removidas del nido (CM) o de la copa (CA), crías sin ayuno (7dpn, CM = 6 y CA = 12; 14dpn, CM = 9 y CA = 5; 21dpn, CM = 8 y CA = 6), (B) concentraciones séricas de GH en ratas bajo cuatro horas de ayuno (7dpn, CM = 14 y CA = 14; 14dpn, CM = 11 y CA = 12; 21dpn, CM = 16 y CA = 15). (C) Concentraciones séricas de GH en ratas CM (izquierda) y CA (derecha) no separadas (barras abiertas) y separadas 4h (barras cerradas). El análisis estadístico fue desarrollado para las crías sin ayuno (A) mediante una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Sydak para las diferencias entre las edades en las crías CM o CA, # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001, #### P < 0.0001, y para las diferencias entre los grupos CM y CA dentro de cada edad \*\*\* P < 0.001, y (B) para crías en ayuno mediante una ANOVA de una vía, seguida de una post-prueba de comparaciones múltiples de Tukey para las diferencias entre las edades en los grupos CM y CA grupos # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001, #### P < 0.0001, y para las diferencias entre los grupos CM y CA dentro de cada edad \*\* P < 0.01. Mediante una ANOVA de dos vías, seguido de una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak, para diferencias entre la condición de separación P < 0.0001. \*\*\*\* P < 0.001, y una prueba t de Student para & P < 0.05, y && P < 0.01

### **6.3. Secreción de GH en cultivo primario de células hipofisarias de crías CM y CA, así como la expresión del receptor a dopamina**

En cultivos celulares hipofisarios provenientes de crías CM y CA de las diferentes edades estudiadas, se observaron variaciones en la secreción basal de GH a través del periodo de lactancia (Figura 6.3). En aquellas células hipofisarias provenientes de las crías CM a 7dpn y 14dpn, no mostraron diferencias en la secreción basal de GH. En contraste, se observó una disminución significativa en la secreción basal de GH al 21dpn que fue de 1.9 y 1.1 veces menor, en relación a las edades de 7dpn y 14dpn, respectivamente. Los cultivos celulares hipofisarios provenientes de crías CA al 7dpn exhibieron los niveles de secreción basal mayores, siendo 3.6 y 4.7 veces más que al 14dpn y 21dpn, respectivamente. Aunque, ninguna diferencia se observó en la concentración basal de GH en cultivos hipofisarios de crías CA al 14 y 21 dpn. Al comparar la secreción basal de GH entre los grupos experimentales CM y CA, se observó que el proveniente de crías CA fue 1.9 veces mayor respecto del proveniente de crías CM al 7dpn. Al considerar y evaluar los cambios en la proporción de los diferentes fenotipos secretores durante el desarrollo (Taniguchi *et al.*, 2002), no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células somatotropas entre los grupos experimentales a lo largo de las edades evaluadas. La proporción de células inmuno-teñidas fue la suma de GH-positivas con respecto al número de



núcleos teñidos. Los valores encontrados fueron  $48\pm 1$  y  $47\pm 1$  % al 7dpm;  $33\pm 2$  y  $30\pm 2$  % al 14dpm, y  $21\pm 1$  y  $23\pm 1$  % al 21dpm, para las células hipofisarias cultivadas provenientes de CM y CA, respectivamente. Los cambios inducidos por el tratamiento con bromocriptina ( $0.1 \mu\text{M}$ ) dependió de la edad (Figura 6.3A). Al 7dpm, se observó una disminución en la secreción de GH en ambos grupos experimentales. No obstante, al 14 y 21dpm se observó un incremento en la secreción de GH. En los cultivos celulares hipofisarios provenientes de crías con 7dpm el receptor a DA tipo D2 se detectó en  $74\pm 3$  % de las células GH-positivas, mientras que en aquellos cultivos celulares hipofisarios provenientes de crías de 14dpm la proporción fue de  $13\pm 2$  %, y fue ausente en aquellos de 21dpm (Figura 6.3B). Las células PRL-positivas mostraron inmuno-reactividad al receptor a DA tipo D2 en las tres edades estudiadas. En la Figura 6.3B se muestran las células PRL-positivas y la inmuno-reactividad al receptor a DA tipo D2 en cultivos hipofisarios provenientes de crías de 7dpm.

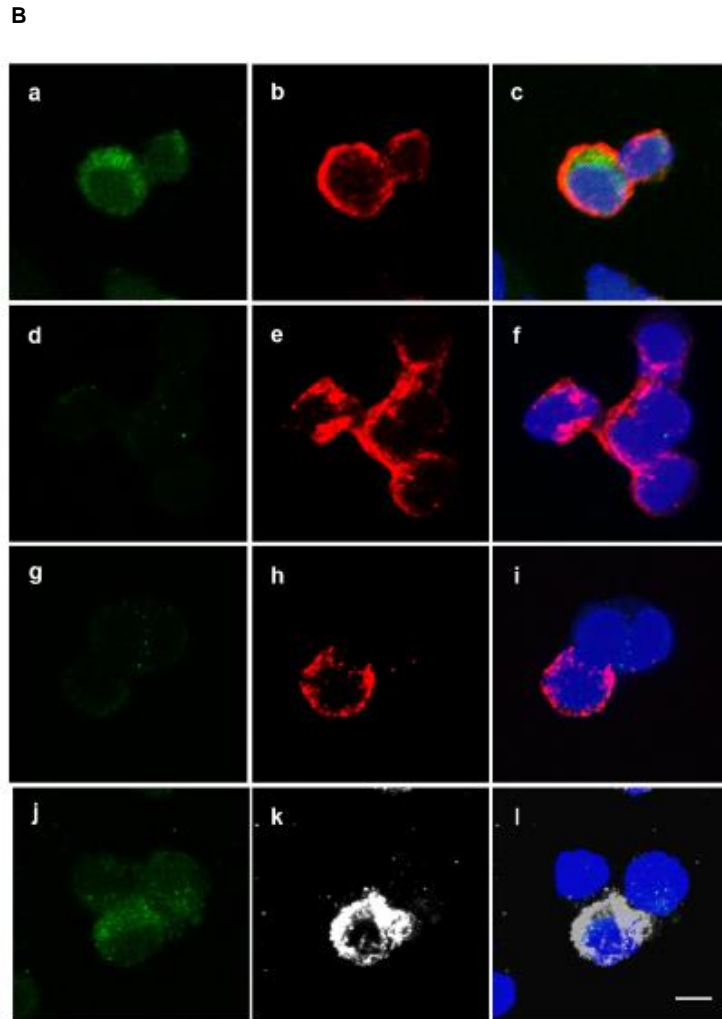
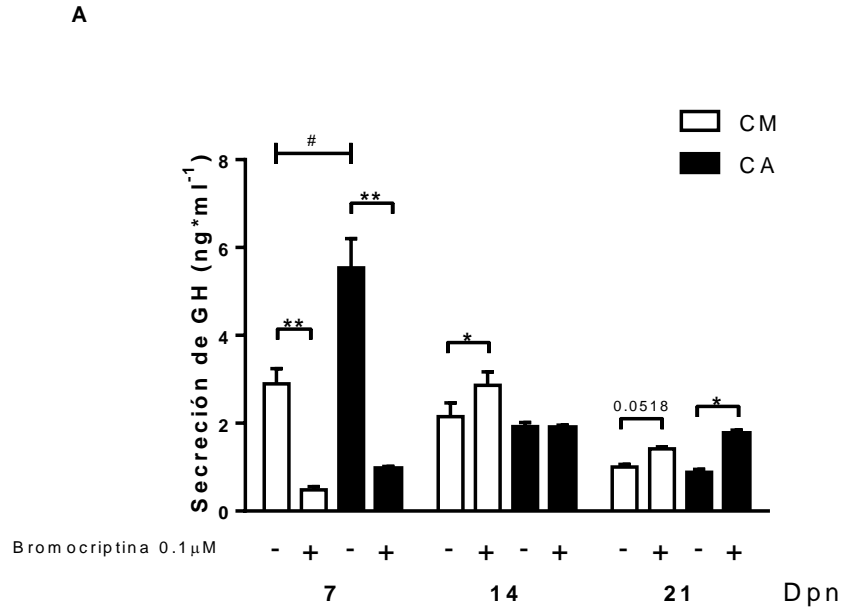
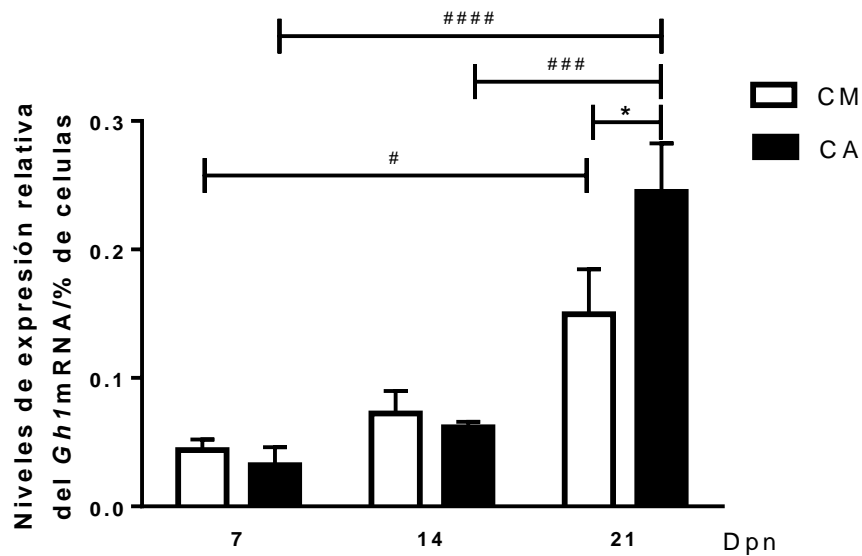


Figura 6.3. Secreción basal de GH y localización en cultivo del receptor a dopamina D2 en cultivo

**celular hipofisiario proveniente de crías CM y CA al 7, 14, y 21dpn.** Los cultivos celulares fueron desarrollados con hipófisis anteriores de ratas infantiles CM y CA: al 7dpn (grupos de 6 crías), al 14dpn (grupos de 3 crías), y al 21dpn (grupos de 2 crías), n = 3 cultivos celulares. **(A) Secreción basal de GH y estimulada por bromocriptina.** Las diferencias entre los cultivos celulares CM y CA, en la secreción de GH basal y estimulada con bromocriptina, en las tres edades estudiadas fueron comparadas por una ANOVA de una vía, seguida de una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak para las diferencias entre las edades, # P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001, #### P <0.0001, y para las diferencias entre los grupos CM y CA,\* P <0.05, y para diferencias entre la secreción basal de GH y estimulada por bromocriptina & P <0.05, && P <0.01. **(B) Expresión del receptor a dopamina tipo D2 (verde) en células GH-positivas (rojo) y en células PRL-positivas (blanco) en cultivo hipofisiario proveniente de crías de 7dpn (a, b, c, j, k, l), 14dpn (d, e, f), y 21dpn (g, h, i).** Las células hipofisarias fueron teñidas para el D2R (a, c, d, f, g, i, j, l), para GH (b, c, e, f, h, i) y para PRL (k, l). Barra = 15 µm.

#### **6.4. ARNm de Gh1 (Gh1ARNm) hipofisiario de crías CM y CA.**

Los niveles de expresión del *Gh1*ARNm obtenidos en cada edad (7, 14 y 21dpn), provenientes de homogenados hipofisarios se relacionaron con los niveles de expresión encontrados en animales adultos macho y determinados a través del método del doble delta. Asimismo, estos valores fueron normalizados con respecto al porcentaje de células GH positivas (Figura 6.4). No se encontró ninguna diferencia entre las edades de 7 y 14 días en ambos grupos, así como tampoco entre los grupos en ambas edades. No obstante, al 21 dpn se observó un incremento significativo en los niveles de expresión del Gh1ARNm hipofisiario en ambos grupos. Aunque este incremento fue de 3.4 veces entre las edades 7 y 21 del grupo CM, el grupo CA mostró un mayor incremento a esta edad, siendo de 7.7 y 4.0 veces mayor en las edades de 7 y 14dpn, respectivamente. Al comparar las diferencias en los niveles de expresión de GH hipofisiario entre los grupos CM y CA al 21dpn, estas fueron estadísticamente significativas, siendo 1.7 veces mayores en el grupo CA.

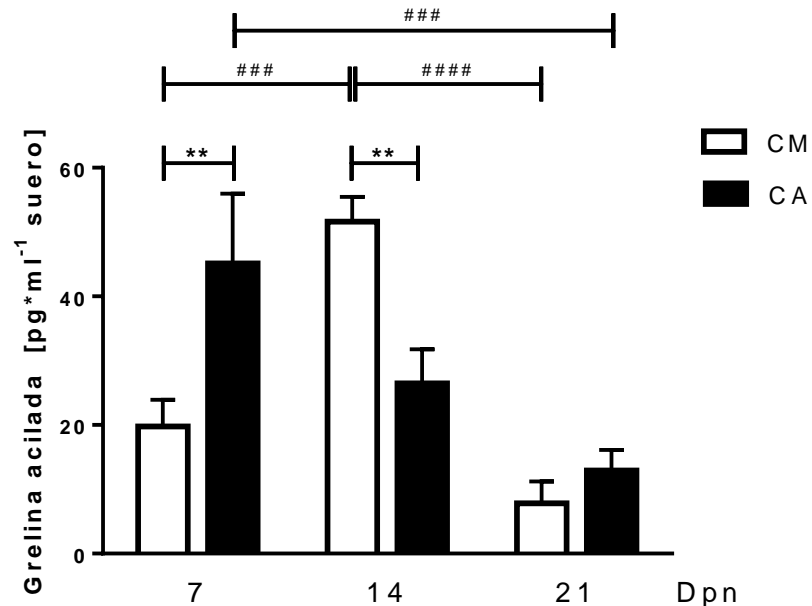


**Figura 6.4. ARNm de la GH en hipófisis de crías CM y CA al 7dpn, 14dpn y 21dpn.** El ARN total fue extraído de homogenados hipofisario de 7dpn (grupos de 8 crías), 14dpn (grupos de 6 crías) y 21dpn (grupos de 5 crías), n=3 diferentes extracciones. Los niveles de ARNm de la GH en las crías fueron normalizados con respecto a los niveles encontrados en machos adultos, y fijados por el porcentaje de células somatotropas presentes en la hipófisis a cada edad. Las diferencias en el contenido hipofisario en crías CM y CA a las tres edades estudiadas fueron comparadas por una ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey para diferencias entre las edades en ambos grupos, # P <0.05, ### P <0.001, #### P <0.0001, y mediante una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak para diferencias entre los grupos CM y CA, \* P <0.05

### 6.5. Concentraciones séricas de grelina acilada posterior a cuatro horas de ayuno

Los niveles de grelina acilada en ratas CM y CA fueron medidos después de un periodo de ayuno de cuatro horas (Figura 6.5). Posterior al ayuno, las crías CM exhibieron niveles séricos de grelina acilada que fueron 2.6 y 6.6 veces más altos al 14dpn con respecto a los días 7 y 21 de edad, respectivamente. No obstante, las crías CA mostraron niveles 3.5 más altos al 7dpn con respecto al 21dpn. Al comparar entre los grupos a lo largo de las diferentes edades, los niveles

circulantes de grelina fueron 2.3 veces más altos en el grupo CA al 7dpn, no obstante, al 14dpn los niveles fueron 2.0 veces altos en el grupo CM, sin cambios al 21 dpn (Figura 6.5).

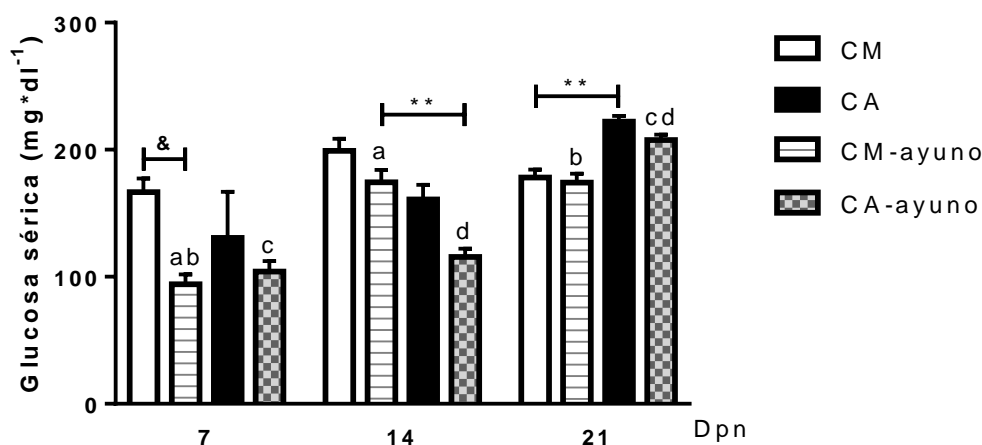


**Figura 6.5. Grelina acilada en crías CM y CA al 7dpn, 14dpn, y 21dpn posterior a cuatro horas de ayuno.** Al 7dpn los sueros provenientes de dos crías se mezclaron para poder determinar las concentraciones de la hormona (CM n=5 y CA n=8, grupos), mientras que para el resto de las edades se utilizó una cría (14dpn, CM n=5 y CA n=6; 21 dpn, CM n = 9 y CA n= 7). Las diferencias en las concentraciones de grelina acilada fueron comparadas por una ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey para diferencias entre las edades en ambos grupos ### P <0.001, ##### P <0.0001, y mediante una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak para diferencias entre los grupos CM y CA, \*\* P <0.01.

## 6.6. Concentraciones séricas de glucosa en crías CM y CA con o sin ayuno de cuatro

No se observaron diferencias estadísticas significativas en las concentraciones de glucosa sérica en crías CM o CA que fueron sacrificadas inmediatamente al ser separadas del nido (CM) o del sistema de crianza artificial (CA) posterior a un periodo de infusión de leche, a lo largo de las

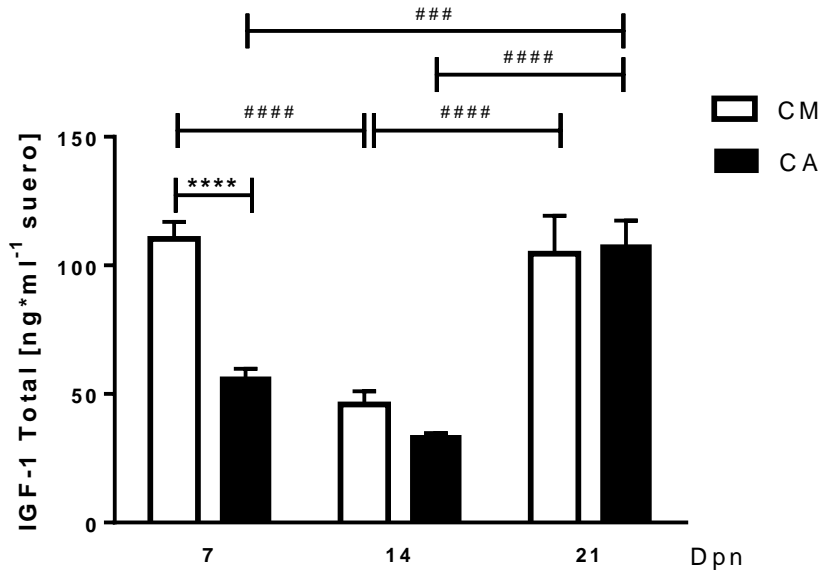
edades estudiadas. No obstante, las concentraciones séricas de glucosa en las crías sacrificadas 4h después de la separación del nido o de sistema mostraron diferencias significativas. Después del ayuno, las crías CM exhibieron altas concentraciones de glucosa al 14dpn y 21dpn con respecto a las crías de 7dpn, aproximadamente 1.9 veces más. No obstante, en las crías CA en ayuno las concentraciones séricas de glucosa incrementaron hasta el 21dpn, 1.9 y 1.6 veces más que al 7dpn y 14dpn, respectivamente. Comparando entre los grupos, al 21dpn, las crías sin ayuno exhibieron concentraciones séricas de glucosa más altas que las crías CM sin ayuno, 1.3 veces más. Al 14dpn, las crías CM en ayuno mostraron niveles séricos de glucosa mayores que las crías CA en ayuno. Finalmente, sólo en las crías CM al 7dpn, se observó una disminución de los niveles de glucosa séricos después del ayuno 1.8 veces menos.



**Figura 6.6. Niveles de glucosa séricos en crías CM y CA en condición de ayuno y no ayuno.** Las mediciones de glucosa se realizaron en muestras individuales. Las diferencias entre las edades dentro de un grupo CM o CA fueron comparadas mediante una ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Sydak: Letras iguales indican diferencias: a, b, c, d, y c = P <0.05. Las diferencias entre los grupos fueron obtenidas mediante una ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey, \* P <0.05. Las diferencias dentro del mismo grupo, sin ayuno (CM, CA) vs con ayuno (CM-ayuno, CA-ayuno) fueron obtenidas mediante una ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey, & P <0.05.

## **6.7. Concentraciones séricas del factor de crecimiento epidérmico tipo 1 (IGF-1)**

Debido a que uno de los efectos de la GH circulante es la estimulación de la producción del IGF-1 hepático, se analizaron las concentraciones séricas de IGF-1 (Figura 6.7). No obstante, el cotejo de los resultados no muestra una concordancia entre los niveles séricos de GH y los niveles séricos de IGF-1 a lo largo de las edades. La figura 6.7 muestra que los niveles séricos de IGF-1 en las crías CM fueron significativamente más bajos al 14 dpn ( $P < 0.0001$ ), siendo 2.3 veces menores respecto a los días 7 y 21 de edad. Por otro lado, las crías CA no mostraron diferencias entre los días 7 y 14 de edad, no obstante, las concentraciones séricas de IGF-1 incrementaron significativamente al 21dpn, entre 1.9 y 3.3 veces, respectivamente. Diferencias significativas en las concentraciones séricas de IGF-1, entre CM y CA, sólo se observaron al día siete de edad, en donde fueron 2.0 veces mayores en el grupo CM ( $P > 0.0001$ ). Debido a estas diferencias en los niveles séricos (de IGF-1) entre los grupos, se decidió establecer las características morfo-métricas en el hueso de la tibia (Tabla 6.1). Los resultados obtenidos muestran un patrón de incremento similar tanto en la talla del hueso como en el peso corporal de los animales de los grupos CM y CA. No obstante, al evaluar la densidad lineal del hueso (expresada como miligramos por unidad de longitud) esta fue significativamente menor en las ratas CA respecto a las ratas CM en los días 7 y 14 de edad de 18 y 16 % respecto al 14dpn (Tabla 7.1).



**Figura 6.7. Concentraciones séricas de IGF-1 en crías CM y CA al 7dpn, 14dpn, y 21dpn.** El factor de crecimiento fue medido individualmente, n=6. Las diferencias en los niveles de IGF-1 circulantes fueron comparadas por una ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey para diferencias entre las edades en ambos grupos ### P <0.001, #### P <0.0001, y mediante una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak para diferencias entre los grupos CM y CA, \*\*\*\* P <0.0001.



**Tabla 6.1. Parámetros morfo-métricos del hueso tibia en crías CM y CA al 7dpn, 14dpn, y 21dpn**

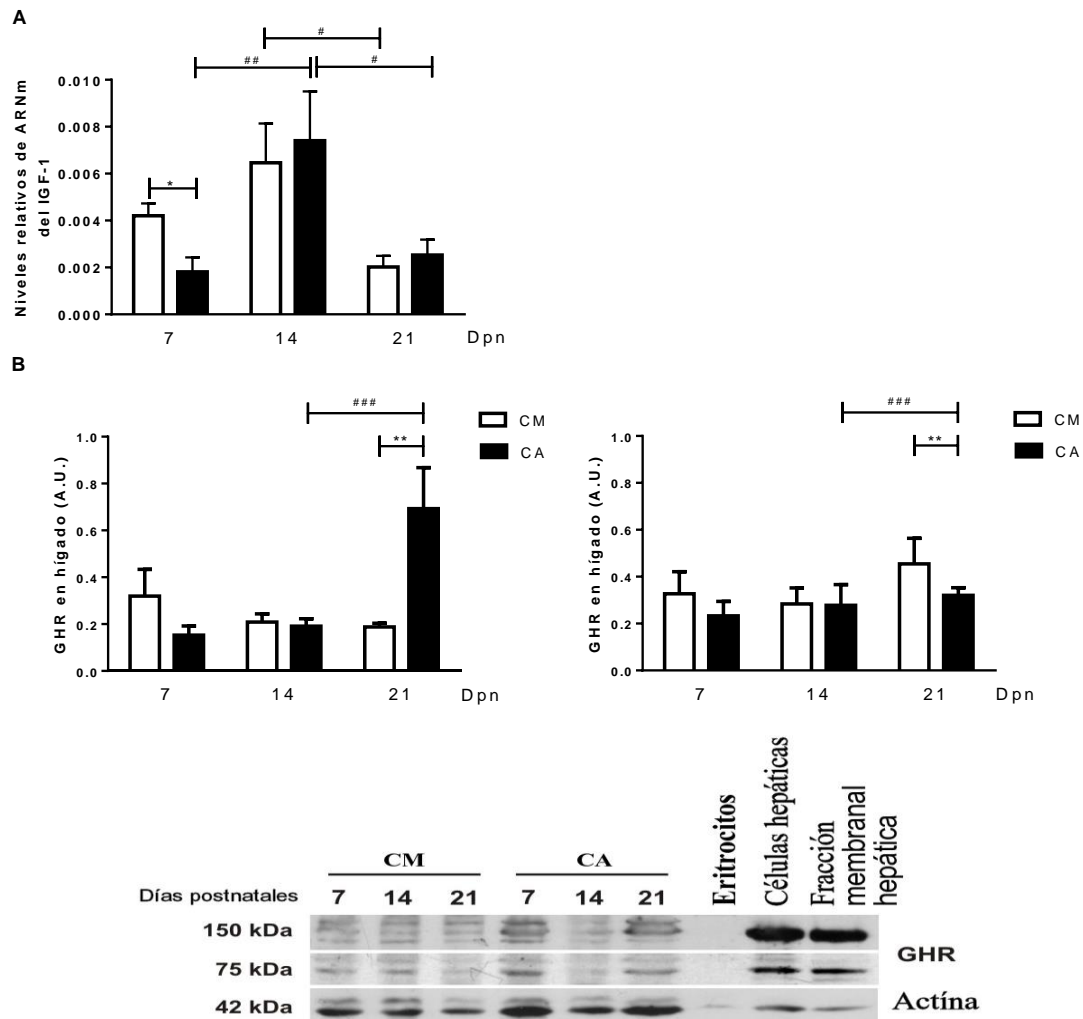
	Edad (días)	CM	CA
Longitud (cm)	p7	0.84 ± 0.01 n = 16	0.86 ± 0.02 n = 16
	p14	1.15 ± 0.02 n = 21, #####	1.10 ± 0.02 n = 20, #####
	p21	1.46 ± 0.02 n = 6, #####	1.48 ± 0.03 n = 6, #####
Peso de la Tibia (peso seco, g)	p7	6.91 ± 0.48 n = 16	5.84 ± 0.47 n = 16
	p14	10.80 ± 0.54 n = 21, #####	8.21 ± 0.63 n = 20, #####, **
	p21	20.20 ± 0.92 n = 6, #####	21.07 ± 0.91 n = 6, #####
Densidad lineal del hueso Tibia (peso/talla, g·cm <sup>-1</sup> )	p7	8.18 ± 0.49 n = 16	6.74 ± 0.45 n = 16
	p14	9.30 ± 0.35 n = 21	7.79 ± 0.36 n = 20, *

El hueso tibial derecho fue obtenido de las crías: al 7dpn, CM y CA n = 16; al 14dpn, CM y CA n = 21; al 21dpn, CM y CA n = 16. Las diferencias en: largo de la tibia (cm), peso drenado de la tibia (mg), y densidad lineal (mg·cm<sup>-1</sup>) fueron analizadas por una ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey para diferencias entre las edades en ambos grupos, ##### P < 0.0001, y mediante una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak para diferencias entre los grupos CM y CA, \*\* P < 0.0001, \*P < 0.05.

## 6.8. Niveles de expresión relativa del *IgfARNm* y del receptor a GH

Debido a que la principal fuente de IGF-1 circulante es el hígado, se cuantificaron los niveles de expresión relativa del IGF-1 en homogenados tejido hepático proveniente de animales de 7dpn, 14dpn, y 21dpn. La figura 6.8A muestra, para ambos grupos (CM y CA), que los perfiles de expresión del *IgfARNm* fluctúa entre las edades. En ambos grupos la expresión fue 3.3 (CM) y 3.0 (CA) veces significativamente mayores al 14 dpn respecto al día 21 ( $P < 0.05$ ), pero sólo fue significativa respecto a los días 14 y 7 de edad en el grupo CA (5.7 veces mayor,  $P > 0.01$ ). Al

comparar las diferencias entre los grupos CM y CA a lo largo de las edades se observó que al 7 dpn la expresión hepática de *Igf*ARNm fue mayor en el grupo CM.



**Figura 6.8.** Niveles de expresión del ARNm del IGF-1 (por RT-PCR cuantitativo) y cuantificación del GHR (por inmuno detección, WB) en crías CM y CA a los 7dpn, 14dpn, y 21dpn. Se obtuvo el ARNm total, así como los homogenados de hígado individuales de las crías sometidas a las cuatro horas de ayuno de los diferentes grupos y edades (7dpn, CM y CA n=8; 14dpn y 21dpn, CM y CA n=8). (A) Niveles de expresión relativa del IGF-1 en crías CM y CA. Los valores fueron analizados usando el método del doble delta, usando los valores del adulto como control. Las diferencias en el ARNm del factor de crecimiento (IGF-1) fueron comparadas mediante un ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey para diferencias entre las edades en ambos grupos # P < 0.05, ## P < 0.01, y mediante un análisis *post-hoc* de comparaciones múltiples de Sidak para diferencias entre los grupos CM y CA, \* P < 0.05. (B) Niveles del GHR, el panel izquierdo corresponde a la banda del receptor de 75 kDa (receptor monomérico) y el panel de la derecha corresponde a la banda

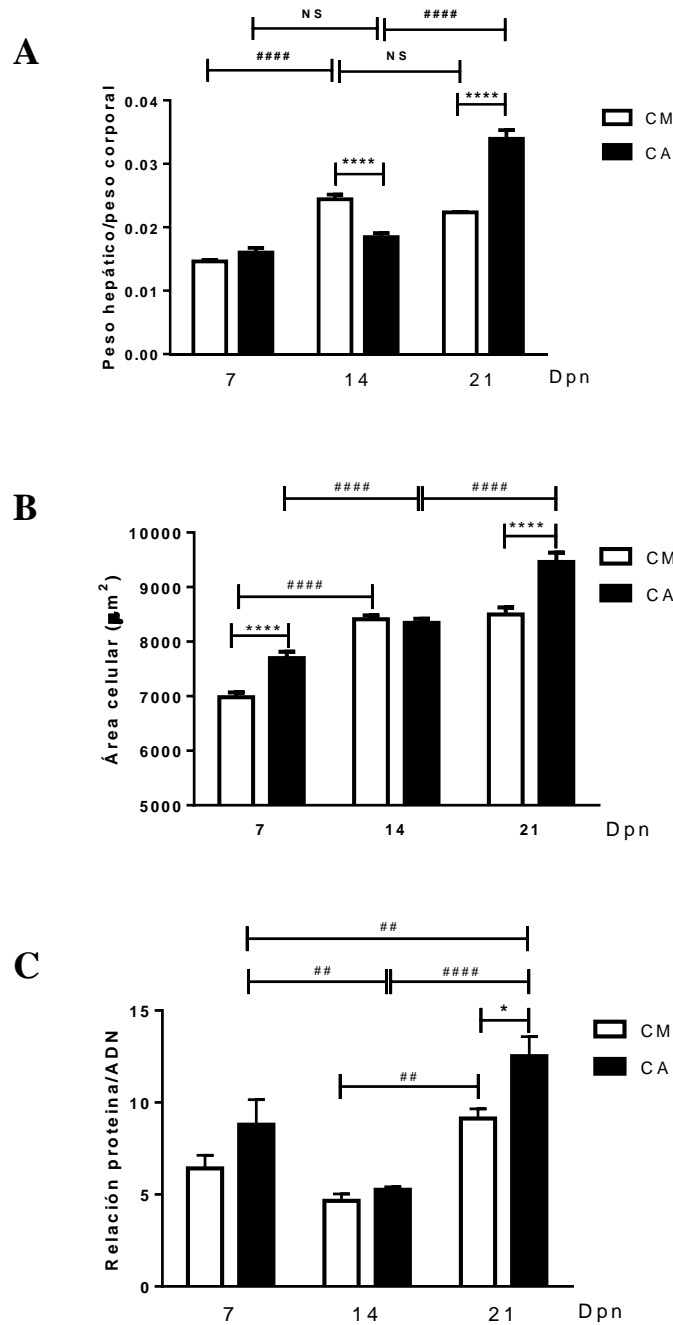
del receptor de 150 kDa (receptor dimerizado). Los datos corresponden a muestras individuales,  $n = 6$ . Sólo los niveles del receptor monomérico fueron estadísticamente diferentes y estas diferencias se obtuvieron mediante una ANOVA de dos vías, seguida por una prueba *post-hoc* de comparaciones múltiples de Tukey, para diferencias entre las edades en ambos grupos ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , y mediante una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak para diferencias entre los grupos CM y CA, \*\*  $P < 0.01$ .

Por otro lado, la producción postnatal de IGF-1 hepática requiere de la presencia del receptor a GH, por lo que fue cuantificada por electro-transferencia (western blot). Ninguna diferencia fue encontrada en los niveles relativos del receptor a GH en su forma monomérica o dimérica entre las edades en el grupo CM (Figura 6.8b). En el grupo CA se encontraron los mismos niveles de la forma monomérica, no obstante, la forma dimérica fue mayor al día 21 respecto a los días 7 y 14 de edad ( $P < 0.001$  en ambos casos). Debido a lo anterior, existieron diferencias entre las concentraciones relativas del GHR de los grupos CM y CA al 21dpn ( $P < 0.01$ ).

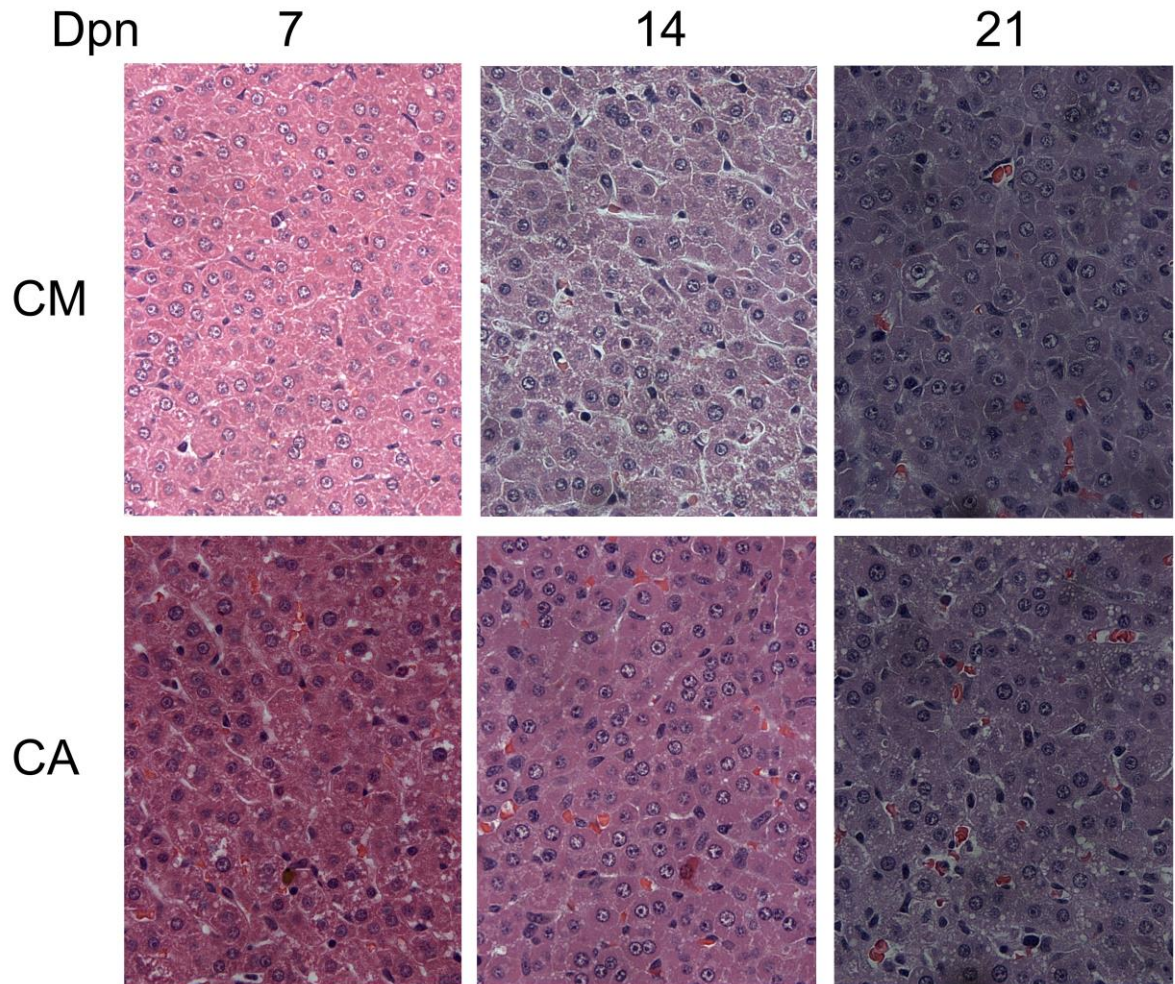
## 6.9. Parámetros morfométricos del hígado

Las diferencias encontradas, tanto en la concentración del GHR como en los niveles de expresión del IGF-1 a nivel hepático, podrían deberse a cambios en la fisiología del hígado que pueden manifestarse mediante parámetros morfométricos. Por ésta razón se obtuvo el peso hepático (como una fracción del peso corporal), el área celular hepática, y la relación proteína-ADN (Figura 6.9). Estas medidas revelaron que en los animales CM el hígado incrementó significativamente 1.6 veces más entre el 7 y 14 dpn ( $P > 0.0001$ ), sin mostrar mayor crecimiento relativo al día 21. Asimismo, el hígado en los animales CA mostró sólo un incremento relativo significativo de 2.0 veces más entre los días 14 y 21 de edad ( $P > 0.0001$ ), sin diferencias entre los días 7 y 14 (Figura 6.9A). Cuando se evaluó el peso relativo del hígado entre los grupos CM y CA, se observó que los hígados del grupo CM pesaron más que los del grupo CA al día 14 de edad ( $P < 0.0001$ ), pero por el contrario, al día 21 los hígados de las crías CA fueron más pesados ( $P < 0.0001$ ). Por otro lado, el área celular hepática media incrementó significativamente entre los días 7 y 14 de edad ( $P < 0.0001$ ) y continuó sin cambios al 21 dpn para el grupo CM. Mientras

que en el grupo CA se observó un incremento significativo durante todas las edades evaluadas (Figura 6.9B) (7 vs 14 dpn y 14 vs 21 dpn,  $P<0.0001$ ). Finalmente, se elevó el contenido de proteína, y se expresó como una fracción del ADN total (Figura 6.9C). El contenido proteico fue menor en ambos grupos al día 14 respecto al día 21 observándose un incremento de 1.9 (CM) y de 2.4 (CA) ( $P<0.01$  y  $P<0.0001$ , respectivamente). A diferencia del grupo CM, el cual no mostró diferencias en el contenido proteico entre los días 7 y 14 de edad, el grupo CA mostró menor cantidad de proteínas al día 14 también respecto al día 7 (1.6 veces menor con una  $P<0.05$ ). Una comparación entre los grupos CM y CA a lo largo de las edades sólo arrojó diferencias significativas al día 21, siendo el contenido de proteína hepática 1.4 veces mayor en el grupo CA (Figura 6.9C).



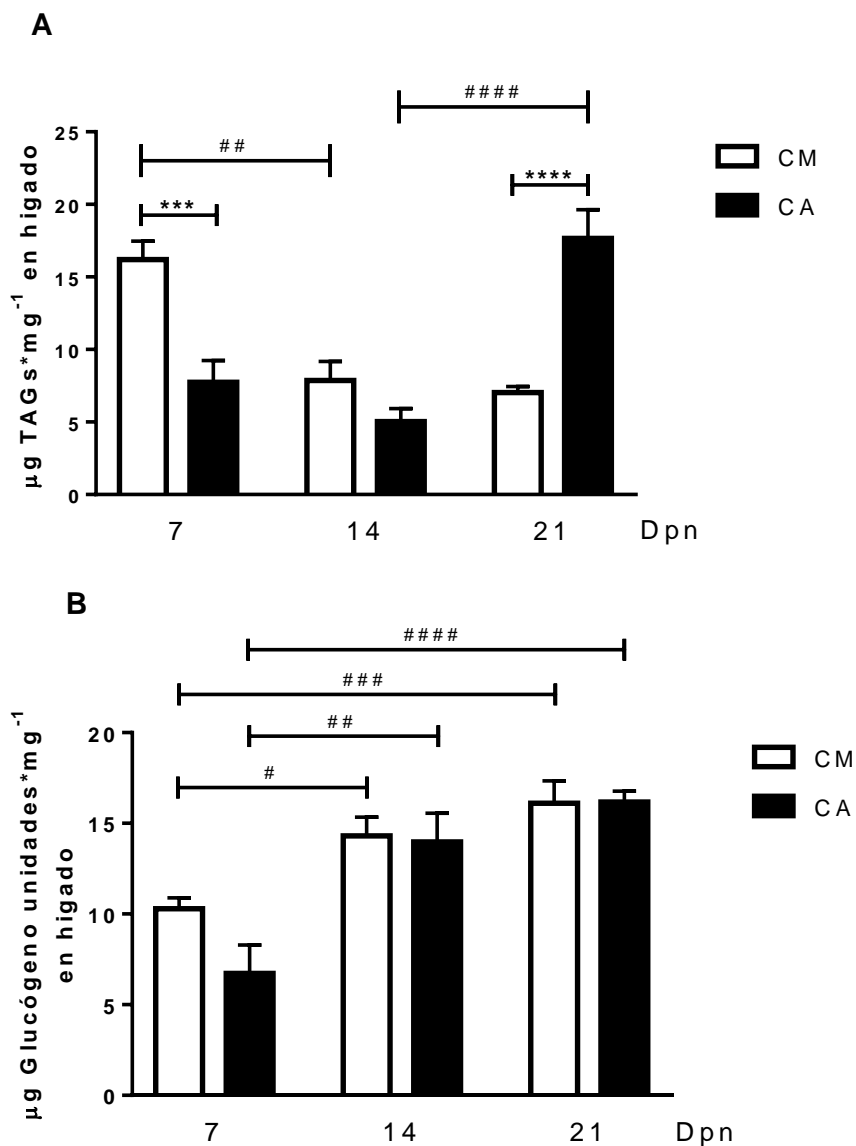
**Figura 6.9. Parámetros del tejido hepático y del hepatocito en las crías CM y CA al 7dpn, 14dpn, y 21dpn.** Las muestras de tejido fueron obtenidas de las crías al 7dpn, CM y CA n=8; al 14dpn y 21dpn, CM y CA n= 6. **(A)** Las diferencias en el peso hepático con respecto al peso corporal en crías de CM y CA a las diferentes edades estudiadas. **(B)** Diferencias en el área celular en los hepatocitos en los grupos CM y CA. **(C)** Diferencias en la relación proteína:ADN en los hepatocitos provenientes de crías CM y CA. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas mediante un ANOVA de dos vías, seguida por una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Tukey para diferencias entre las edades en ambos grupos #### P <0.0001, ## P <0.0001, y mediante una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak para diferencias entre los grupos CM y CA, \*\*\*\* P <0.0001, \* P <0.05.



**Figura 6.10.** Micrografías representativas de cortes histológicos de hígado en ratas CM y CA de 7, 14, y 21dpn. Los cortes fueron teñidos con hamatoxilina/eosina y fotografiados mediante un microscopio de luz (Axio observer.Z1 Zeiss, Jena, Alemania) con una cámara digital (AxioCam MRc, Zeiss) y un objetivo de 63x.

## **6.10. Contenido de triacilgliceroles (TAGs) y de glucógeno en crías CM y CA del hígado**

La figura 6.11 muestra el contenido de triacilglicerol (A) y de glucógeno en hígados de crías CM y CA sin ayuno de cuatro horas (*id est*, inmediatamente sacrificadas). Los niveles más altos de TAGs en las crías CM fueron obtenidos al 7dpn, mientras que al 14dpn y 21dpn los niveles fueron menores del 50% (Figura 6.11A). En contraste, en las crías CA los niveles más altos de TAGs se observaron al 21dpn, siendo 2.3 veces más elevados respecto a 7dpn, y 3.5 veces mayores que al 14dpn. Cuando se comparó el contenido de TAGs de las crías CM y CA al 7dpn, se observó una diferencia estadística significativa, las crías CA tuvieron 2.1 veces menos contenido de TAGs que las crías CM. No obstante, al 21dpn se obtuvo un resultado inverso, las crías CA tuvieron 2.5 veces más contenido de TAGs en el hígado que las crías CM. En cuanto al contenido de glucógeno (Figura 6.11B), los niveles obtenidos en las crías CM y CA fueron los más bajos al 7dpn respecto al 14dpn y 21dpn, 1.5 y 1.7 veces menos para el grupo CM; y 1.9 veces menos para el grupo CA respecto a ambas edades.



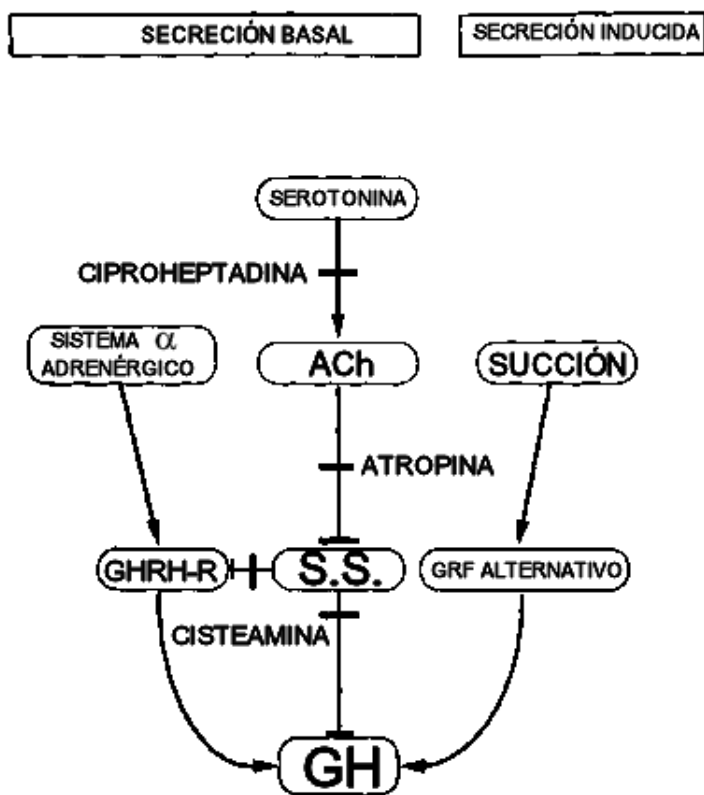
**Figura 6.11. Contenido de triacilgliceroles (TAGs) y glucógeno en hígado en crías CM y CA al 7dpn, 14dpn, y 21dpn.** Las medidas fueron obtenidas de hígados individuales (n = 6, con una pérdida en el grupo CA al 14dpn). **(A)** Las diferencias en el contenido de TAGs **(A)** y de glucógeno **(B)** en el hígado entre los grupos CM y CA, y en las diferentes edades, fueron comparadas usando un ANOVA de una vía, seguida de una post-prueba de comparaciones múltiples de Sidak para diferencias entre las edades ##### P <0.0001, ### P <0.001, ## P <0.01, # P <0.05, y para diferencias entre los grupos CM y CA, \*\*\*\* P <0.0001, \*\*\* P <0.001.



## 7. Discusión

Los niveles de GH sérica en animales CM de 7 dpn exhibieron una disminución ante la separación materna, un fenómeno previamente reportado por Kuhn *et al.* (1978). De acuerdo a Kacsóhet *al.* (1990) la caída en los niveles séricos de GH es prevenida si las crías son mantenidas a una temperatura semejante al nido, por lo tanto las ratas CM fueron mantenidas con sus compañeros de camada y a 36°C. Lo anterior sugiere que la interacción madre-cría es un componente esencial para el mantenimiento de los niveles altos de GH durante la primera semana de vida. Por el contrario, en animales CA de la misma edad y bajo las mismas condiciones de separación, este fenómeno no se observó, siendo los niveles de GH séricos antes y después de la separación similares. Esta falta de respuesta sobre los niveles de GH séricos inducidos por la separación materna, podría deberse a una adaptación por parte de las ratas sometidas al sistema de crianza artificial. Las ratas CA son mantenidas bajo condiciones constantes de temperatura así como con un periodo de alimentación constante a lo largo del periodo de crianza. La falta de respuesta en los niveles de GH séricos podría interpretarse como debida a una extinción de la respuesta a la separación materna y su asociación a la succión (Kacsóh & Grosvenor, 1991; Kuhn *et al.*, 1978; Schanberg *el alii*, 1984; Kacsóh *et al.*, 1990). No obstante lo anterior, los niveles séricos de GH después de la separación de cuatro horas fueron significativamente mayores en ratas CA respecto de las ratas CM en esas mismas circunstancias. Tomando en cuenta la red neuronal propuesta por Kacsóh & Grosvenor (1991), a los 7dpn en las ratas CA la secreción de GH es regulada por el sistema clásico de la GHRH-somatostatina, mientras que en las ratas CM de la misma edad, los niveles séricos de GH se deben al mismo sistema más la activación de un sistema de secreción alterno, aún desconocido, y estimulado por la succión (Figura 7.1.1). De manera interesante, en animales de 7dpn, pero no en animales de 14dpn, el tratamiento con haloperidol, un agonista dopaminérgico, incrementa los niveles séricos de GH, lo cual sugiere la participación de los receptores a dopamina tipo D2 (D2-R) (Iñiguez *et al.*, 1995). Basados en esta información nos preguntamos si las células somatotropas, provenientes de animales de 7dpn, expresaban el receptor a dopamina tipo D2 y si la secreción de GH basal se modificaba por la actividad de agonistas al D2-R, como en la bromocriptina. Nuestros resultados muestran que la adición de bromocriptina a cultivos celulares

adenohipofisarios, provenientes de animales de siete pero no de 14dpn de ambos grupos, inhibe la secreción espontánea de GH. Lo anterior permite sugerir que la expresión del receptor D2 adenohipofisario es transitoria y se da en etapas muy tempranas de vida. Esto fue corroborado mediante el estudio de inmuno-citoquímica en el que se observaron células GH-positivas D2-R-positivas provenientes de animales de siete pero no de 14dpn (véase Figura 6.3). Este hallazgo nos permite involucrar al D2-R como posible candidato en la inhibición, a nivel adenohipofisario, sobre la secreción de GH mediada por la separación materna. Sin embargo, no existen datos disponibles acerca de la participación de las vías hipotalámicas dopaminérgicas en la regulación de la secreción de GH mediada por la separación materna. Es más, el hecho que exista una disminución en la secreción espontánea de GH mediada por dopamina, sugiere que en el fenómeno de caída de los niveles de GH séricos por la separación materna podría encontrarse participando la dopamina sumándose a la supresión del estímulo por la succión.



**Figura 7.1.1. Mecanismos de control de la secreción de la GH en ratas infantiles.** La caída en las concentraciones séricas de GH está mediada por un mecanismo de control independiente de la regulación hipotalámica GHRHérgica o Somatostatinérgica, mismo que se propone está sostenido por la succión a través de mecanismos aún desconocidos. Tomada de Kacsoh *et al.*, 1990.

Aunado a lo anterior, la GHRH derivada de la leche materna podría estar participando en la secreción de GH (Kacsóh *et al.*, 1989). Aunque también podía deberse a que los animales CA carecen del estímulo de la secreción de GH estimulada por la interacción materna (Kacsóh & Grosvenor, 1991). Sin embargo, células adenohipofisarias cultivadas provenientes de crías CA de 7dpn exhiben niveles de secreción basal mayores que aquellas observadas en cultivos celulares provenientes de animales CM de la misma edad. Lo anterior podría estar relacionado con un desfase en el proceso de maduración de las células somatotropas en las crías CA. De manera interesante, no se observan diferencias en los niveles de expresión del ARNm de la GH adenohipofisaria entre ambos grupos. Las diferencias entre los niveles de ARNm de la GH, como la secreción basal de la hormona y las concentraciones séricas de GH observadas al 7dpn, nos sugieren que corresponden a lo que se conoce acerca del desarrollo del eje hipotálamo-hipofisario (Cella *et al.*, 1985; Walker *et al.*, 1977; Rieutort, 1981). De acuerdo a estudios anteriores, las concentraciones de SS hipotalámicas incrementan con la edad durante el periodo de lactancia y se correlacionan con una caída en los niveles séricos de GH y un incremento en las concentraciones adenohipofisarias de esta hormona (Khorram *et al.*, 1983; Walker *et al.*, 1977; Rieutort, 1981). De lo anterior se concluye que las ratas neonatas están bajo control hipotalámico estimulador sobre la secreción de GH, y así como a una ausencia de inhibición por la SS a nivel adenohipofisario, en concordancia con los altos niveles circulantes de GH durante este periodo. Lo anterior se interpreta como una inmadurez del sistema de control central de la GH.

En animales de 14dpn de ambos grupos experimentales, la respuesta de la GH tanto a la separación materna como a la acción de la bromocriptina no estuvo presente bajo las condiciones experimentales de este trabajo. No obstante, en animales de ambos grupos experimentales de 21dpn, las concentraciones séricas de GH se observaron incrementadas por la separación (materna o de la copa) por cuatro horas, mostrando ya la respuesta bien conocida en la elevación en las concentraciones séricas de esta hormona bajo condiciones de ayuno (Murray *et al.*, 2015). Por otro lado, las células adenohipofisarias cultivadas, provenientes de crías de ambos grupos

experimentales de 21dpn, exhiben una respuesta estimuladora ante la acción de la bromocriptina. Se sabe que la bromocriptina también es un agonista parcial de los receptores 5-HT tanto 1B como 2B (Newman-Tancredi *et al.*, 2002), la cual puede inducir secreción de GH (López *et al.*, 1986; Papageorgiou & Deneff, 2007).

En la secreción de GH participan reguladores hipotalámicos como la GHRH y la SS, así como reguladores periféricos como la grelina acilada o activa y el IGF-1. Cuando se analizaron los niveles circulantes de grelina acilada posterior a la separación materna por cuatro horas, observamos un mayor incremento de la grelina acilada en el grupo CA respecto al grupo CM en animales de 7dpn. El incremento sérico de la grelina acilada como respuesta a un periodo de cuatro horas de ayuno se ha reportado previamente en roedores de la misma edad (Schmidt *et al.*, 2006; Steculorum *et al.*, 2015). La principal fuente de grelina acilada durante esta edad postnatal es el páncreas (Chanoine *et al.*, 2006), y se ha establecido que las células de grelina responden ante bajas concentraciones de glucosa (Schmidt *et al.*, 2006; Sakata *et al.*, 2012). Nosotros observamos que las crías de 7dpn de ambos grupos muestran bajos niveles de glucosa como respuesta al ayuno de cuatro horas (véase Figura 6.6). De igual manera, Aguayo-Mazzucato *et al.* (2006) encontraron que las ratas de 6dpn sometidas a un ayuno de cuatro horas son hipoglucémicas con niveles séricos bajos de insulina y altos de glucagón. Durante el ayuno la grelina es secretada para prevenir una caída de las concentraciones séricas de glucosa a niveles críticos (Mani & Zigman, 2017), de hecho, la grelina inhibe la secreción de insulina y estimula la de glucagón. La única fuente de alimento que la cría recibe a la edad de 7dpn es la leche proveniente de las madres, la cual es baja en carbohidratos (Keen *et al.*, 1981). Durante la primera semana de vida la madre puede permanecer en el nido entre 18 y 13 horas por día adoptando la postura de amamantamiento de alta intensidad (Blass & Teicher, 1980), de tal forma que las crías puedan ingerir diferentes volúmenes de leche por periodos extensos. En contraste, las crías CA fueron alimentadas por ciclos de infusión de leche fijos de 10 minutos y 50 minutos de ayuno, lo cual podría inducir una respuesta a la secreción de grelina mayor ante el ayuno. No obstante, al día 14 de vida las concentraciones de grelina acilada posterior a cuatro horas de ayuno son inversas entre los grupos experimentales. Es decir, observamos que el grupo control muestra mayores concentraciones séricas tanto de esta hormona como de glucosa respecto del 7dpn, en concordancia con datos previamente reportados (Walker *et al.*, 1977). En

crías de 14dpn se sabe que la fuente principal de grelina sérica es el epitelio estomacal, o sea, las células oxínticas del epitelio estomacal e intestinal, las cuales ya maduraron y tomaron el control de la secreción de grelina (Chanoine *et al.*, 2006). A la edad de 14 días, las crías succionan por periodos más cortos como consecuencia a un menor tiempo de permanencia en el nido por parte de la madre, la cual sale en busca de agua y alimento (Blass & Teicher, 1980). Es bien sabido que las crías a esta edad ya desarrollaron la sensación de saciedad (Blass & Teicher, 1980) y ha dado inicio la ablactación. En este trabajo, cuando se observó el contenido estomacal de las crías, se encontró en las crías CM que además de leche existía ya alimento sólido. En este sentido, en crías en que se posterga el inicio de la ablactación se ha reportado que existe un retraso en el desarrollo de las células gástricas (Fåket *al.*, 2007). En este contexto, las bajas concentraciones de grelina acilada observadas en los animales CA de 14dpn podría deberse a este fenómeno, ya que no se da inicio a la ablactación. Esta interpretación es reforzada debido a que los niveles séricos de grelina acilada a las cuatro horas de ayuno en ratas CA de 7y 14dpn fueron similares. Al 21dpn los niveles séricos de grelina acilada fueron similares en ambos grupos, aunque la única fuente de alimento en el grupo CA fue sólo leche. Tomando en cuenta que las crías CA tuvieron periodos fijos de alimentación, los niveles de grelina acilada podrían ser asociados a este ritmo de infusión láctea. Con respecto a lo anterior, se ha reportado que las variaciones en la grelina sérica en respuesta a ciclos de alimentación-ayuno es un fenómeno que puede ser entrenado (condicionamiento) (Mani & Zigman, 2017).

Al analizar los cambios en las concentraciones de IGF-1 durante el periodo de lactancia en ambos grupos experimentales, observamos diferencias relacionadas a la edad. Al 7dpn, los niveles circulantes de IGF-1 son altos y van disminuyendo con la edad, no obstante, el grupo CA de 7dpn exhibió menores concentraciones de IGF-1, los cuales se correlacionan con una menor concentración de GH sérica, respecto del grupo CM de 7dpn. Estos resultados están en concordancia con el efecto de la GH sérica sobre la secreción de IGF-1, la cual es principalmente de origen hepático (Olhsson *et al.*, 2009). Con base en lo anterior, se analizaron las concentraciones hepáticas de ARNm del *Igf-1* y del receptor a GH (GHR) de ratas en situación de cuatro horas de ayuno, encontramos que las crías CA de 7dpn muestran una disminución del mensajero a *Igf-1* que concuerda con una disminución en sus concentraciones séricas tanto de IGF-1 como de GH, no obstante, la abundancia relativa del GHR, homo-dimérico, ya que no fue

diferente entre ambos grupos experimentales a la misma edad. Se ha reportado que la señalización mediada por la activación del GHR dimérico (GHR-GHR) es inhibida por un incremento en la liberación hepática del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF)-21 (Inagaki *et al.*, 2008). Esto se debe a que el FGF-21 induce la expresión de SOCS2, el cual se une a los residuos de fosfotirosinas del carboxilo terminal del GHR-GHR impidiendo el reclutamiento de STAT5b, el principal mediador de las acciones de la GH sobre el hígado (Inagaki *et al.*, 2008; Bergan-Roller & Sheridan, 2018). Además, se ha observado, en células hepáticas, que la interleucina 1 inhibe la síntesis de IGF-1 estimulada por la activación del GHR-GHR, y se ha postulado que el efecto es a nivel de la transcripción (Shumate *et al.*, 2005). Durante el desarrollo postnatal pre-destete, el epitelio estomacal está organizado en función de los requerimientos nutricionales (Pácha, 2000). La leche materna contiene diferentes factores de crecimiento, hormonas, y reguladores inflamatorios, los cuales podrían regular la proliferación y la maduración de las células del intestino (Dvorak, 2010; Gavaldá-Navarro *et al.*, 2015). Con respecto a las crías CA es necesario considerar que el cambio en el tipo de dieta al 3.5dpn de una leche materna a una fórmula láctea carente de factores bio-activos, podría inducir un proceso inflamatorio ocasionando una caída en los niveles de expresión del ARNm del IGF-1 a pesar de tener concentraciones hepáticas del GHR normales.

Una disminución de los niveles de IGF-1 durante el periodo infantil induce una disminución tanto de la circunferencia del periostio como del espesor cortical de los huesos largos (Sjögren *et al.*, 1977; Yakar *et al.*, 2002). En este contexto, la tibia de las ratas CA tienen menor densidad lineal ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) en la tibia respecto del grupo control, lo que correlaciona con los bajos niveles séricos de IGF-1. De manera interesante, en ambos grupos experimentales los niveles séricos más bajos de IGF-1 a lo largo del periodo de lactancia fueron observados al 14dpn, estos valores se correlacionaron con una caída en los niveles circulantes de GH (véase Figura 6.2B). No obstante, a esta edad, el hígado mostró un incremento en su peso con respecto al peso corporal, sin mostrar cambios en el GHR y con la mayor expresión relativa del ARNm del IGF-1. En concordancia con nuestros resultados, existe un control negativo de la transducción del ARNm del IGF-1 así como una estimulación de la proliferación celular hepática. Al momento desconocemos a que se debe este fenómeno. A pesar de esta limitación, respecto al tipo de crianza, al 21dpn la relación ARNm/proteína del IGF-1 fue invertida. Además, el peso corporal

mostró un incremento significativo, mientras que el ARNm del *Igf-1* con bajas concentraciones a nivel hepático, generó las concentraciones proteicas de IGF-1 más altas a esta edad respecto al 14dpn. Estos hallazgos podrían explicarse por la adquisición de un mayor papel del eje GH-IGF-1 sobre el crecimiento longitudinal posterior al destete. No obstante, las crías CA a esta edad mostraron hepatomegalia con hipertrofia celular, así como un incremento en las concentraciones del GHR dimérico. Una posible explicación es la falta de transición en la dieta, o sea ausencia de la ablactación. Mientras que las crías CM comienzan a ingerir alimento sólido desde el 14dpn, los animales sometidos al sistema de crianza artificial sólo reciben fórmula láctea. Teniendo en cuenta que la leche materna posee una baja proporción de carbohidratos (7.6 %) y que la dieta sólida (alimento comprimido) que recibe la madre contiene una mayor proporción de azúcares (50.8 %), entonces se observa que las crías cambian su metabolismo durante la ablactación hacia una dieta rica en carbohidratos. Nuestras observaciones en ratas de 21dpn indican que ambos grupos experimentales responden al ayuno con un incremento en las concentraciones circulantes de GH con similares respuestas sobre los niveles de glucosa sérica. El contenido de TAGs en el hígado proveniente de ratas CA de 21dpn fue mayor respecto a ratas CM de la misma edad. No obstante, las crías CA exhibieron mayores concentraciones del GHR monomérico hepático así como una mayor talla del hígado respecto del control a esta edad (21dpn). Uno de los efectos de la GH sobre el hígado es el de inducir la captura de TAGs (Vijayakumaret al., 2009). En adición a esto, los niveles de glucosa fueron mayores en las crías CA respecto al control al 21dpn, aunque su dieta fue baja en carbohidratos, sugiriendo un incremento en la gluconeogénesis (Kim et al., 2012).

De acuerdo al contenido de glucógeno hepático obtenido de las crías CM y CA en los tres diferentes días de desarrollo postnatal, no se observan diferencias entre las crías CM y CA. Lo que se observa es que a los 7dpn la concentración de glucógeno es menor que la observada en los hígados a las otras dos edades. Lo anterior se correlaciona con las concentraciones de carbohidratos que contiene la dieta y en la expresión de la hexocinasa (véase Jamdar & Greengard, 1970). La hexocinasa no permite la acumulación de la glucosa 6-fosfato ya que esta última la inhibe por un mecanismo de retroalimentación. Al día 14 dpn se presenta un incremento significativo del glucógeno en hígado que se mantiene hasta el 21dpn. Se conoce que alrededor de la segunda semana de vida postnatal, el hígado comienza a expresar la enzima

glucocinasa que permite la acumulación de glucosa-6 fosfato, la cual puede ser utilizada para la síntesis de glucógeno (Jamdar & Greengard, 1970). En la edad de 21dpn, la inducción de glucogenólisis por la GH no es el principal efecto. Más aún, uno de los efectos de la GH sobre el hígado es la de inducir la glucogenólisis (Vijayakumar *et al.*, 2009). No obstante, nuestros datos muestran que las crías CA desarrollan hipertrofia hepática con un incremento en el GHR dimérico, lo que probablemente compense la baja en la dieta con bajo contenido de carbohidratos que reciben. Cabe mencionar que durante el periodo de lactancia se encuentra activa la vía de la gluconeogénesis, siendo mayor durante los primeros días de vida postnatal para decaer con el destete. En las crías CA, al 21 dpn se presenta hipertrofia hepática e iguales concentraciones sanguíneas de glucosa que las crías CM (véase figuras 6.6 y 6.9A). Los animales CA no tuvieron el cambio de alimento, de baja a alta concentración de carbohidratos, lo que permite suponer que compensaron la falta de ingesta de carbohidratos con una mayor capacidad hepática bio-transformadora, o sea una mayor actividad gluconeogénica. De acuerdo a esta interpretación, las crías maduran a un metabolismo que involucra una dieta rica en carbohidratos al final del periodo de lactancia (Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006). Nuestros datos sugieren que las variaciones en las concentraciones séricas de GH dependen, en el periodo neonatal, de la interacción madre-cría, seguido de la adquisición de macro-nutrientes en la dieta. Este desarrollo dinámico es seguido por cambios en la GH, IGF-1 y grelina acilada que permiten a la cría madurar. Las crías sometidas a una condición de crianza artificial deben; en primer lugar, adaptarse a la ausencia de la interacción madre-cría y de sus compañeros de camada, así como al nuevo tipo de leche el cual es carente de moléculas bio-activas; y segundo, deben responder a la demanda metabólica con una alimentación que no varía en la proporción de macro-nutrientes durante este periodo.

En resumen: los resultados de la presente tesis mostraron que las crías exhiben variaciones en las concentraciones séricas de GH, IGF-1 y grelina a lo largo del período de lactancia. Estas variaciones están de acuerdo con la interacción madre-cría y con los cambios en la composición de los macro-nutrientes presentes en la dieta durante el proceso de destete, misma que cumplen con las demandas metabólicas durante este período dinámico del desarrollo. El paradigma CA enfatiza la importancia de estos factores maternos y de alimentación durante los primeros días post-natales.



## **8. Conclusiones**

Nuestros resultados mostraron que las crías exhibieron variaciones en las concentraciones séricas de GH, IGF-1 y grelina a lo largo del período de lactancia. Estas variaciones están de acuerdo con la interacción madre-cría y con los cambios en la composición de macronutrientes presentes en la dieta durante el proceso de destete, misma que cumplen con las demandas metabólicas durante este período dinámico del desarrollo. El paradigma CA enfatiza la importancia de estos factores maternos y de alimentación.

## 9. Perspectivas

- I.** Analizar los neuro-transmisores que promueven la secreción de GH estimulada por la succión
- II.** Modificar la proporción de macro-nutrientes en la formula que reciben las crías CA, en concordancia con los cambios en las proporciones de macro-nutrientes de la leche materna observados durante a lo largo de la lactancia. Con el fin de prevenir las alteraciones metabólicas observadas
- III.** Analizar en animales adultos criados bajo CA en las mismas condiciones de este trabajo, los sistemas involucrados en el control del hambre y la saciedad

## 10. Anexo 1. Preparación de la leche utilizada bajo el sistema de crianza artificial.

Se utilizó la dieta “modificada de Messer” (Messer *et al.*, 1969; Smart *et al.*, 1983; Diaz *et al.*, 1982) y durante su elaboración se observan dos partes: una mineral y otra que contiene aminoácidos, calcio, proteína y vitaminas (solución B), mismas que son mezcladas con leche evaporada Carnation®, aceite vegetal, y una sal biliar.

Materiales:

1. 12.5 ml de solución mineral (mg/ml de agua desmineralizada):
  - a. sulfato de zinc heptahidratado,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (4.24),
  - b. sulfato de cobre,  $CuSO_4$  (2.4),
  - c. sulfato ferroso,  $FeSO_4$  (4.4),
  - d. cloruro de potasio,  $KCl$  (40),
  - e. cloruro de magnesio,  $MgCl$  (40).
2. 112.5 ml de solución B (g):
  - a. L-metionina (0.5),
  - b. triptófano (0.25),
  - c. fosfato de calcio tribásico (2.75),
  - d. proteína de soya (17.5),
  - e. vitamina “Vita Mix”® (2.5).
3. Ácido desoxicólico (0.1 mg/ml de leche preparada)
4. Una lata de leche evaporada Carnation® de 360 g
5. Aceite comestible (6.5 ml/100 ml de leche preparada).
6. Jeringas con 10 ml de capacidad.

## PREPARACIÓN DE LA LECHE.

Se mezclaron, la solución mineral, la solución B, el ácido desoxicólico, el aceite y la leche Carnation, y con el fin de incorporar todo se utilizó una batidora eléctrica hasta obtener un homogenado. La mezcla láctea fue colocada en alícuotas para su pasteurización (90 minutos a 60-65 °C y enfriadas a 4 °C) y posterior almacenaje en refrigeración hasta su uso.

## CONSIDERACIONES

Se ha reportado que la alimentación de ratas en crianza artificial con “dieta Messer” da como resultado una tasa de crecimiento insuficiente a partir de la tercera semana de vida (periodo que coincide con la ablactación) *versus* aquellos alimentados por su madre (Diaz *et al.*, 1981; Figura 1a). Se ha argumentado que esta dieta pose 5 g de proteína por cada 100 ml de leche, mientras que la leche de rata pose entre 8-9 g/100 ml. De manera interesante la adicción de 3 g de proteína por cada 100 ml de leche, resulta en tasas de crecimiento semejantes a las de los animales control (Diaz *et al.*, 1982; Figura 1 b). En este trabajo la concentración de proteína de soya utilizada es de 3.5 g por cada 100 ml de leche preparada, mientras que la leche “Carnation®” (en su presentación de 360 g que contiene 20.16 g de proteína por lata) otorga 4.032 g de proteína por cada 100 ml de leche preparada. Tomando los datos anteriores obtenemos una concentración proteica final de 7.532 g/100 ml de leche preparada. Aunque en este trabajo se agregan 0.5 g/100 ml más que en el trabajo de Diaz *et al.* (1982), las concentraciones de proteína presentes en las leches Carnation utilizadas en ambos trabajos difieren. Lo anterior se debe a que la presentación de 360 g contiene 4.032 g/100 ml, mientras que la de 375 ml es de 6 g/100 ml, dando como resultado un aporte proteico menor al 6 % en la leche utilizada en este trabajo (véase Tabla 1 de este anexo).

Tabla 1. Componentes presentes en la leche <b>utilizada</b> en este trabajo versus la leche <b>reportada</b> por Diaz <i>et al.</i> , 1981 y 1982.				
	mg/ml		(g/100 ml)=%	
	Utilizada	Diaz	Utilizada	Diaz
<b>Proteína de soya</b>	<b>35</b>	-	<b>3.5</b>	-
Caseína hidrolizada	-	30	-	<b>3</b>
Vitamin mix	5		0.5	
Proteína "Vitamin mix"	0.0			
Carbohidratos "Vitamin mix"	<b>4.8</b>		0.48	
Metionina	1	2	0.1	0.2
Fosfato de calcio tribásico	5.5	-	0.55	-
Triptófano	0.5	0.5	0.05	0.05
Ac. Desoxicólico	0.1	0.17	0.01	0.017
Grasas	65	60	6.5	6.0
<i>Grasa Carnation®</i>	<i>44.64</i>	<i>66</i>	<i>4.464</i>	<i>6.6</i>
<i>Carbohidratos Carnation®</i>	<i>76.32</i>	<i>92.25</i>	<i>7.632</i>	<i>9.225</i>
<b><i>Proteína Carnation®</i></b>	<b><i>40.32</i></b>	<b><i>60</i></b>	<b><i>4.032</i></b>	<b><i>6</i></b>
ZnSO <sub>4</sub>	0.059	0.032	0.0059	0.0032
CuSO <sub>4</sub>	0.06	0.021	0.006	0.0021
FeSO <sub>4</sub>	0.11	0.0414	0.011	0.00414
KCl	1	-	0.1	-
MgCl	1	-	0.1	-
Macronutrientes expresados en g/100 ml de leche (% macronutrientes-% de la dieta)				
	Utilizada		Literatura	
			Diaz <i>et al.</i> , 1983	Smart <i>et al.</i> , 1989
Grasas	10.964 (42-39.78)		12.6 (42-40.51)	13.8 (48.6-NR)
Carbohidratos	8.112 (29-27.69)		9.22 (31-29.66)	2.9 (10.2-NR)
Proteínas	7.532 (29-27.33)		8.0 (27-28.94)	*11.7 (41.2-NR)
	12.98,17.22, y 5.85 %			
Las diferencias en la proporción de macro-nutrientes radica en las presentaciones de 360 g de "Carnation®" utilizada en este trabajo y la presentación de 375 ml de "Carnation" usada por Diaz <i>et al.</i> , 1981 y 1982.				
*Proporción de 61:39 (caseína:suero de leche); NR: no reportado.				
Diaz <i>et al.</i> , 1981. Journal of Nutrition 112:841-847; Diaz <i>et al.</i> , 1982. Physiology and Behavior 27: 1103-1105.				
Smart <i>et al.</i> , 1989. The Journal of Comparative Neurology 289:89-98				

Composición del complemento “Vitamin Mix (AIN-93-VX)”	
	Cantidad (g/kg)
Ácido nicotínico	3.00
Pantotenato de D-calcio	1.60
Piridoxina HCl	0.70
Tiamina HCl	0.60
Riboflavina	0.60
Ácido fólico	0.20
D-Biotina	0.02
Vitamina B12 (0.1% triturado en manitol)	2.50
Polvo de $\alpha$ -tocoferol (250 U / g)	30.00
Palmitato de vitamina A (250,000 U / g)	1.60
Vitamina D3 (400,000 U / g)	0.25
Filoquinona	0.075
Sacarosa en polvo	959.655
Número de catálogo: 960402	
Reeves y cols., 1993 (J. Nutr. 123: 1939-1951, 1993)	

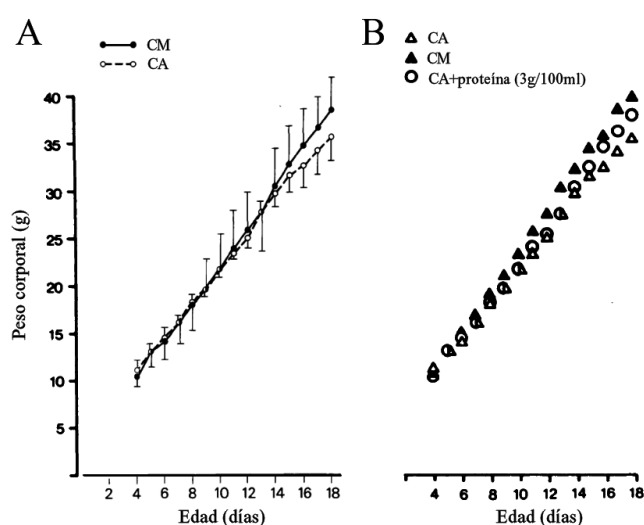


Figura 1. Peso corporal en ratas de 4 a 18 días de edad criadas por su madre o en un sistema de crianza artificial. En A se observa que al día 14 existe una caída en la tasa de crecimiento en los animales criados de forma artificial (CA, círculos abiertos) en comparación a los criados por su madre (círculos cerrados). En B se observa que cuando las crías CA reciben en su dieta 3 g de proteína por cada 100 ml de leche (círculos abiertos), la tasa de crecimiento es semejante a las crías CM (triángulos cerrados). Datos (media±EEM, o sólo la media) tomados de Diaz *et al.*, 1981 y 1982 para A y B, respectivamente.

## 11. Bibliografía

1. Aguayo-Mazzucato C, Sánchez-Soto C, Godínez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G & Hiriart M. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLOS ONE* 2006; 20:1e35. DOI: 10.1371/journal.pone.0000035.
2. Aguirre-Benítez EL, Porras MG, Parra L, González-Ríos J, Garduño-Torres DF, Albores-García D, et al. Disruption of behavior and brain metabolism in artificially reared rats. *Dev Neurobiol* 2017; 77: 1413–1429, 2017 DOI 10.1002/dneu.22548
3. Aïn SA, Perry RE, Nuñez B, Kayser K, Hochman C, Brehman E, et al. Neurobehavioral assessment of maternal odor in developing rat pups: implications for social buffering. *Soc Neurosci* 2017; 12: 32-49. DOI:10.1080/17470919.2016.1159605
4. Arellanes-Licea S, Ávila-Mendoza J, Ramírez-Martínez EC, Ramos E, Uribe-González n, Arámburo C, et al. Upregulation of GH, but not IGF1, in the hippocampus of the lactating dam after kainic acid injury. *Endocr Connect* 2018; DOI: 10.1530/EC-17-0380.
5. Baquero, AF., de Solís, AJ., Lindsley, SR., Kirigiti, MA., Smith, MS., Cowley, MA., Zeltser, LM., Grove, KL. Developmental Switch of Leptin Signaling in Arcuate Nucleus Neurons. *The Journal of Neuroscience*, July 23, 2014 • 34(30):9982–9994
6. Bello-Pineda J, Luna J, Romano MC, Mendoza ME. Developmental changes in LH secretion by male pituitaries in vitro: from the infantile to adult period. *J Endocrinol* 1999; 160:333-341. DOI: 10.1677/joe.0.1600333
7. Bergan-Roller HE & Sheridan MA. The growth hormone signalling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *Gen Comp Endocrinol* 2018; 258:119-133. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.07.028.
8. Bertherat, J., Bluet-Pajot, MT., Epelbaum, J. Neuroendocrine regulation of growth hormone. *European Journal of Endocrinology* 1995; 132:12-24
9. Blass EM & Teicher MH. Suckling. *Science* 1980; 210: 15-22. DOI: 10.1126/science.6997992
10. Bonnefont X, Lacampagne A, Sanchez-Hormigo A, Fino E, Creff A, Mathieu MN, et al. Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *PNatl Acad Sci USA* 2005; 102: 16880-16885. DOI: 10.1073/pnas.0508202102

11. Caro, JF., Poulos, J., Ittoop, O., Pories, WJ., Flickinger, EG., Sinha, MK. Insulin-like Growth Factor I Binding in Hepatocytes from Human Liver, Human Hepatoma, and Normal, Regenerating, and Fetal Rat Liver. *Clin Invest.* 1988; 81(4):976-981. Doi:10.1172/JCI113451.
12. Chanoine J-P, Wong ACK & Barrios V. Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Horm Res* 2006; 66: 81-88. DOI: 10.1159/000093585
13. Chen, C., Xu, R., Clarke, IJ., Ruan, M., Loneragan, K., Roh, SG. Diverse intracellular signalling systems used by growth hormone-releasing hormone in regulating voltage-gated Ca<sup>2+</sup> or K<sup>+</sup> channels in pituitary somatotropes. *Immunology and Cell Biology* 2000; 78:356–368
14. Chen, C., Xu, R., Clarke, IJ., Ruan, M., Loneragan, K., Roh, SG. Diverse intracellular signalling systems used by growth hormone-releasing hormone in regulating voltage-gated Ca<sup>2+</sup> or K channels in pituitary somatotropes. *Immunol Cell Biol* 2000; 78(4):356-68. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2000.00917.x
15. Cogan, JD., Phillips, JA. Inherited Defects in Growth Hormone Synthesis and Action. In: Scriver CH, editor. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 1995. pp. 3023–3044.
16. Cohen, L.E., Hashimoto, Y., Zanger, K., Wondisford, F., Radovick, S. CREB-independent regulation by CBP is a novel mechanism of human growth hormone gene expression. *J Clin Invest* 1999; 104(8):1123-30.
17. Cohen, RN., Brue, T., Naik, K., Houlihan, CA., Wondisford, FE., Radovick, S. The role of CBO/p300 interactions and Pit-1 dimerization in the pathophysiological mechanism of combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:239–247.
18. Dvorak B. Milk epidermal growth factor and gut protection. *J Pediatr* 2010; 156: S31-S35. DOI: 10.1016/j.jpeds.2009.11.018
19. Edén S. Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 1979; 105:555-560. DOI: 10.1210/endo-105-2-555
20. Eppler, E., Jevdjovic, T., Maake, C. Reinecke, M. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and its receptor (IGF-1R) in the rat anterior pituitary. *European Journal of Neuroscience* 2007; 25: 191–200. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05248.x.



21. Fåk F, Friis-Hansen L, Weström B, Wierup N. Gastric ghrelin cell development is hampered and plasma ghrelin is reduced by delayed weaning in rats. *JEndocrinol*2007; 192: 345-352. DOI: 10.1677/joe.1.07077
22. Freemark, M., D'ercole, AJ., Handwerger, S. Somatomedin-C Stimulates Glycogen Synthesis in Fetal Rat Hepatocytes. *Endocrinology* 1985; 116: 2578-2582.
23. Gavaldà-Navarro A, Hondares E, Giralt M, Mampel T, Iglesias R & Villarroya F. Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci Rep*2015; 5:13717. DOI: 10.1038/srep1317.
24. Grosvenor CE, Picciano MF & Baumrucker CR. Hormones and growth factors in milk. *Endocrine Reviews* 1993;14: 710-728. DOI: 10.1210/er.14.6.710
25. Gruszka A, Culler MD & Melmed S. Somatostatin analogs and chimeric somatostatin-dopamine molecules differentially regulate human growth hormone and prolactin gene expression and secretion in vitro. *Mol Cell Endocrinol*2012; 362: 104-109. DOI: 10.1016/j.mce.2012.05.020
26. Gulyás M, Ács Z, Rappay G & Makara GB. Corticotroph, somatotroph and mammatroph cell kinetics in the postnatal infant female rat. *Histochemistry* 1993;100: 503-507. DOI: 10.1007/BF00267832
27. Guo, L., Costanzo-Garvey, DL., Smith, DR., Zavorka, ME., Venable-Kang, M., MacDonald, RG., Lewis, RE. Cell non-autonomous regulation of hepatic IGF-1 and neonatal growth by Kinase Suppressor of Ras 2 (KSR2). *Scientific Reports* 2016; 6:32093. DOI: 10.1038/srep32093
28. Hahn, P., Koldovsky, O. Utilization of Nutrients during Postnatal Development. Pergamon, New York, 1967. 189 pp.
29. Hall WG. Weaning and growth of artificially reared rats. *Science*1975; 190: 1313-1315. DOI: 10.1126/science.1198116
30. Hellström, A., Ley, D., Hansen-Pupp, I., Hallberg, B., Ramenghi, LA., Löfqvist, C., Smith, LEH., Hård, AL. Role of Insuline-like Growth Factor 1 in fetal development and in the early postnatal life of premature infants. *Am J Perinatol* 2016, 33:1067-1071. Doi:10.1055/s-0036-1586109
31. Henning SJ. Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol-Gastr*1981; 241:G199-G214. DOI: 10.1152/ajpgi.1981.241.3.G199

32. Hepler, JE., Van Wyk, JJ., Lund, PK. Different half-lives of insulin-like growth factor I mRNAs that differ in length of 3' untranslated sequence. *Endocrinology* 1990; 127(3):1550-2.
33. Inagaki, T., Lin, VY., Goetz, R, Moosa Mohammadi, M., Mangelsdorf, DJ., Kliewer, SA. Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone fgf21. *Cell Metab* 2008; 8(1): 77–83. doi:10.1016/j.cmet.2008.05.006.
34. Iñiguez C, Tamayo P, Gómez A, Gayoso MJ. Effects of perinatal administration of haloperidol on GH pituitary contents and serum levels during the first postnatal month. *Neuroendocrinology* 1995 62:308-12.
35. Jamdar, S.C., Greengard, O. Premature formation of glucokinase in developing rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 1970; 245:2779-2783
36. Jouihan, H. Measurement of Liver Triglyceride Content. *Bio-protocol* 2012; 2(13): e223. DOI: 10.21769/BioProtoc.223.
37. Kacsóh B & Grosvenor CE. Regulation of basal and nursing-induced secretion of growth hormone in the neonatal rat: the involvement of serotonergic, muscarinic cholinergic, alpha2-adrenergic, somatostatin and growth hormone-releasing hormone systems. *J Neuroendocrinol* 1991; 3:529-537. DOI: 10.1111/j.1365-2826.1991.tb00314.x
38. Kacsóh B, Meyers JS, Crowley WR & Grosvenor CE. Maternal modulation of growth hormone secretion in the neonatal rat: involvement of mother-offspring interactions. *J Endocrinol* 1990; 124: 233-240.
39. Kacsóh B, Terry LC, Meyers JS, Crowley WR & Grosvenor CE. Maternal modulation of growth hormone secretion in the neonatal rat. I. Involvement of milk factors. *Endocrinology* 1989; 125: 1326-1336. DOI: 10.1210/endo-125-3-1326
40. Kacsóh, B., Tóth, BE., Grosvenor, CE. Thyrotropin-releasing hormone mediates growth hormone release induced by milk and nursing in neonatal rats. *J Neuroendocrinol* 1992; 4(6):663-72. doi: 10.1111/j.1365-2826.1992.tb00217.x.
41. Kappeler, L., Filho, CDM., Dupont, J., Leneuve, P., Cervera, P., Périn, L., Loudes, C., Blaise, A., Klein, R., Epelbaum, J., Le Bouc, Y., Holzenberger, M. Brain igf-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS Biol* 2008 6(10): e254. doi:10.1371/journal.pbio.0060254.

42. Keen CL, Lönnerdal B, Clegg M & Hurley LS. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *J Nutr*1981; 111: 226-236. DOI:10.1093/jn/111.2.226
43. Khorram O, DePalatis LR, McCann SM. Development of hypothalamic control of growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 1983, 113:720-728. DOI: 10.1210/endo-113-2-720
44. Kim YD, Li T, Ahn S-W, Kim D-K, Lee J-M, Hwang S-L, et al. Orphan Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner Negatively Regulates Growth Hormone-mediated Induction of Hepatic Gluconeogenesis through Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) Transactivation. *J BiolChem* 2012 26; 287(44): 37098–37108. DOI: 10.1074/jbc.M112.339887
45. Kopchick, JJ. Lessons learned from studies with the growth hormone receptor. *Growth Hormone & IGF Research* 2016; 28:21–25
46. Kuhn CM, Butler SR & Schanberg SM. Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. *Science*1978; 201: 1034-1036. DOI: 10.1126/science.684424
47. Laios, K., Androutsos, G., Piagkou, M., Moschos, MM. Hypophysis. From outgrowth, to ocular disorder to pituitary gland. *Hormones* 2017; 16(1): 99–100
48. Law, SF., Yasuda, K., Bell, GI., Reisine, T. Gi alpha 3 and G(o) alpha selectively associate with the cloned somatostatin receptor subtype SSTR2. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 10721-10727.
49. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu J-L & Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev*2001; 22: 53-74. DOI: 10.1210/edrv.22.1.0419
50. Le Roith D, Scavo LM & Butler AA. What is the role of circulating IGF-1? *Trends Endocrin Met*2001; 12:48-52. DOI: 0.1016/S1043-2760(00)00349-0
51. Lee, HM., Wang, G., Englander, EW., Kojima, M., Greeley, GH. Ghrelin, A New Gastrointestinal Endocrine Peptide that Stimulates Insulin Secretion: Enteric Distribution, Ontogeny, Influence of Endocrine, and Dietary Manipulations. *Endocrinology* 2002 143(1):185–190.
52. Levy F, Melo AI, Galef, BG, Madden M, Fleming AS. Complete maternal deprivation affects social, but not spatial learning in adult rats. *Dev Psychobiol*2003; 43:177-191

53. Liu, JL., Yakar, S., Leroith, D. Conditional knockout of mouse insulin-like growth factor-1 gene using the cre/loxp system (44500). P.S.E.B.M. 2000; (223): 344-351
54. Lomanowska AM & Melo AI. Deconstructing the function of maternal stimulation in offspring development: Insights from the artificial rearing model in rats. *HormBehav* 2016; 77: 224-236. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2015.05.017
55. López F, González D & Aguilar E. Serotonin stimulates GH secretion through a direct pituitary action: studies in hypophysectomized autografted animals and in perfused pituitaries. *ActaEndocrinol (Copenh)* 1986; 113: 317-322. DOI: 10.1530/acta.0.1130317
56. Mani BK & Zigman JM. Ghrelin as a survival hormone. *Trends EndocrinMet* 2017; 28: 843-854. DOI: 10.1016/j.tem.2017.10.001
57. Melmed, S. editor (2011). *The pituitary*. 3rd ed. Los Angeles, CA, USA: Elsevier.
58. Melo AI, Lovic V, Gonzalez A, Madden M, Sinopóli K & Fleming AS. Maternal and littermate deprivation disrupts maternal behavior and social-learning of food preference in adulthood: tactile stimulation, nest odor, and social rearing prevent these effects. *Dev Psychol* 2006; 48: 209-219. DOI: 10.1002/dev.20130
59. Melo, AI. Role of sensory, social, and hormonal signals from the mother on the development of offspring. *AdvNeurobiol* 2015; 10:219-248. DOI: 10.1007/978-1-4939-1372-5\_11.
60. Messer M, Thoman EB, GalofreTerrasaA & Dallman PR. Artificial feeding of infant rats by continuous infusion. *J Nutr* 1969; 98: 404-410. DOI: 10.1093/jn/98.4.404
61. Møller N & Jørgensen JOL. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *EndocrRev* 2009; 30: 152-177. DOI: 10.1210/er.2008-0027
62. Morash, BA., Imran, A., Wilkinson, D., Ur, E., Wilkinson, M. Leptin receptors are developmentally regulated in rat pituitary and hypothalamus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003; 210:1-8
63. Müller, E.E., Locatelli, V., Cocchi, D. Neuroendocrine Control of Growth Hormone Secretion. *Physiological Reviews* 1999; 79: 511-607.
64. Murray PG, Higham CE & Clayton PE. 60 years of Neuroendocrinology: The hypothalamo-GH axis: the past 60 years. *J Endocrinol* 2015; 226: T123-T140. DOI: 10.1530/JOE-15-0120

65. Nagy, G., Kacsóh, B., Kanyicska, B., Tóth, BE., Korasz, E. Separation and suckling-induced changes in serum growth hormone levels of lactating rats and their pups. *Endocrinologia Experimentalis* 1986; 20(2-3):217-222
66. Newman-Tancredi A, Cussac D, Quentric Y, Touzard M, Verrièle L, Carpentier N, et al. Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. III. Agonist and antagonist properties at serotonin, 5-HT1 and 5-HT2, receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 815-822. DOI: 10.1124/jpet.102.039875
67. Núñez, L., Villalobos, C., Senovilla, L., García-Sancho, J. Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *J Physiol* 2003; 549.3: 835–843. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.040758.
68. Oberbauer, AM. The Regulation of IGF-1 Gene Transcription and Splicing during Development and Aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 39-. doi: 10.3389/fendo.2013.00039
69. Olhsson C, Mohan S, Sjögren K, Tivesten Å, Isgaard J, Isaksson O, et al. The role of liver-derived Insulin-Like Growth Factor-1. *Endocr Rev* 2009; 30: 494-535. DOI: 10.1210/er.2009-0010
70. Pácha J. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev* 2000; 80: 1633-1667. DOI: 10.1152/physrev.2000.80.4.1633
71. Papageorgiou A & Deneff C. Stimulation of growth hormone release by 5-hydroxytryptamine (5-HT) in cultured rat anterior pituitary cell aggregates: Evidence for mediation by 5-HT2B, 5-HT7, 5-HT1B, and ketanserin-sensitive receptors. *Endocrinology* 2007; 148: 4509-4522. DOI: 10.1210/en.2007-0034
72. Pinilla, L., Barreiro, ML, Tena-Sempere, M, Aguilar, E. Role of ghrelin in the control of growth hormone secretion in prepubertal rats: interactions with excitatory amino acids. *Neuroendocrinology* 2003; 77:83–90. DOI: 10.1159/000068652.
73. Rainecki C, Pickenhagen A, Roth TL, Babstock DM, McLean JH, Harley CW, et al. The neurobiology of infant maternal odor learning. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43: 914-919
74. Renier G & Serri O. Effects of acute and prolonged glucose excess on growth hormone release by cultured rat anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 1991; 54: 521-525. DOI: 10.1159/000125947

75. Rieutort. Ontogenetic development of the inhibition of growth hormone release by somatostatin in the rat: in-vivo and in-vitro (perifusion) study. *J Endocr* 1981, 89:355-363
76. Rodriguez, EM., Blázquez, JL., Guerra, M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31(4):757-776
77. Rodríguez, EM., Guerra, M., Peruzzo, B., Blázquez, JL. Tanycytes: A rich morphological history to underpin future molecular and physiological investigations. *Journal of Neuroendocrinology* 2019: 1-29
78. Romero, C.J, Pine-Twaddell, E., Sima, D.I., Miller, R.S., He, L., Wondisford, F., Radovick, S. Insulin-Like Growth Factor 1 Mediates Negative Feedback to Somatotroph GH Expression via POU1F1/CREB Binding Protein Interactions. *Mol Cell Biol* 2012; 32(21): 4258–4269.
79. Romero, CJ., Dauber, AN., Cohen, LE. Childhood Growth Hormone Deficiency and Hypopituitarism 3-27. In S. Radovick and M.H. MacGillivray (eds.), *Pediatric Endocrinology: A Practical Clinical Guide*, 3 Second Edition, Contemporary Endocrinology, DOI 10.1007/978-1-60761-395-4\_1, © Springer Science+Business Media New York 2013
80. Sakata I, Park W-M, Walker AK, Piper PK, Chuang J-C, Osborne-Lawrence S, et al. Glucose-mediated control of ghrelin release from primary cultures of gastric mucosal cells. *AmJPhysiol-Endoc M*2012; 302: E1300-E1310. DOI: 10.1152/ajpendo.00041.2012
81. Schanberg SM, Evoniuk G & Kuhn CM. Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development. *P Soc ExpBiolMed*1984; 175: 135-146. DOI: 10.3181/00379727-175-41779
82. Schwartz,MW., Woods, SC., Porte, DJ., Seeley, RJ., Baskin, DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404(6778):661-71.
83. Shumate ML, Yumet G, Ahmed TA, Cooney RN. Interleukin-1 inhibits the induction of insulin-like growth factor-I by growth hormone in CWSV-1 hepatocytes. *Am J PhysiolGastrointestLiver Physiol*2005; 289:G227-G239. DOI: 10.1152/ajpgi.00424.2004
84. Sjögren K, Sheng M, Movérare S, Liu J-L, Wallenius K, TörnellJ,et al. Effects of liver-derived Insulin-Like Growth Factor 1 on bone metabolism in mice. *J BoneMiner Res*2002; 17: 1977-1987. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.11.1977

85. Smart JL, Stephens DN & Katz HB. Growth and development of rats artificially reared on a high or a low plane of nutrition. *Brit J Nutr* 1983; 49: 497-506. DOI: 10.1079/BJN19830058
86. Solloso, A., Barreiro, L., Seoane, R., Nogueira, E., Cañibano, C., Alvarez, CV., Zalvide, J., Diéguez, C., Pombo, CM. GHRH proliferative action on somatotrophs is cell-type specific and dependent on PIT-1/GHF-1 expression. *J. Cell. Physiol* 2008; 215: 140–150
87. Sperling MA. Traditional and novel aspects of the metabolic actions of growth hormone. *GrowthHorm IGF Res* 2016; 28: 69-75. DOI: 10.1016/j.ghir.2015.06.005
88. Steculorum SM & Bouret SG. Developmental effects of ghrelin. *Peptides* 2011; 32: 2362-2366. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.021
89. Steculorum SM, Collden G, Coupe B, Croizier S, Lockie S, Andrews ZB, et al. Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. *J Clin Invest* 2015; 125: 846-858. DOI: 10.1172/JCI73688
90. Steculorum, SM., Collden, G., Coupe, B., Croizier, S., Lockie, S., Andrews, ZB., Jarosch, F., Klussmann, S., Bouret, SG. Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. *The Journal of Clinical Investigation* 2014. DOI: 10.1172/JCI73688.
91. Szentágothai, J, Flerkó, B, Mess, B. Halász, B. (1962) Chapter II: Anatomical considerations. In: Szentágothai, J, Flerkó, B, Mess, B. (eds) *Hypothalamic Control of the Anterior Pituitary; an Experimental-morphological Study*. Budapest: Akadémiai Kiadó, pp. 110–155.
92. Taniguchi Y, Yasutaka S, Kominami R & Shinohara H. Proliferation and differentiation of rat anterior pituitary cells. *Anat Embryol* 2002; 206: 1-11. DOI: 10.1007/s00429-002-0271-8
93. Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, JM., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., Ihle, JN. Stat5a and Stat5b Proteins Have Essential and Nonessential, or Redundant, Roles in Cytokine Responses. *Cell* 1998; 93: 841–850
94. Tiong, TS., Herington, AC. Ontogeny of messenger RNA for the rat growth hormone receptor and serum binding protein. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1992; 83: 33-141.
95. Vesalius, A. (1543). *Andrae Vesalii Bruxellensis, scholae medicorum Patavinae professoris, de Humani corporis fabrica Libri septem*. Basileae, (<http://dx.doi.org/10.3931/e-rara-20094>).
96. Vijayakumar A, Novosyadlyy R, Wu Y, Yakar S & LeRoith D. Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *GrowthHorm IGF Res* 2012; 20: 1-7. DOI: 10.1016/j.ghir.2009.09.002

97. Vijayakumar, A., Yakar, S., LeRoith. D. The Intricate Role of Growth Hormone in Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011; 2: 32. doi: 10.3389/fendo.2011.00032
98. Walker P, Dussault JH, Alvarado-Urbina G, Dupont A. The development of the hypothalamus-pituitary axis in the neonatal rat: hypothalamic somatostatin and pituitary and serum hormone concentrations. *Endocrinology* 1977, 101:782-787. DOI: 10.1210/endo-101-3-782
99. Watson, RT., Saltiel, AR., Pessin, JE.,Kanzaki, M. Subcellular compartmentalization of insulin signaling processes and GLUT4 trafficking events. In: *Mechanisms of insulin action / [edited by] Alan R. Saltiel, Jeffrey E. Pessin*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6012/>
100. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CI, Taheri S, et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141: 4325-4328. DOI: 10.1210/endo.141.11.7873
101. Wu, M., Hall, JB., Akers, RM., Jiang, H. Effect of feeding level on serum IGF1 response to GH injection. *Journal of Endocrinology* 2010; 206: 37–45
102. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu J-L, et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulates bone growth and density. *J ClinInvest*2002; 110: 771-781. DOI: 10.1172/JCI15463
103. Zatelli MC, Piccin D, Tagliati F, Bottoni A, Ambrosio MR, Margutti A, et al. Dopamine receptor subtype 2 and somatostatin receptor subtype 5 expression influences somatostatin analogs effects on human somatotroph pituitary adenomas in vitro. *J MolEndocrinol*2005; 35: 333-341. DOI: 10.1677/jme.1.01876
104. Zempoalteca R, Porrás MG, Moreno-Pérez S, Ramírez-Funes G, Aguirre-Benítez EL, González Del Pliego M, et al. Early postnatal development of electrophysiological and histological properties of sensory sural nerves in male rats that were maternally deprived and artificially reared: Role of tactile stimulation. *Dev Neurobiol*2018; 78: 351-362. DOI: 10.1002/dneu.22561
105. Zhang, P. Analysis of Mouse Liver Glycogen Content. *Bio-protocol* 2012; 2(10): e186. DOI: 10.21769/BioProtoc.186.