



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM JURQUILLA, QRO.

**“ANÁLISIS DE LAS PROLACTINAS COMO
MEDIADORES CENTRALES DE LA RESPUESTA
DE ANSIEDAD AL ESTRÉS”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (Neurobiología)
P R E S E N T A
Biol. Heidi Miriam Zamorano Rojas

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP

Juriquilla, Querétaro.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi madre por dar su mano siempre en mi camino, a mis hermanas por su apoyo y cariño.

A mis angelitos, por darme su alegría (Gigi, Nini, Bili, Facu)

A Hugo, por su cariño, apoyo, comprensión solidaridad y su infinita confianza.

A mi tutora, Carmen Clapp, por su apoyo, confianza y su guía en mi formación.

A los miembros de mi comité tutorial por su paciencia y dirección, Dr. Roberto Prado, Dra. Teresa Morales y a los miembros del jurado que realizaron valiosas observaciones, Dra. Luz Torner, Dra. Carmen Aceves, Dr. Carlos Arámburo.

A mis amigos, por su apoyo incondicional y buenos momentos: Carlos, Jessy, Jorge, Cecy, Celina, Jessica, Claudia, Luz. De igual manera agradezco el apoyo técnico y amistad del M. En C. Gabriel Nava Pinto, Nut. Fernando López Barrera y de los laboratoristas Antonio Prado Galán y Daniel Mondragón Huerta.

Agradezco el apoyo y la paciencia de Q. Leonor Casanova Rico, María del Carmen Vázquez Rodríguez, Yolanda Orduña Cruz, Magdalena reyes Olán.

Agradezco todo el apoyo recibido de los miembros de la biblioteca del Instituto de Neurobiología; Bib. Pilar Galarza Barrios, Ignacio Caballero Navarro, Rafael Silva Cruz, de igual manera agradezco el apoyo del MVZ. Martín García Servín.

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. PROLACTINA	4
a. Funciones	4
b. Estructura	8
c. Receptor y vías de señalización	9
d. Sitios de producción	11
3. PRL Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	11
a. Funciones	11
b. PRL neural	14
4. ESTRÉS	17
a. Definición	18
5. RESPUESTA FISIOLÓGICA ALESTRÉS	18
a. Activación del sistema nervioso autónomo	20
b. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA)	21
6. RESPUESTA CONDUCTUAL DE ANSIEDAD	22
a. Definición	22
7. PRL Y ESTRÉS	24
8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
9. HIPÓTESIS	26
10. OBJETIVOS	26
11. MATERIALES Y MÉTODOS	27
a. Animales	27
b. Inmovilización	27
c. Extracción de los núcleos hipotalámicos por micropunción	28
d. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	29
e. Introducción de las cánulas guía y microinyección	29
f. Prueba conductual de la Plataforma Elevada (“Elevated Plus Maze”)	30
g. Análisis estadístico	30
	31
	31

12.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
a.	Efecto del estrés por inmovilización sobre la expresión del RNA mensajero de PRL en el hipotálamo y en núcleos hipotalámicos aislados	31
b.	Efecto de la administración de la PRL y de la PRL-16K en el hipotálamo sobre la conducta de ansiedad.	38
13.	CONCLUSIONES	44
14.	BIBLIOGRAFÍA	45
15.	APÉNDICE	57

RESUMEN

La prolactina (PRL) es una hormona con múltiples funciones, algunas de las cuales se ejercen sobre el sistema nervioso central. Recientemente se ha demostrado que la PRL puede inhibir la conducta de ansiedad y la secreción de la hormona adrenocorticotrópica en respuesta al estrés a través de sus receptores presentes en el cerebro. El hipotálamo es un sitio probable donde la PRL pudiera ejercer sus funciones inhibitorias, dado que en el hipotálamo se integran efectos del estrés sobre la conducta de ansiedad y la activación del sistema hipofisis-adrenal, además de que diversos núcleos hipotalámicos expresan tanto a la PRL como a su receptor. En este estudio nos propusimos investigar si el estrés modifica la producción de PRL en el hipotálamo y si este efecto incluye a los núcleos supraóptico (NSO), paraventricular (NPV), ventromedial (NVM) y núcleo arcuato (NARC). Con este propósito determinamos el efecto de someter a la rata a un período de estrés por inmovilización de 30 minutos sobre la expresión del RNA mensajero de PRL en hipotálamos completos y en los núcleos hipotalámicos aislados por micropunción. El RNA mensajero se evaluó mediante retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa. Confirmamos que el estrés estimula significativamente la expresión del RNA mensajero en el hipotálamo, y más importante demostramos que resulta en un incremento de 100 y 10 veces la expresión basal del RNA mensajero de PRL en el NPV y el NSO, respectivamente. No se observaron cambios en los núcleos NVM y NARC. Por otra parte, dado que en el hipotálamo la PRL es parcialmente procesada hacia fragmentos de 14 y 16kDa de masa molecular, investigamos si un fragmento de PRL de 16 kDa (PRL-16K) puede actuar localmente para modificar la conducta de ansiedad en respuesta al estrés. La administración de PRL-16K en una región amplia del tálamo y del hipotálamo aumentó la respuesta de ansiedad valorada a través de la prueba conductual de la Plataforma Elevada. La PRL-16K, pero no la PRL de rata o el vehículo (amortiguador de fosfatos, pH 7.4), disminuyó significativamente el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y también aumentó, si bien no significativamente, el tiempo de permanencia en los brazos cerrados. En conjunto los resultados obtenidos apoyan la noción que existe un

efecto estimulador del estrés sobre la producción hipotalámica de PRL y con ello, la posible acción local de esta hormona en la modulación de la respuesta al estrés. Además, se sugiere la posibilidad de que fragmentos moleculares de la PRL tengan efectos estimuladores de la conducta de ansiedad. En su conjunto, este estudio apoya la acción central de la PRL y sus variantes moleculares en la fisiología del estrés.

1. INTRODUCCIÓN

La prolactina (PRL) pertenece a una familia hormonal derivada de un gen común donde su producto proteínico es sujeto a modificaciones postraduccionales, que incluyen la glicosilación, la fosforilación y la proteólisis entre otras (Sinha, 1995). Estas proteínas son producidas principalmente en la hipófisis anterior, pero también en tejidos extrahipofisarios como el inmune y el nervioso, así como en órganos periféricos, como la glándula mamaria y la placenta (Ben Jonathan et al., 1996). Aunado a sus diferentes sitios de producción y a su diversidad estructural, las PRLs poseen una multiplicidad de funciones que incluyen acciones sobre la reproducción, la osmoregulación y la regulación de la respuesta inmune entre otras (Bole-Feysot et al., 1998).

Desde hace tiempo se sabe que el sistema nervioso central (SNC) es un sitio productor y blanco de las PRLs. El RNA mensajero (RNAm) de PRL se expresa en el SNC, principalmente en el hipotálamo, donde se ha detectado a la PRL y también a algunas de sus variantes moleculares, a saber fragmentos de 16 y 14kDa (Ben Jonathan et al., 1996). Estas proteínas actúan en el SNC para regular conductas reproductivas (sexual y maternal), inhibir la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), alterar la secreción de oxitocina (OXT) y vasopresina (VP), estimular la ingesta de agua y de alimentos y modular la respuesta al estrés (Grattan, 2002).

Es bien sabido que una amplia variedad de estímulos estresores estimulan la liberación adenohipofisaria de PRL a la circulación (Nicoll et al., 1960, Neill et al., 1970), y recientemente se demostró que esta hormona puede actuar sobre el SNC modulando la conducta de ansiedad y la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en respuesta al estrés (Torner et al., 2001). Sin embargo, aún no es claro si el efecto de la PRL sobre las respuestas al estrés obedecen a la acción de PRL sistémica internalizada al SNC vía sus receptores presentes en los plexos coroideos, o si también participa la PRL de origen cerebral. Tampoco es claro si en la regulación del estrés participan isoformas moleculares de esta hormona.

En el presente estudio se revisan aspectos generales de la biología de la PRL y de sus funciones en el SNC, particularmente la relación funcional de la PRL

con el estrés. La sección experimental aborda las posibilidades de que el estrés regule la expresión de la PRL en núcleos hipotalámicos relevantes para la regulación del estrés y que el fragmento de 16kDa de la hormona (PRL-16K) regule la conducta de ansiedad en respuesta al estrés.

2. Prolactina

a. Funciones

La PRL es una hormona descrita originalmente por sus efectos sobre la síntesis y secreción de la leche durante la lactancia. Ahora se sabe que esta hormona ejerce una amplia gama de acciones biológicas que incluyen no sólo efectos dentro de la reproducción, sino también fuera de ella, como la osmoregulación, el crecimiento, la función inmune y la angiogénesis (Ben Jonathan et al.1996, Corbacho et al., 2002). La heterogeneidad funcional de la PRL parece estar dada por características como el polimorfismo estructural de la hormona, su amplia distribución y producción en diversos tejidos, así como la presencia y diversidad de sus receptores en diferentes órganos blanco.

Las primeras descripciones biológicas de la PRL fueron realizadas en eventos asociados a la reproducción, principalmente durante la gestación y la lactancia. Al respecto se sabe que la PRL estimula la proliferación, la diferenciación y la actividad secretora del epitelio mamario. Entre sus efectos lactogénicos se incluyen la estimulación de la síntesis y actividad de proteínas de la maquinaria biosintética responsables de la producción de componentes específicos de la leche tales como son la lactosa, lípidos de cadena corta e intermedia, y proteínas como la lactoalbúmina y la β -caseína. La PRL es considerada esencial para promover la iniciación y mantenimiento de la lactancia después del parto (Ben Jonathan et al.1996, Freeman, 2000).

Otra de las acciones reproductivas de la PRL es su efecto estimulador del mantenimiento del cuerpo luteo y la consecuente producción de progesterona al inicio del embarazo (Freeman, 2000). Sin embargo también se han descrito acciones luteolíticas de PRL vía la inhibición de la síntesis de estrógenos por las células de la granulosa (Freeman, 2000). No es claro cual es la relevancia

biológica de las acciones luteolíticas de la PRL, si bien se ha propuesto que estos efectos constituyen un mecanismo involucrado en la regresión de los cuerpos luteos no funcionales (Freeman, 2000).

Otro de los efectos reconocidos de la PRL en el sistema reproductor es el de inhibir la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). Esta acción que ejerce directamente sobre las neuronas GnRHérgicas (Milenkovic et al.,1994) permite explicar la inhibición de la ovulación que tiene lugar durante la lactancia (Ben Jonathan et al.1996, Freeman, 2000).

La PRL también posee efectos regulatorios de la reproducción en el macho. Por ejemplo, se ha observado que participa en la diferenciación de la próstata y de la vesícula seminal (Bole-Feysot et al.,1998) y puede actuar sobre las células de Leydig incrementando los receptores a la hormona luteinizante (LH) y disminuyendo la actividad de la enzima aromatasa con lo cual incrementa la producción de andrógenos (Bole-Feysot et al., 1998).

La PRL también regula diversas conductas reproductivas. Es claro que esta hormona estimula la expresión de la conducta maternal, dado que animales knock out (heterocigotos) para el receptor de PRL (Lucas et al.,1998) o tratados con un antagonista de dicho receptor (Bridges et al.,2001) muestran una disminución en el cuidado de sus crías, mientras que el tratamiento con PRL puede inducir la conducta materna en hembras vírgenes (Bridges et al., 1990).

Asimismo diversos estudios han descrito efectos de la hormona sobre la conducta sexual. Hembras tratadas con bromocriptina, agonista dopaminérgico que inhibe la secreción de PRL, presentan una disminución en la frecuencia de lordosis (Dudley et al., 1982, Witcher et al., 1985), mientras que en ratas macho el tratamiento suprime la conducta de copulación (Doherty et al., 1985).

Por otra parte, la PRL participa en el aumento en la conducta de ingesta de agua y de alimento que tiene lugar durante la lactancia (Noel et al., 1993). Se ha observado que la conducta de ingesta de agua y de alimento se incrementa en diversos estados hiperprolactinérmicos (Moore et al., 1987). Noel y colaboradores describieron que la administración intra-cerebro-ventricular (icv) de PRL producía un aumento en la ingesta de alimento (Noel et al., 1993), posteriormente Boutin y

colaboradores demostraron que las infusiones directas de la hormona sobre el hipotálamo ventromedial y el área preóptica promovían este efecto (Foreman et al., 1990). Al respecto, el núcleo más sensible para el efecto de hiperfagia inducido por PRL es el NPV, dado que la administración local de la hormona en dicho núcleo, tuvo un mayor efecto en comparación con otros núcleos hipotalámicos (Sauvé et al., 2000).

Finalmente se ha observado que durante las etapas finales de la gestación y en la lactancia, la conducta de ansiedad en respuesta al estrés se ve atenuada (Hill et al., 2003), y que la hiperprolactinemia causa una disminución en la activación del eje hipotálamo- hipofisario adrenal (HPA) en respuesta al estrés (Carter and Lightman, 1987); además el bloqueo de la expresión del receptor de PRL dentro del SNC aumenta la conducta de ansiedad en la rata y desinhibe la respuesta del eje HPA al estrés (Torner et al., 2002).

La importancia de las acciones reproductivas de la PRL fueron reforzadas a través de la investigación del fenotipo de los ratones con delección genética del gen de esta hormona o de su receptor (Freeman, 2000). En ambos casos, los animales homocigóticos son estériles, probablemente debido a que tanto el alelo paterno y el alelo materno se encuentran mutados y no hay forma de reemplazar la función. Además los heterocigóticos muestran claras deficiencias en el desarrollo de la glándula mamaria que imposibilita la generación y mantenimiento de la lactancia (Goffin et al., 2002). El fenotipo de estos ratones concerniente a acciones no reproductivas de la hormona fue menos claro, posiblemente relacionado a mecanismos redundantes en sistemas controlados por múltiples factores regulatorios.

Entre los efectos atribuidos a PRL fuera de la reproducción se incluyen aquellos relacionados con la homeostasis de los organismos. Por ejemplo, la PRL tiene efectos osmoregulatorios en diversos grupos de vertebrados que influyen sobre la concentración iónica y el volumen sanguíneo (Nicoll, 1980). Además, la PRL participa como mediador de la red inmuno-neuroendócrina, promoviendo respuestas inmunes humorales y celulares tanto en estados fisiológicos como patológicos (Yu-Lee 2002). De hecho se ha propuesto que la PRL puede contribuir

a la progresión de las enfermedades autoinmunes (McMurray, 2001), y ser uno de los factores que determina la predominancia de algunos de estos padecimientos en las hembras (Whitacre 2001). Las acciones de la PRL sobre el sistema inmune se apoyan en la demostración de que sus receptores están presentes en los diversos tipos de células inmunocompetentes (Shiu et al., 1983, Yu-Lee et al., 1998, Ben Jonathan et al.1996), y de que diversos leucocitos expresan y secretan PRL (Gagnerault et al., 1993, Ben Jonathan et al.1996, Dorshkind et al., 2002). Al respecto, es interesante que existen similitudes estructurales y funcionales entre la PRL y las citocinas hematopoyéticas así como entre sus receptores (Goffin et al., 2002).

Sin embargo la diversidad funcional de la PRL parece ser aún mayor, debido a que la PRL puede funcionar como molécula madre precursora de péptidos con actividades biológicas nuevas (Macotela et al., 2002). Por ejemplo el fragmento molecular de 16 kDa de la PRL (PRL-16K) si bien es un agonista débil de la hormona en acciones sobre el epitelio mamario y los linfocitos (Clapp et al., 1988), puede ejercer efectos nuevos y en ocasiones antagónicos a los de la PRL. La PRL-16K, a diferencia de la PRL, inhibe la formación de nuevos vasos capilares sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis. Este efecto lo ejerce a través de acciones directas sobre las células endoteliales que conforman vasos capilares, y que incluyen la inhibición de su proliferación y la estimulación de su apoptosis (Clapp et al., 1993, Martini et al., 2000). Además, la PRL-16K tiene efectos pro-inflamatorios en tanto que estimula la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico en fibroblastos de pulmón (Corbacho et al., 2000), mientras que la PRL la inhibe (Corbacho et al., 2003). Más recientemente se observó que la PRL-16K puede inhibir la vasorelajación inducida por bradicidina y acetilcolina y que por lo tanto puede actuar como un agente vasoconstrictor (González et al., 2004). El hecho de que la PRL-16K, pero no la PRL, posea estas acciones sobre el endotelio vascular sugiere que estas acciones involucran un receptor distinto al receptor clásico de la PRL. En apoyo a esta posibilidad, hace tiempo se describió que las células endoteliales poseen sitios de unión saturables, de alta afinidad, específicos para la PRL-16K, que no interaccionan con la PRL, y que podrían

representar los receptores capaces de mediar las acciones propias de este fragmento hormonal (Clapp et al., 1992).

La validación *in vivo* de los efectos vasculares de la PRL-16K no se ha visto beneficiada por el uso de los modelos genéticamente modificados existentes para PRL. Dado que las acciones de estos fragmentos ocurren a través de receptores distintos de los de la PRL, no sería esperable la presencia de un fenotipo vascular en el ratón con delección genética del receptor de PRL. Por otra parte, la eliminación del gen de la PRL se hizo a través de interrumpir el gen a nivel del aminoácido 117, lo cual deja presente un fragmento amino-terminal de 11 kDa que podría ser activo en angiogénesis (Gao and Horseman, 1999). En apoyo a las acciones vasculares *in vivo* de los fragmentos de la PRL, la inhibición de la expresión del gen de PRL en la retina mediante la administración intravitreal de RNA de interferencia, produjo un aumento importante de la angiogénesis y de la vasodilatación local (Aranda et al., 2005).

b. Estructura

La PRL se encuentra codificada por un único gen. En el humano el gen se localiza en el cromosoma 6 y cuenta con 5 exones y 4 intrones. En su forma nativa la PRL tiene una masa molecular de 23 kDa y consta de 199 residuos de aminoácidos dispuestos en cuatro α -hélices antiparalelas. Se han descrito diferentes variantes de PRL que son principalmente producto de modificaciones postraduccionales (proteólisis, desamidación, glicosilación, fosforilación, sulfatación, dimerización o polimerización) (Sinha 1995).

Una de las variantes mejor conocidas es la PRL cortada presente en la rata y en el humano, que puede generarse mediante proteólisis enzimática entre la tirosina 145 y la leucina 146. La reducción del puente disulfuro intermedio de la PRL cortada genera dos fragmentos, uno de 16 kDa correspondiente al extremo N-terminal (la ya mencionada PRL-16K) y otro de 7 kDa correspondiente al C-terminal (Clapp et al., 1997, Sinha 1995). Como ya se señaló la relevancia de este procesamiento es que la PRL-16K posee efectos nuevos en funciones como la angiogénesis y la vasoconstricción, y que estos efectos son mediados por

receptores distintos a los de la PRL (Corbacho et al 2002). La proteasa responsable del procesamiento de la PRL a PRL-16K ha sido identificada como la Catepsina - D (Baldocchi et al., 1993), una enzima lisosomal presente en todas las células, si bien recientemente se ha propuesto que metaloproteasas también pueden llevar a cabo este procesamiento (Macotela et al., 2005).

Se han descrito otras variantes como resultado del procesamiento proteolítico de la PRL. Por ejemplo, la calicreina genera una PRL amino-terminal de 22kDa que es abundante en los lactotopos de la glándula pituitaria, pero su relevancia funcional aún se desconoce (Powers and Átala, 1990)

c. Receptor y vías de señalización

Se han identificado al menos tres isoformas del receptor de PRL. Estas variantes moleculares son resultado del procesamiento alternativo del RNA mensajero (Boutin et al., 1988). La región extracitoplasmática de unión a la PRL es idéntica entre las tres isoformas, pero difieren en la extensión del dominio citoplasmático, que las define como receptor corto (291 aminoácidos, 42kDa), intermedio (393 aminoácidos, 65kDa) y largo (591 aminoácidos, 80kDa) (Kelly et al., 1991). Por mucho tiempo se consideró que la forma larga del receptor de PRL era la predominantemente activa tanto para acciones proliferativas como para acciones promotoras de la diferenciación celular y que la forma corta era inactiva (Nagano et al., 1994, Devost et al., 1999). La forma corta del receptor ha sido ampliamente descrita en hepatocitos, pero también en el cerebro y la glándula mamaria, donde se ha propuesto que puede mediar la internalización de la PRL por el epitelio mamario y su transporte a la leche, así como el transporte de la hormona hacia el líquido cefalorraquídeo (Jabbour et al., 1997, Horseman., 2002). Con respecto a la forma intermedia, esta se ha reportado en células del sistema inmune y de carcinoma mamario y se ha asociado a acciones proliferativas de la hormona (Kline et al., 1999), si bien puede señalizar a la par de la forma larga en sistemas *in vitro* (Campbell et al., 1994).

Las tres isoformas del receptor son activadas por PRL, por hormona de crecimiento (solamente de la especie humana), y por el lactógeno placentario

(Sinha, 1995). La afinidad de unión de las isoformas de la PRL suele ser menor, por ejemplo, la PRL en su forma glicosilada (G-PRL) presenta una menor afinidad de unión que la forma no glicosilada (NG-PRL), y la capacidad de unión de la PRL-16K es mucho menor (5-6%) que la de la PRL (Clapp et al., 1992).

Se ha descrito la presencia del RNAm de las isoformas corta y larga del receptor en una gran variedad de tipos celulares. Se les ha detectado en el sistema nervioso central y en diversos órganos periféricos como el corazón, los pulmones, el timo, el bazo, el hígado, el riñón, las glándulas adrenales y en tejidos reproductivos como el útero, los ovarios, la próstata, la vesícula seminal, y la glándula mamaria entre otros. Su función es aún poco conocida en muchos de los tejidos, además en algunos de ellos el nivel de expresión es muy bajo y se desconoce si este nivel de expresión es funcional. Por otra parte, también hay evidencias de que la síntesis del receptor puede regularse. El nivel de expresión de la forma larga del receptor en núcleos hipotalámicos, así como en corteza y puente (Pi et al., 2002), varía a lo largo del ciclo estral, durante la gestación y la lactancia (Pi et al., 1999) y en los plexos coroides bajo estados de estrés (Fujikawa et al., 1995). También ha sido identificada la expresión del receptor en células inmunocompetentes incluidos los linfocitos T y B, las células asesinas naturales (NK) los monocitos y los macrófagos (Bellussi et al., 1987). Recientemente se reportó que citocinas proinflamatorias como la interleucina 1beta, el interferon gamma y el factor de necrosis tumoral alfa inducen la expresión del receptor de PRL en fibroblastos de pulmón (Corbacho et al., 2003), un tipo celular que es importante en la mediación de las reacciones inflamatorias de las vías respiratorias.

La activación del receptor ocurre a través de un proceso de dimerización, donde una molécula de PRL se une a dos moléculas de receptor, y por lo tanto involucra dos regiones de la hormona capaces de interactuar con una molécula de receptor. El receptor de PRL carece de actividad enzimática y transduce su señal mediante su asociación con diferentes cinasas, que a su vez activan a las moléculas efectoras. La vía de señalización más importante activada por el receptor de PRL es la vía JAK/STAT (“Janus kinases”/”signal transducers

activators of transcription”) (Bole-Feysot et al., 1998). La dimerización del receptor de PRL induce la transfosforilación / activación de las cinasas de tirosina JAK-2, que se encuentran unidas al receptor. Las cinasas JAK-2 así activadas fosforilan residuos de tirosina del receptor, lo que origina sitios de anclaje para las proteínas STAT, las cuales al unirse al receptor son fosforiladas por las JAK-2. Una vez fosforiladas las STAT se disocian del receptor para formar dímeros que son translocados al núcleo, se unen a secuencias consenso en el DNA denominadas GAS (secuencia de activación de interferón gamma) y activan la transcripción génica. (Boyle Feysot et al., 1998).

d. Sitios de producción

La PRL es producida principalmente por células (conocidas como lactotropos) de la hipófisis anterior. Sin embargo su síntesis se ha podido confirmar en múltiples tejidos extrahipofisarios, que incluyen células del sistema nervioso, la decidua uterina, el epitelio de las glándulas mamarias, lacrimales y sudoríparas, diversas células del sistema inmune, la próstata y células endoteliales vasculares (Ben Jonathan et al.1996, Corbacho et al 2002). En estos tejidos se ha evaluado la expresión del RNAm y la producción de la proteína en función de su masa molecular, inmunoreactividad y bioactividad en ensayos específicos. Además, la presencia de la PRL se ha detectado en diversos fluidos corporales que incluyen el suero, el líquido cefalorraquídeo, el líquido amniótico, la leche, el líquido folicular, etc (Ben Jonathan et al., 1996).

La regulación de la síntesis y secreción de la PRL involucra distintos mecanismos que actúan tanto al nivel de la transcripción y traducción, así como también sobre su proceso de secreción. La mayor parte del conocimiento acerca de los mecanismos de regulación de la producción y liberación de esta hormona, derivan de estudios fisiológicos y farmacológicos, que han evaluado los efectos de distintos agentes sobre la función adenohipofisaria *in vivo* o bien sobre los lactotropos en cultivo. Estos estudios han permitido identificar factores ambientales, hormonales hipotalámicos, ováricos y derivados de la glándula suprarrenal, así como factores parácrinos y autócrinos que actúan de manera

orquestada para controlar la producción y secreción adenohipofisiaria de la hormona (Bole Feysot et al., 1998). Sin embargo poco se sabe acerca de los mecanismos de regulación de la producción de la *PRL* en las fuentes de producción extrahipofisiarias.

3. PRL Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

a. Funciones

La PRL ejerce diversas acciones en el SNC, que incluyen: la regulación de la secreción de neurotransmisores y neuropéptidos, la estimulación de la proliferación de astrocitos y neuronas, la regulación del ciclo sueño y vigilia, y la regulación de la expresión de conductas como la maternal, sexual, de ingesta y de ansiedad (Ben-Jonathan, 1996).

Un ejemplo del efecto de la PRL sobre la secreción de neurotransmisores, es su acción sobre las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) en el núcleo arcuato del hipotálamo. La PRL estimula la secreción de dopamina por estas neuronas dando lugar a un mecanismo de retroalimentación negativa sobre su propia secreción. Este mecanismo se apoya también en el efecto inhibitorio de la PRL sobre la secreción del péptido intestinal vasoactivo (VIP), que al producirse por el hipotálamo y ser secretado al sistema portal hipotálamo-neurohipofisiario funciona como secretagogo de la PRL hipofisiaria (Ben-Jonathan, 1996). También se han descrito efectos inhibitorios de la PRL sobre la secreción de la GnRH por las neuronas que la producen en el hipotálamo (Milenkovic et al., 1994), y se piensa que este es el mecanismo que media la falta de fertilidad durante la lactancia. La PRL también estimula la liberación de las neurohormonas oxitocina y vasopresina por explantes hipotálamo-neurohipofisiarios (Mejía et al., 2003). Consistentemente con todas estas acciones, se ha descrito la presencia del receptor de PRL en las neuronas TIDA (Arbogast et al., 1997, Lerant A et al., 1998), en el núcleo arcuato (NARC) del hipotálamo y en los núcleos paraventricular y supraóptico (NSO) del hipotálamo donde también se encuentran neuronas que producen VIP el cual ha sido descrito como otro neurotransmisor secretagogo de la PRL (Ben-Jonathan et al., 1996, Roky et al., 1996, Mejia et

al.,1997). Asimismo se ha descrito la presencia del receptor corto principalmente en las neuronas GnRHérgicas donde se ha investigado el efecto en la expresión y liberación de GnRH en respuesta a PRL (Ben-Jonathan et al., 1996)

El efecto que la PRL ejerce sobre la oxitocina se ha asociado al aumento de esta hormona durante la lactancia (Grattan, 2001) pero las implicaciones funcionales del efecto de la PRL sobre la secreción de vasopresina son menos claras. Al respecto, recientemente se ha tenido evidencia de que la PRL-16K tiene propiedades vasoconstrictoras, a través de inhibir la producción de óxido nítrico endotelial, un importante relajador del músculo liso vascular (González et al 2004). Dado que la PRL, pero también la PRL-16K, estimulan la secreción de vasopresina por el sistema hipotálamo-neurohipofisario, este sería un mecanismo adicional para promover la vasoconstricción sistémica en respuesta a prolactinas. Alternativamente, la acción sobre vasopresina, dadas sus propiedades antidiuréticas, podría representar un mecanismo indirecto capaz de favorecer los efectos osmorregulatorios de la PRL sobre diversos fluidos corporales. Todas estas posibilidades son altamente especulativas y deberán ser abordadas experimentalmente.

Diversos estudios han propuesto la posible participación de la PRL en la regulación del ciclo sueño-vigilia. La administración icv de PRL promueve la fase de movimientos oculares rápidos del sueño (MOR), mientras que la inmunoneutralización de las PRLs centrales con anticuerpos anti-PRL bloquea dicha fase del sueño (Ben-Jonathan, 1996). Del mismo modo, estudios mas recientes han mostrado que la hipofisectomía suprime la fase MOR del sueño (Bodosi et al., 2000).

Como describimos anteriormente, parece claro que la PRL estimula en forma dosis dependiente la expresión de la conducta maternal en hembras vírgenes (Bridges et al., 1990). Más aún, se ha demostrado que la conducta materna es regulada en el área preóptica media (APOM), donde consistentemente se ha descrito un incremento en la expresión del receptor de PRL durante la gestación y la lactancia (Pi et al., 1999, Bakowska et al., 1997). Asimismo la

inactivación genética del receptor de PRL resulta en animales carentes de la conducta de cuidado parental (Lucas et al., 1998).

Los efectos de la PRL capaces de promover la ingestión de agua y de alimento parecen integrarse en los núcleos paraventricular y ventromedial (NVM) del hipotálamo. En estos núcleos se ha detectado el receptor de PRL y su aumento en estados de hiperprolactinemia (Moore et al., 1989, Sauve et al., 2000). Otro de los efectos conductuales de la PRL que podría integrarse en el NPV es la modulación de la ansiedad. Como más adelante se describe, estudios de Torner y colaboradores (Torner et al., 2001, 2002, 2004) mostraron que la administración icv de PRL reduce la ansiedad y la secreción de ACTH en respuesta al estrés y que estos efectos se eliminan mediante el bloqueo de la expresión del receptor de PRL en el SNC. El NPV participa en la integración de la respuesta de ansiedad al estrés (Millan, 2003) y constituye la vía final común para la secreción de la hormona liberadora de las corticotropinas (CRH) responsable de promover la secreción de ACTH por la hipófisis (Aguilera, 1994). Además, el NPV expresa a la PRL y a un fragmento de 14 kDa de la hormona (Clapp et al., 1994).

Finalmente, se ha demostrado que la PRL puede estimular la proliferación de astrocitos en cultivo (De Vito et al., 1992) y más recientemente se ha despertado un gran interés por la PRL en el SNC ya que se demostró que esta hormona podría promover la neurogénesis en la zona subventricular y la aportación de nuevas neuronas al bulbo olfatorio durante la gestación (Shingo et al., 2003). Los receptores a PRL se detectaron en los cuerpos subventriculares y la neurogénesis se encontró disminuida en dicha área en los ratones heterocigóticos para el receptor de PRL (Shingo et al., 2003).

También se ha descrito la presencia de RNAm del receptor de PRL en otras áreas del SNC como son el área periventricular (en la región preóptica), el núcleo del lecho del stria terminalis, la amígdala medial y el tálamo, la zona incerta, la habénula lateral, el órgano subfornical, la sustancia gris periacueductal, la sustancia nigra, el cuerpo estriado, la corteza (cingulada, motora y sensorial), el bulbo olfatorio y el área postrema (Pi et al., 1998, Bakowska et al., 1997). Esta distribución amplia del receptor de PRL probablemente refleja la complejidad de

las acciones de esta hormona, si bien el nivel de expresión es baja en muchas de estas regiones y podría no tener una relevancia funcional significativa.

b. PRL neural

La PRL se encuentra presente en el líquido cefalorraquídeo, y su concentración se correlaciona con sus niveles en la circulación (Mangurian et al., 1992, Fujikawa et al., 1995). En los plexos coroideos se concentra la mayor expresión del RNAm del receptor de PRL, y se ha propuesto que la función primordial de esta localización es la de permitir la internalización de la PRL sistémica al líquido cefalorraquídeo (Roky et al., 1996, Grattan et al., 2001). Al respecto, se ha mostrado que PRL marcada radioactivamente e inyectada a la circulación sistémica es incorporada por los plexos coroideos e internalizada al líquido cefalorraquídeo (Walsh et al., 1987). Además, se ha observado que agentes capaces de estimular la secreción adenohipofisaria de PRL a la circulación sistémica, también estimulan la expresión del receptor de PRL en los cuerpos coroideos (Pi et al., 1999, Fujikawa et al., 1995, Grattan et al., 2001).

Si bien es claro que los receptores de PRL en los plexos coroideos pueden permitir el ingreso de la PRL sistémica al SNC y con ello sus acciones centrales, también es evidente que el SNC, como otros sistemas extrahipofisarios produce PRL. Las evidencias iniciales describieron la presencia de PRL inmunorreactiva (PRL-IR) en los somas de neuronas en diversos núcleos hipotalámicos: NARC, NVM, premamilar, NSO y NPV, y en sus proyecciones a la amígdala y el locus cerúleos. El origen de esta inmunoreactividad no parecía ser hipofisaria, ya que la presencia de este antígeno no variaba entre hembras y machos, además no dependía de los niveles circulantes de la PRL y no se modificaba después de la hipofisectomía (Tobeau et al., 1979, Barbanel et al., 1986, Emanuele et al., 1987, Harlan et al., 1989). Sin embargo posteriormente se mostraron evidencias de que también la PRL inmunorreactiva independiente de la hipófisis está presente en el tálamo, el hipocampo, la corteza (parietal) y el núcleo caudado, además se describieron proyecciones prolactinérgicas en el órgano *vasculosum* de la *lamina terminalis*, en el órgano subfornical, en la médula oblongata y espinal, en el bulbo

olfatorio, en la corteza del cíngulo, en la región periventricular y en la sustancia gris periacueductal (Siaud et al., 1989).

Las evidencias basadas en inmunohistoquímica fueron cuestionadas por el hallazgo de que anticuerpos dirigidos contra porciones de la propiomelanocorticotropina (POMC), presentaban una reacción cruzada con PRL (Harlan et al., 1989). Si bien la localización de ambos antígenos (POMC y PRL) no era del todo similar, la presencia de PRL neural tuvo que ser reforzada por otros abordajes experimentales. Por ejemplo, De Vito y colaboradores mostraron mediante Western blots que extractos hipotalámicos contienen una PRL inmunoreactiva de 23 kDa y de 16 kDa que son liberadas por explantes hipotalámicos mediante mecanismos dependientes de calcio (De Vito, et al., 1987). Este último resultado que apoya la síntesis independiente de la PRL central respecto de la hipofisiaria.

No obstante las evidencias más contundentes de la presencia y síntesis de PRL en el SNC, se obtuvieron por medio de la determinación de la expresión local de su RNAm, mediante northern blot (Schachter et al., 1984). Además, por medio de la técnica de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se describió la expresión del RNAm de PRL en hipotálamo completo y en el NPV y NSO, en el cerebelo, el caudado, el tallo cerebral, la amígdala, el tálamo, la corteza cerebral y el hipocampo (Emanuele et al., 1992, Wilson et al., 1992, Torner et al., 1999).

En la actualidad se acepta que la producción de PRL se concentra en el hipotálamo, particularmente en los núcleos hipotalámicos NVM, NPV, NSO y NARC, más aún, las proyecciones neuronales que contienen PRL tienen una distribución más amplia, que incluye al tálamo, la amígdala, el hipocampo y el caudado (Freeman et al., 2000)

También es claro que PRL central es estructuralmente heterogénea. Se han detectado isoformas de PRL de 23, 16, 14 y 12 kDa en extractos de hipotálamo (De Vito, 1988) y de neurohipófisis (Clapp et al 1994). Es interesante la observación de que en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario parece ser más

abundante la PRL de 14 kDa que la PRL íntegra (23 kDa), a diferencia de lo que ocurre en la adenohipófisis (Clapp et al 1994). En el sistema hipotálamo-neurohipofisiario las diferentes isoformas de PRL ingresan a la vía de secreción neuronal de neuronas vasopresinérgicas, como lo demuestra su presencia en gránulos de secreción (Mejía et al 1997) y de acuerdo a estudios *in vitro* dicha secreción es dependiente de calcio (Torner et al 1995).

La relevancia funcional de la PRL hipotalámica se apoyó recientemente con el trabajo de Torner y colaboradores (Torner et al., 2004), que mostró que la expresión de PRL en el hipotálamo puede ser incrementada por estímulos fisiológicos como la succión y la exposición al estrés. Interesantemente, los estrógenos también parecen regular la expresión de PRL en el NPV y en el NSO dado que ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol muestran un incremento significativo en la expresión del RNAm de PRL en ambos núcleos (Torner et al., 1999). Más aún en ese estudio se observó que los estrógenos pueden inhibir la proteólisis de la PRL hacia la PRL-14K en el sistema hipotálamo -neurohipofisiario.

4. ESTRÉS

a. Definición

El estrés es un concepto amplio y complejo, que ha sido sujeto a diversas definiciones, y se ha empleado de diversas maneras, tanto en función de los componentes que lo forman, el estímulo que lo provoca, así como la respuestas que ocasiona.

En 1930 Hans Selye introdujo el concepto de estrés como la respuesta inespecífica que resulta de la exposición a cualquier efector de estrés o agente nocivo, sea de carácter interno o externo o de naturaleza física o química, manifestándose en un síndrome al cual definió como síndrome de adaptación general, el cual consiste de tres etapas:

- Fase de alarma: En donde el organismo se percata del agente nocivo, activa su sistema nervioso simpático y la corteza y médula de las glándulas suprarrenales.
- Fase de resistencia o adaptación: En la que el organismo hace frente al estresor. Para ello utiliza los recursos energéticos disponibles para sobrevivir la emergencia.
- Fase de desgaste : Se caracteriza por imposibilidad del organismo para hacer frente al agente estresor, y desarrolla múltiples patologías o incluso puede llegar a la muerte.

Selye propuso al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) como el efector clave de la respuesta al estrés. Además propuso que las distintas formas de estrés inducen dos tipos de respuesta, una general que implica la liberación de ACTH y corticosterona, y una individual mediada por factores tales como predisposición determinada genéticamente. (Selye, 1950)

Selye había denotado una marcada homogeneidad en la respuesta ante diversos estresores, expresándola principalmente por la activación del eje HPA como efector principal de la respuesta al estrés, sin embargo en el año 2001 Pakak y Palkovits demostraron que contrario a Selye había una heterogeneidad en la respuesta a diversos estresores, aunque si bien la respuesta final es la activación del HPA y del eje simpato- adrenal, manifestaron la participación de

diferentes núcleos centrales ante varios estresores, además introdujeron así la definición de estrés cómo: “Un estado alterado en el equilibrio fisiológico durante el cual se activan mecanismos específicos que trabajan conjuntamente como respuestas compensatorias para restaurar la homeostasis” (Pacak y Palkovits 2001). No obstante hasta el año 2002 Tsigos y Chrousos brindaron un concepto multidimensional sobre el estrés, en el cual introducen a la respuesta conductual como parte de los efectos del estímulo estresor. Ellos definen al estrés como: “Un complejo repertorio de respuestas fisiológicas, tales como la activación del eje HPA y del eje simpático-adrenal, además de respuestas conductuales como la ansiedad, el miedo, la ira, etc., que se activan o se manifiestan para restaurar la homeostasis amenazada” (Tsigos et al, 2002).

Los estresores se definen como todo aquel estímulo que causa estrés o que interrumpe la homeostasis del organismo, sin embargo la clasificación de estos estímulos es muy diversa, por ejemplo, en función de la forma de cómo son percibidos, los estresores se pueden clasificar en internos (hemorragia, hipoglucemia, etc) o externos (capaces de activar receptores sensoriales, visuales, olfatorios, mecánicos, etc). De acuerdo a su duración se refieren como estresores agudos (exposición única y de tiempo limitado) o crónicos (exposición prolongada e intermitente o exposición continua), también se les clasifica en físicos (frío, calor, vibración) y psicológicos (sociales, emocionales) (Pacak et al., 2001).

5. RESPUESTA FISIOLÓGICA AL ESTRÉS

Las experiencias estresantes son comunes en todos los organismos vivos, la percepción de estímulos amenazantes desarrolla un espectro de cambios fisiológicos como respuesta de compensación al estrés (Herman 1997). Sin embargo los organismos abordan distintas estrategias biológicas para hacer frente al estresor, que implican desde respuestas conductuales, neuroendocrinas (activación del eje HPA), respuestas autonómicas y respuestas del sistema inmune.

Moberg en 1985 propuso un modelo descriptivo de las respuestas al estrés (Fig. 1), dividiéndolo en tres fases: el reconocimiento del estresor, la defensa biológica contra el estresor y la consecuencia biológica del estrés.

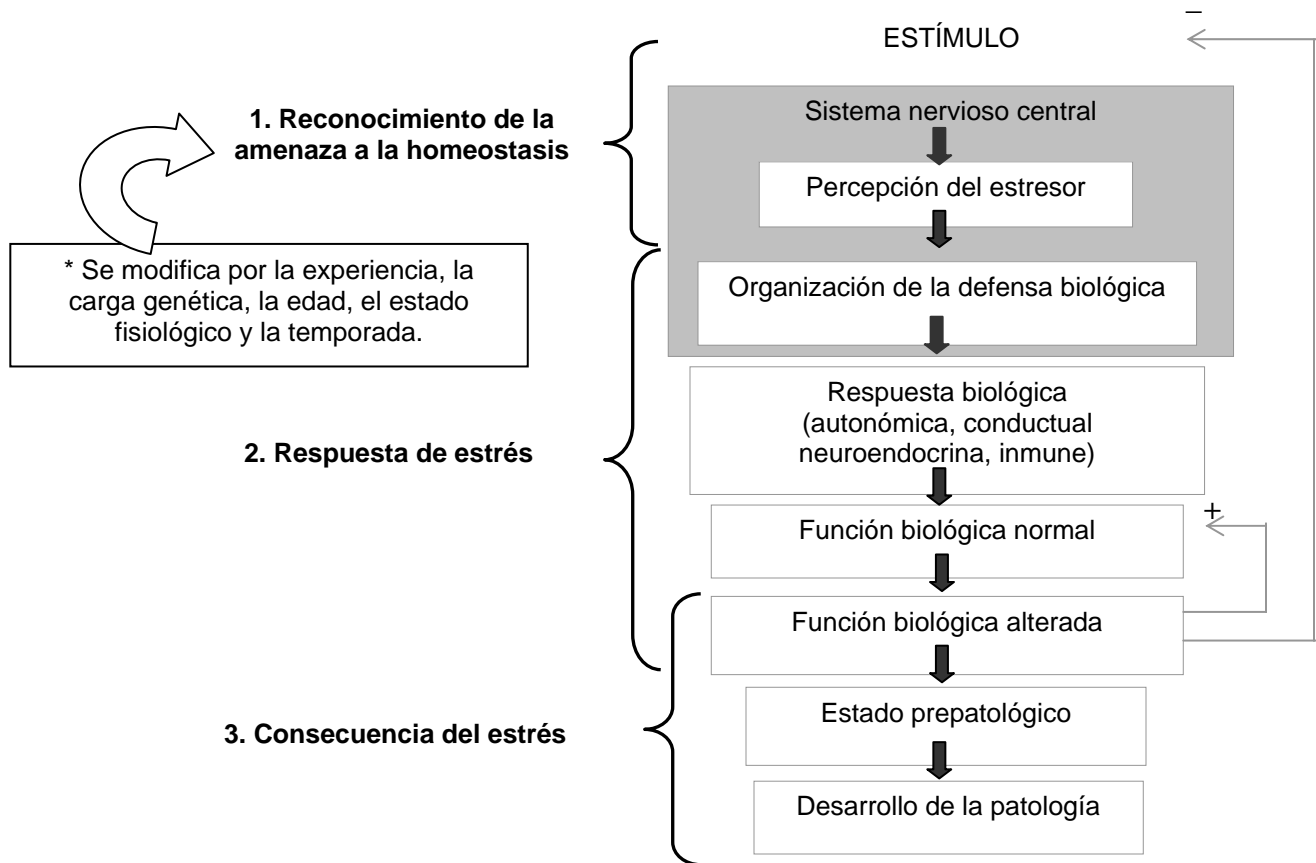


Fig. 1 Modelo de respuesta al estrés modificado de Moberg 1999 (Moberg et al. 2001)

Moberg propone que la respuesta al estrés se encuentra regulada por la influencia que el sistema nervioso central ejerce sobre los sistemas autónomo, neuroendocrino, e inmune y se puede reflejar en la conducta que despliegan algunos organismos. Además, dicha respuesta involucra no solo factores individuales como la experiencia y la carga genética, sino también incluye la acción de moléculas centrales y periféricas, como la acción de hormonas hipofisiarias, tales como, la ACTH, la vasopresina (VP) y la PRL, la noradrenalina

por parte de la división simpática, la adrenalina liberada de la región medular y los glucocorticoides de la región cortical de las suprarrenales (Moberg et al. 2001).

a. Activación del sistema autónomo

El control de las funciones viscerales del organismo, es efectuado básicamente de forma no consciente por el sistema nervioso autónomo, el cual se encuentra compuesto por dos ramas: la simpática y la parasimpática.

En una situación de estrés, se ha descrito que el hipotálamo es capaz de integrar la información procedente de vías sensoriales y viscerales, desencadenando la activación del sistema nervioso simpático. La señal comienza cuando las neuronas preganglionares simpáticas de la médula espinal, reciben la información procedente del hipotálamo a través de vías autónomas descendentes que provienen del NPV o del núcleo del tracto solitario (NTS), de ahí la información es transmitida hasta la cadena ganglionar simpática paravertebral, mediante sinápsis con las neuronas postganglionares, que liberan noradrenalina en los distintos órganos blanco. Además, las neuronas preganglionares simpáticas estimulan a su vez a la médula adrenal para la liberación de adrenalina a la circulación, la cual ejerce sus efectos sobre el corazón y el músculo esquelético.

Walter B. Cannon es considerado uno de los iniciadores en las teorías de estrés. En 1915, propuso la "Reacción de Alarma" para explicar el aumento en la liberación de adrenalina en respuesta a la exposición ante cualquier estresor, también caracterizó la respuesta al estrés como generalizada e inespecífica y la denominó respuesta de huida o lucha (fight or flight response). Demostró que en ella tiene lugar la activación del sistema nervioso simpático en sus divisiones neural y sistémica, vía la liberación de noradrenalina de terminales nerviosas y de adrenalina de la médula suprarrenal.

En la actualidad es bien aceptado que las primeras respuestas ante el estresor consisten tanto en la activación rápida del sistema nervioso simpático-adrenal, con la subsecuente liberación de noradrenalina y adrenalina, y la activación del eje HPA, cuyo producto final son los glucocorticoides, y que se describirá más adelante.

Como resultado de la liberación de adrenalina se puede obtener energía rápidamente. La adrenalina ejerce efectos metabólicos en el hígado donde estimula la glucogenólisis, lo cual conduce a un aumento de glucosa en sangre, que puede ser utilizada en los tejidos que más la demanden. Además, la adrenalina y la noradrenalina aumentan la frecuencia cardíaca y respiratoria, la presión sanguínea, y la generación de sudor. Estos cambios facilitan la rápida circulación de la sangre y con ella el aporte de glucosa y oxígeno tanto a los músculos con funciones motoras, como al cerebro, y reducen la circulación en otras partes del organismo menos relevantes para la respuesta al estrés, como el sistema digestivo. Así en condiciones de amenaza hacia el organismo, los músculos de las extremidades disponen de energía necesaria para realizar algún esfuerzo, así como la irrigación facilita al cerebro algunas funciones como la percepción o la atención que pueden facilitar una reacción rápida y eficaz (Sandi, 2002).

b. Activación del eje HPA

Diversas estructuras y regiones del sistema nervioso central y periférico participan durante la exposición ante un estresor, los principales componentes centrales de respuesta al estrés, se encuentran localizados en su mayoría en el hipotálamo y en el tallo cerebral (Herman et al., 1997, 2003). No obstante el principal núcleo capaz de integrar la respuesta neuroendocrina al estrés es el NPV (Herman et al., 1997). Morfológicamente el NPV se encuentra dividido en dos regiones celulares denominadas, por el tamaño neuronal, parvocelular y magnocelular. En la subdivisión media dorsal parvocelular se encuentran neuronas que sintetizan la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y que representan la vía final común de la activación del eje HPA. También se han descrito neuropéptidos secretados por la división parvocelular del NPV tales como la oxitocina y la VP que regulan la producción CRH (Aguilera et al., 1993, Herman 1995, Wotjak et al., 1996), y pueden, en el caso de la VP secretada por estas neuronas al sistema portal hipotálamo-hipofisiario, estimular la secreción de

corticotropina (también llamada hormona adrenocorticotrópica o ACTH) (Aguilera et al., 1992, 1993).

La CRH es transportada vía proyecciones neuronales a la lamina externa de la eminencia media, donde es secretada al sistema portal hipotálamo-hipofisiario (Merchenthaler et al., 1982), hasta alcanzar la hipófisis anterior, donde la CRH estimula la síntesis y la liberación de la ACTH a la sangre periférica. El principal órgano blanco de la ACTH es la corteza de la glándula adrenal, donde estimula la secreción de glucocorticoides (cortisol en seres humanos o corticosterona en la rata) por parte de las regiones fascicular y reticular. Los glucocorticoides tienen efectos catabólicos importantes que resultan en la conversión de proteína y glucógeno a glucosa (gluconeogénesis) en el músculo. También disminuyen la utilización celular de glucosa en unos tejidos pero no en otros que no los necesitan en ese momento como el sistema digestivo, además aumentan la movilización de ácidos grasos y glicerol del tejido adiposo, incrementando su concentración en sangre lo que favorece su utilización en la síntesis de glucosa. Como resultado de todos estos efectos, los glucocorticoides mantienen la concentración de glucosa en sangre necesaria para contender con situaciones de estrés y privación de alimento, a costa de disminuir la proteína y grasa del cuerpo (Kaplan, 1996).

Además de las influencias intranucleares, el NPV integra aferencias de centros superiores (corteza y sistema límbico) y recibe proyecciones catecolaminérgicas del tallo cerebral, de órganos circunventriculares y de áreas del sistema límbico (núcleo del lecho de la estría terminal, *septum*, hipocampo y amígdala). Las vías catecolaminérgicas excitatorias provenientes del tallo ejercen un efecto activador del eje HPA en el NPV, el cual también integra información que proviene de aferencias medulares y del tallo, y es responsable de respuestas reactivas (Herman et al., 2003)

Finalmente, diversos estudios han mostrado que las respuestas neuroendocrinas y conductuales varían entre diferentes tipos de estresores y que estas diferencias se pueden reflejar en una activación diferencial del NPV. Por ejemplo, usando como marcador de actividad neuronal al gen c-fos, se ha descrito

que estresores como la inmovilización y los choques eléctricos, pero no el estrés por frío o por insulina, activan la subdivisión parvocelular del NPV (Pacak et al., 1995).

6. RESPUESTA CONDUCTUAL DE ANSIEDAD

a. Definición

La respuesta de ansiedad ha sido estudiada bajo diferentes contextos para analizar efectos de sustancias capaces de estimularla o de inhibirla, denominadas como ansiogénicas y ansiolíticas, respectivamente. Generalmente los ensayos conductuales se estudian en roedores y son diseñados de tal forma que logran crear situaciones de conflicto entre la capacidad innata de exploración y el estrés causado por la novedad de la prueba o el espacio por sí mismo. Si bien las definiciones operacionales del estado de ansiedad dependen del experimentador, en términos generales la ansiedad se define en base a la actividad locomotora, la exploración, la piloerección, la defecación, y otros patrones conductuales que presentan los animales durante el ensayo. Por ejemplo, en la plataforma elevada o “plus maze”, descrita por Pellow en 1985 (Pellow, 1985), se han validado muchas sustancias ansiogénicas o ansiolíticas, que coinciden con sus efectos en otras pruebas conductuales de ansiedad como la prueba de campo abierto descrito por Walsh en 1976 (Walsh, 1976) o el ensayo de “holeboard” descrita por Lister en 1990 (Lister, 1990).

En estudios clínicos, la ansiedad ha sido delimitada en base a las pautas que establece el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, de la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-IV), donde han definido a la ansiedad como una sensación de apremio, de intranquilidad o desasosiego psicológico asociado a la anticipación del peligro (DSM-IV referencia). Estas sensaciones se han asociado con manifestaciones fisiológicas como un incremento en la presión arterial, la taquicardia, la hipertermia, y la liberación elevada de glucocorticoides, así como con la expresión de patrones conductuales estereotipados tales como conductas de defensa que incluyen la respuesta de parálisis, evitación, escape, acicalamiento, defecación y pilo-erección.

Dentro de las estructuras centrales que se ha propuesto que regulan la conducta de ansiedad se encuentra el septum y el circuito de Papez (circuito formado por el hipocampo, cuerpos mamilares, tálamo anterior, corteza cingulada y corteza del cíngulo). El núcleo amigdalino juega un papel fundamental en conductas emocionales (Steimer T, 2002). Se ha descrito como un núcleo de asociación y relevo de diversas emociones, además de que esta región recibe diferentes conexiones recíprocas con estructuras corticales, y con el sistema ascendente noradrenérgico que responde a diversos estresores, en general estas estructuras están íntimamente relacionadas con respuestas emocionales, cognitivas, autonómicas y endocrinas (Millan 2003).

7. PRL Y ESTRÉS

Desde hace muchos años se sabe que diversos estresores (choque hiperosmótico, frío, choques eléctricos, restricción por movimiento, quemaduras, etc) inducen la liberación de PRL a la circulación sistémica (Nicoll et al., 1960, Neill et al., 1970). Las implicaciones funcionales del aumento de la PRL circulante en respuesta al estrés aún no se conocen, si bien se han propuesto varias posibilidades. Por ejemplo, dadas las acciones estimuladoras de la prolactina sobre el sistema inmune (McMurray 2001) se propone que la secreción de esta hormona podría contrarrestar las acciones inmunodepresoras de los corticoides liberados en respuesta al estrés (Yu-Lee 2002).

Más recientemente Torner y colaboradores propusieron que la PRL puede modular las respuestas conductuales y neuroendocrinas del estrés y que esta acción la ejerce directamente sobre el SNC. Así, este grupo de investigadores demostró que la administración icv de oligonucleótidos antisentido capaces de bloquear la expresión del receptor de PRL incrementa la potencia de estresores emocionales (“plataforma elevada” o inmovilización) para producir ansiedad y para estimular la secreción de la ACTH a la circulación (Torner et al., 2001). Consistentemente, mostraron que la administración icv de PRL reduce la conducta de ansiedad y los niveles circulantes de ACTH en respuesta a dichos estresores (Torner et al , 2001).

En base a las observaciones anteriores, se sugirió que los altos niveles circulantes de PRL que tienen lugar durante la lactancia podrían contribuir a explicar la reducida reactividad del eje HPA en esta fase del ciclo reproductor (Torner et al 2004). Así, en animales experimentales y en humanos en estados hiperprolactinémicos fisiológicos (gestación y lactancia) diversos estímulos estresantes (inmovilización, nado forzado, plataforma elevada, inyecciones hipertónicas, éter, estrés psico-social, choques eléctricos, ruido, cirugías, etc) producen una menor expresión del RNAm de CRH y concentración de los glucocorticoides circulantes que en individuos con niveles circulantes basales de PRL (Thoman et al., 1970, Lightman et al., 1989, da Costa et al., 1996, Windle et al., 1997, Neumann et al., 1998, 2000, Altemus et al., 2001).

Se desconoce si la PRL capaz de modular las acciones del estrés es de origen sistémico o bien de origen neural. Se ha observado que el estrés incrementa los receptores a PRL en los plexos coroides (Fujikawa et al., 1995) y que estos receptores son capaces de internalizar la PRL sistémica al líquido cefalorraquídeo (Grattan 2001). Además, se ha observado que la concentración de la PRL en el líquido cefalorraquídeo se correlaciona con el aumento de la PRL circulante en respuesta al estrés (Walsh et al., 1987).

Por otra parte, el SNC y en particular el NPV produce y secreta a la PRL y a algunos de sus fragmentos hormonales, de manera que mecanismos locales (parácrinos y autócrinos) podrían contribuir a mediar las acciones de la PRL sobre el estrés. Al respecto es interesante volver a señalar que tanto la PRL como un fragmento de PRL de 14 kDa se producen en el NPV y que la PRL y la PRL-16K estimulan la secreción de VP (Mejía et al., 2003), efecto que podría repercutir sobre la activación del eje HPA. Como también se indicó, la VP puede estimular la secreción de CRH (Sawchenko et al., 1992), pero además, la VP secretada por las proyecciones neuronales parvicelulares del NPV puede actuar sobre sus receptores en la hipófisis anterior estimulando a los corticotropos a sintetizar y liberar ACTH (Herman et al. 1989). Por lo tanto, PRLs tanto sistémicas como locales podrían actuar centralmente para modular la respuesta al estrés.

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En resumen, el SNC, en particular el hipotálamo es sitio blanco de acciones de la PRL y de sus fragmentos moleculares. Entre las acciones centrales descritas de la PRL, recientemente se propuso la modulación de la conducta de ansiedad y la inhibición del eje HPA en respuesta al estrés. En el NPV se integra información aferente que se traduce en la activación del eje HPA, además hacia este y a otros núcleos hipotalámicos proyectan centros superiores (corteza sensorial, y de asociación, sistema límbico y tálamo) relacionados con la regulación de la conducta de ansiedad. Dado que el NPV produce PRL y PRL-14K es posible proponer que el estrés podría promover la producción de PRLs capaces de modular de manera autócrina o parácrina las respuestas al estrés.

9. HIPÓTESIS

El estrés por restricción de movimiento estimula la producción de prolactinas en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), las cuales actúan localmente para regular la conducta de ansiedad

10. OBJETIVOS

Para analizar esta hipótesis llevamos a cabo los siguientes objetivos:

OBJETIVO 1

Determinar si el estrés por inmovilización modifica la expresión de prolactina en el NPV y en otros núcleos hipotalámicos (núcleo supraóptico, núcleo arcuato, núcleo ventromedial)

OBJETIVO 2

Analizar si la PRL y la PRL-16K administradas en el hipotálamo tienen efecto sobre la conducta de ansiedad determinada en la “plataforma elevada en cruz”

11. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Animales

Hembras Wistar vírgenes adultas (210-250grs) en fase de diestro, se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22-24°C) y de luz/oscuridad (12/12) con acceso libre al agua y alimento. La fase del ciclo estral fue seleccionada de acuerdo a estudios previos que reportan que durante la fase de diestro se detecta la menor expresión del RNA mensajero de PRL en el NPV y en el NSO, de manera que presumiblemente podría observarse mejor la respuesta de dicho transcrito al estrés (Torner et al.1999). Las etapas del ciclo estral se monitorearon diariamente mediante citología vaginal. Además, los animales fueron manipulados diariamente durante al menos 4 días antes del experimento intentando mimetizar la maniobra experimental.

La justificación de usar ratas hembras en los experimentos se basa en diversos estudios que muestran un gran dimorfismo sexual, tanto en la distribución como en la concentración de la hormona, además de la gran importancia que tiene en funciones reproductivas en hembras.

b. Inmovilización

Selye fue el primer científico que utilizó la restricción de movimiento o inmovilización (IMO) para estudiar el estrés. El procedimiento original se basa en atar las patas de la rata y envolver al animal estrechamente en una toalla. Hoy en día existen varias modalidades de estrés por IMO pero la más empleada consiste en introducir a los animales en tubos de acrílico, donde quedan sujetas tanto las extremidades como el cuerpo y la presión ejercida es la misma durante todo el tiempo de exposición. El estrés por IMO se considera una combinación de estrés físico y psicológico, dos componentes importantes a este estímulo son la disminución de la temperatura del cuerpo y la molestia /dolor asociada con la incapacidad del movimiento. Las respuestas máximas se aprecian en los primeros 30 minutos de la inmovilización y la magnitud de la respuesta disminuye después de la exposición crónica intermitente, reflejando habituación así como fatiga de los sistemas efectores al estrés (Pacak et al., 1995, 1997, 2001)

En el presente trabajo se utilizó el estrés por inmovilización dado que en estudios previos se observó que este estímulo induce cambios en la expresión de PRL en hipotálamos completos (Torner et al., 2004). Se utilizaron dos grupos experimentales, el grupo control de ratas sin ninguna manipulación que fueron anestesiadas mediante la exposición a una atmósfera saturada de CO₂ y decapitadas; y el grupo experimental de las ratas expuestas a un periodo de 30 minutos de estrés por inmovilización, seguido de un periodo de recuperación de 30 minutos en el cual las ratas fueron devueltas a sus jaulas para posteriormente sacrificarlas mediante el mismo procedimiento utilizado en el control.

c. Extracción de los núcleos hipotalámicos por micropunción

Para la metodología de micropunción, los animales fueron sacrificados mediante una exposición a una atmósfera saturada de CO₂ después de haber sido sometidos o no al estrés por inmovilización. Los animales fueron decapitados y los cerebros extraídos y congelados en una solución fría de 2-metilbutano para preservar la estructura y prevenir la actividad de enzimas que pudieran degradar el RNA. Las áreas más rostrales y caudales del cerebro (cerebelo y bulbo olfatorio) se eliminaron en condiciones lo más estériles posibles, la fracción restante del cerebro fue colocado en la platina del crióstato. Se realizaron cortes coronales sucesivos, hasta llegar a la región de inicio del paraventricular que se ubica de acuerdo a las coordenadas establecidas en el atlas del cerebro de la rata a partir de bregma -1.80mm (Paxinos et al 1986). El resto de los núcleos hipotalámicos fueron localizados de manera similar de acuerdo a las coordenadas referidas en el atlas paxinos, NSO (Bregma -1.4mm), ARC (Bregma -2.8) , NVM (Bregma -2.12).

Para la obtención de los núcleos, el tejido se desmontó de la platina, se seccionó una rebanada de aproximadamente 1 mm de espesor, que se colocó bajo el microscopio estereoscópico para que por medio de una cánula con un diámetro externo de 0.025 cm y un diámetro interno de 0.013 cm previamente esterilizada y enfriada en hielo seco se extrajeran los núcleos hipotalámicos. Las cánulas fueron usadas de manera individual para cada núcleo y por tratamiento (Palkovits,1983)

Los núcleos fueron almacenados a -70 °C en tubos estériles hasta su procesamiento. El resto de la rebanada se fijó en paraformaldehído al 4% y se procesó en cortes coronales para verificar la extracción correcta de los núcleos mediante la técnica de tinción de Nissl.

d. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El RNA total de los núcleos (ARC, NVM, NPV, NSO) obtenidos por micropunción se extrajo de acuerdo al método de tiocianato de guanidina (Chomczynski et al 1987). Se usaron dos oligonucleótidos complementarios al cDNA de la PRL de rata, el sentido 5'-TGTTCTGGTGGCGACTGCCAGACACCT-3' y el antisentido 5'TATCTTTTCGATCCCTTCGAGAAGCCG-3'. Como control interno se amplificó el cDNA de beta-actina con los siguientes oligonucleótidos: sentido 5'-CCATCATGAAGTGACGTTG -3' y antisentido 5'-ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA-3'.

La amplificación se realizó de acuerdo al método descrito (Torner et al 1999). Brevemente, 5 µg de RNA total fue sometido al proceso de transcripción reversa por 1 hora a 37°C en 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 600 ng de los oligo (dt), 5 unidades Rnasin y 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa (RT). La amplificación de PRL por PCR se realizó con las siguientes condiciones: 40 ciclos (94°C por 30seg, 65°C por 45 seg y 72°C por 45 seg) seguido por 7 minutos a 72°C al final de la amplificación. En el caso de β-actina el proceso se realizó por 21 ciclos y a una temperatura de hibridación de 58°C. El total de los transcritos amplificados fue analizado en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio. Para el PCR cuantitativo también se utilizó la beta-actina como control interno. La reacción incluyó 1 µl de la reacción de transcripción inversa cDNA, 7.5 µl del reactivo quantitec SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Germany), con una concentración de 200 nM de los iniciadores sentido y antisentido en un volumen final de la reacción de 12 µl. La detección y el análisis de datos se realizó utilizando un equipo LightCycler de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania)

e. Introducción de las cánulas guía y microinyección

Las cánulas guía fueron implantadas estereotáxicamente bajo anestesia i.p (45 mg/kg de pentobarbital). Las cánulas fueron preparadas con agujas de acero romas (0.7 x 30 mm), las cuales se colocaron en las coordenadas que corresponden al NPV [antero posterior -1.4, lateral -1.7, dorsoventral -6, con un ángulo de inclinación de 10° (Paxinos, 1986)] de manera bilateral y aseguradas con cemento acrílico mediante dos tornillos insertados en el hueso del cráneo. Los experimentos se realizaron 7 días después de la cirugía, tiempo en que los animales fueron manipulados diariamente mimetizando el proceso de inyección. Los microinyectores se construyeron 2 mm más largos que las cánulas guía para que sobresalieran esa distancia de las mismas y se colocaran sobre el núcleo paraventricular. Se inyectaron 2 µl de vehículo (buffer de fosfatos 0.01M, pH 7.4) y 100 ng tanto de PRL como de PRL-16K. En todos los casos la inyección fue con un flujo de 1 µl/min y una vez finalizada la infusión se esperó 30 segundos para retirar el microinyector con el objeto de facilitar la difusión de las sustancias.

f. Plataforma elevada (“Elevated Plus Maze”)

El laberinto de plataforma elevada o en cruz (EPM), es una prueba validada para evaluar la conducta de ansiedad. El EPM está compuesto de dos brazos abiertos (50 cm largo X 15 cm ancho) y dos brazos cerrados (50 cm largo X 10 cm ancho X 40 cm de alto), que se cruzan en el medio, y 75 cm elevado del suelo (Pellow et al., 1985). Los animales son colocados individualmente en la intersección de los brazos con la cara dirigida hacia los brazos cerrados y la prueba tiene una duración de 5 minutos. La conducta es videograbada y el número de entradas como el tiempo, es cuantificado en cada brazo. Se define como una entrada “completa” si y solo si las cuatro extremidades son colocadas fuera de la intersección y dentro del brazo. Las entradas solo son denominadas si las dos extremidades anteriores se encuentran dentro de los brazos. Después de la prueba los animales son regresados a su jaula individual. El EPM es limpiado con jabón inodoro entre cada animal. Los animales tienden a tener una conducta exploratoria y si se encuentran bajo condiciones de estrés o muy ansiosos, esta conducta se ve abatida y permanecen más tiempo en donde puedan estar

seguros, que en este caso es en los brazos cerrados. De acuerdo a estos criterios se estima si el animal presenta o no una conducta de ansiedad (Pellow et al., 1985)

g. Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedios \pm error estándar de la media. En los casos apropiados, se realizaron comparaciones estadísticas por la prueba de la t de Student no pareada o por análisis de varianza (ANOVA) de una cola, seguido por la prueba de Newman – Keuls o Fisher, en las pruebas conductuales. Un valor de $P < 0.05$ es considerado como estadísticamente significativo.

12. RESULTADOS Y DISCUSION

a. Efecto del estrés por inmovilización sobre la expresión del RNA mensajero de PRL en hipotálamo completo y en núcleos hipotalámicos aislados

Inicialmente quisimos corroborar estudios anteriores (Torner et al., 2004) donde se demostró que el estrés por inmovilización estimula la expresión del RNA mensajero de PRL en hipotálamos completos. En la figura 2A se muestra un caso representativo del análisis por RT-PCR a partir del RNA total aislado del hipotálamo de un animal control y de un animal sometido a 30 min de estrés por inmovilización y sacrificado después de un periodo de 30 min. Como control se analizó el RNA total obtenido de un fragmento de corteza parietal. Como se puede notar el RT-PCR amplificó un transcrito de 418 pb. Este tamaño correspondió al del producto amplificado a partir del cDNA de PRL (resultado no mostrado) y por lo tanto al del RNA mensajero de PRL. La señal del transcrito fue similar en la corteza de animales controles y estresados y en el hipotálamo en ausencia de estrés, sin embargo la expresión de dicho transcrito se incrementó considerablemente en hipotálamos de animales estresados. Esta diferencia no es atribuida a una variación en la cantidad de la muestra analizada, dado que la amplificación del gen constitutivo β -actina fue similar en todos los casos. El efecto del estrés sobre la expresión de PRL en el hipotálamo fue significativo cuando se promediaron los valores densitométricos de tres experimentos independientes correspondientes a la banda del transcrito de PRL corregida por la del gen constitutivo, β -actina (Fig. 2B). Estos hallazgos corroboran estudios previos y validan en nuestras manos el método de estrés por inmovilización para estimular la expresión del RNA mensajero de PRL en el hipotálamo.

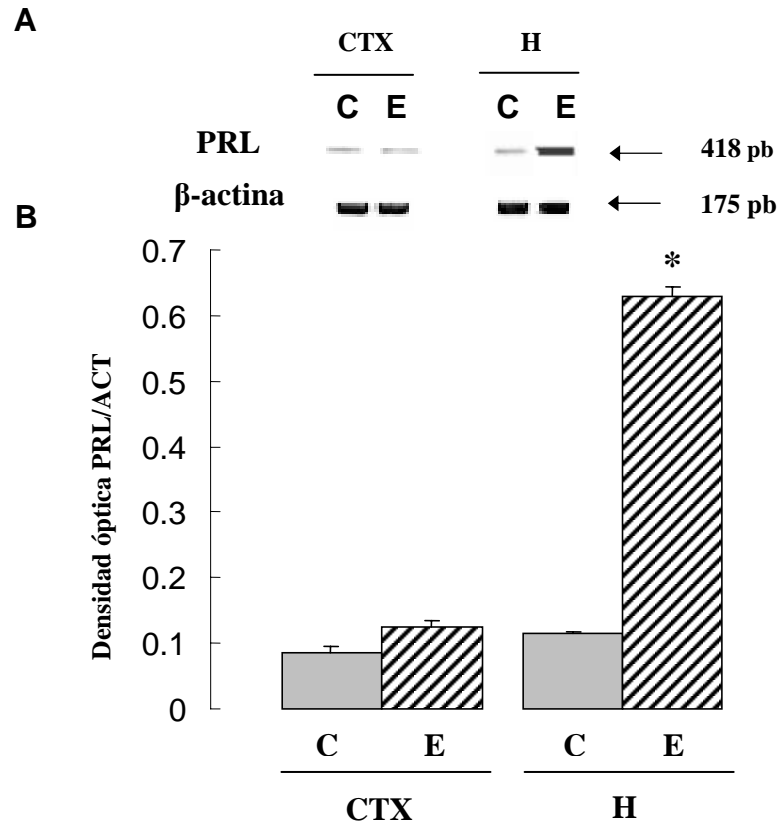


Figura 2 **(A)** Productos de RT-PCR amplificados del hipotálamo (H) y la corteza parietal (**CTX**) en condiciones control (**C**) y a los 30 min posteriores a la aplicación de 30 min de estrés por inmovilización (E). **(B)** Cociente de los valores densitométricos de la banda del producto amplificado para PRL sobre la β -actina de tres animales controles (C) y 3 animales estresados (E). $P < 0.05$ vs hipotálamo control.

Analizamos entonces si el aumento en la expresión de PRL reportado en el hipotálamo completo, podría tener una localización específica en ciertos núcleos hipotalámicos que se sabe expresan PRL, a saber: los núcleos paraventricular, supraóptico y ventromedial (Grattan et al., 2002). Analizamos el efecto del estrés por inmovilización sobre la expresión del RNA mensajero de PRL en dichos núcleos aislados por micropunción, en la figura 3, se muestran casos representativos que indican una extracción adecuada de dichos núcleos.

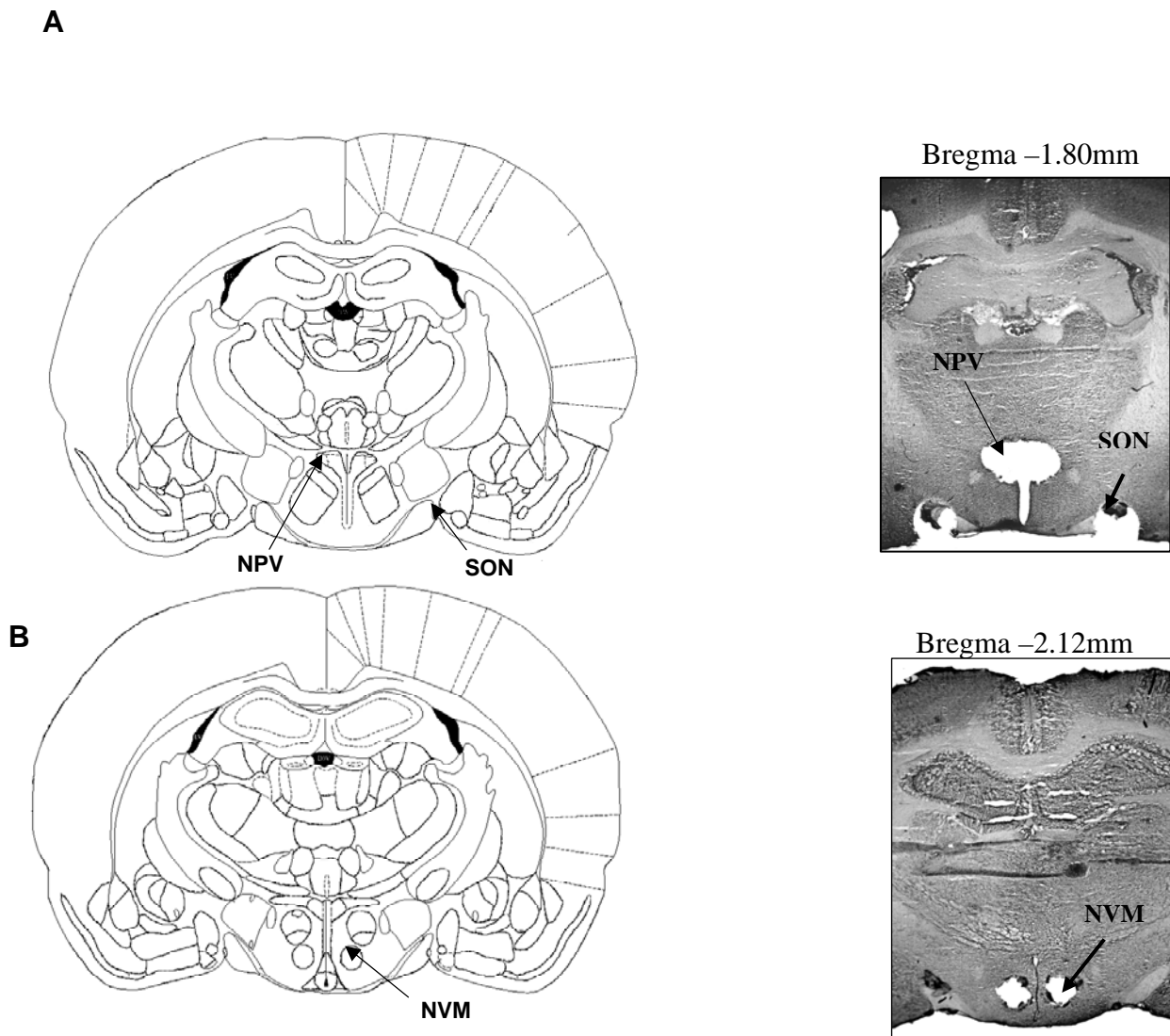


Fig 3. Secciones representativas de cortes coronales de cerebro donde se extrajeron los núcleos hipotalámicos paraventricular (NPV), supraóptico (NSO) (A) y el ventromedial NVM (B).

Para este primer experimento los núcleos hipotalámicos fueron reunidos en grupos de diez, y de este “pool” se aisló el RNA total para su procesamiento por RT-PCR con oligonucleótidos específicos para PRL (Fig.4). En todos los casos se observó una amplificación aparentemente mayor del RNA mensajero de PRL en respuesta al estrés por inmovilización, si bien el aumento pareció más marcado en el NPV. Sin embargo cuando se realizó la corrección de la amplificación de PRL por la β -actina el aumento solamente fue claro en el NPV. En apoyo a que estas diferencias reflejan cambios específicos en la

expresión del gen de PRL, el nivel de amplificación del gen casero β -actina fue similar en los grupos experimentales (control y estresado).

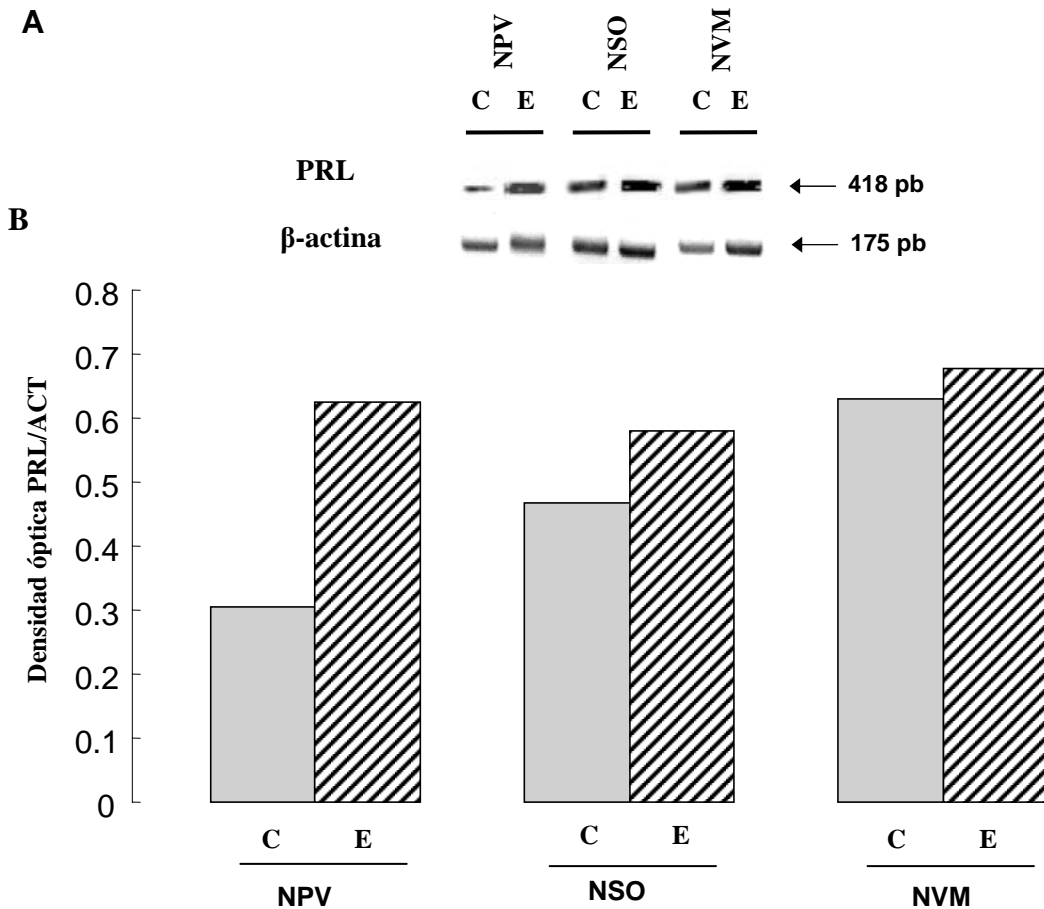


Fig. 4. (A) Productos de RT-PCR amplificados para el gen de PRL de los núcleos hipotalámicos paraventricular (NPV), supraóptico (NSO) y ventromedial (NVM), obtenidos por micropunción de animales control **C** y de animales estresados **E**. **(B)** Cociente de los valores densitométricos de la banda del producto amplificado para PRL sobre la β -actina de diez animales por grupo. Los datos se analizaron mediante la prueba T de student, seguida con pruebas post-hoc.

Estos resultados muestran un aumento en la expresión del RNA mensajero en respuesta al estrés en el NPV, e indican que el efecto sobre el hipotálamo reside prioritariamente en dicho núcleo. Sin embargo, este es solamente un experimento y el método de RT-PCR utilizado no es cuantitativo. La ausencia de diferencias puede por tanto reflejar limitaciones del método donde a la máxima amplificación (40 ciclos) se pueden anular variaciones reales que no son cualitativamente aparentes. En otras palabras, con un PCR convencional los datos obtenidos reflejan amplificación final, cuando

las reacciones han alcanzado la fase más alta de amplificación, y por lo general indican diferencias muy grandes de expresión. Para evitar esta limitación metodológica, se realizó el método de PCR-cuantitativo, el cual se basa en la determinación de productos amplificados en función de los diferentes ciclos de amplificación empleados, esto permite obtener una curva de expresión en una zona lineal. Además, se adquirió un estuche (Rneasy micro kit (50) de Qiagen) el cual nos permitió la purificación del RNA de muy poco tejido (en un rango de 1 célula hasta 5 mg de tejido) y con ello la purificación directa de cada uno de los núcleos aislados sin necesitar reunirlos en “pooles”.

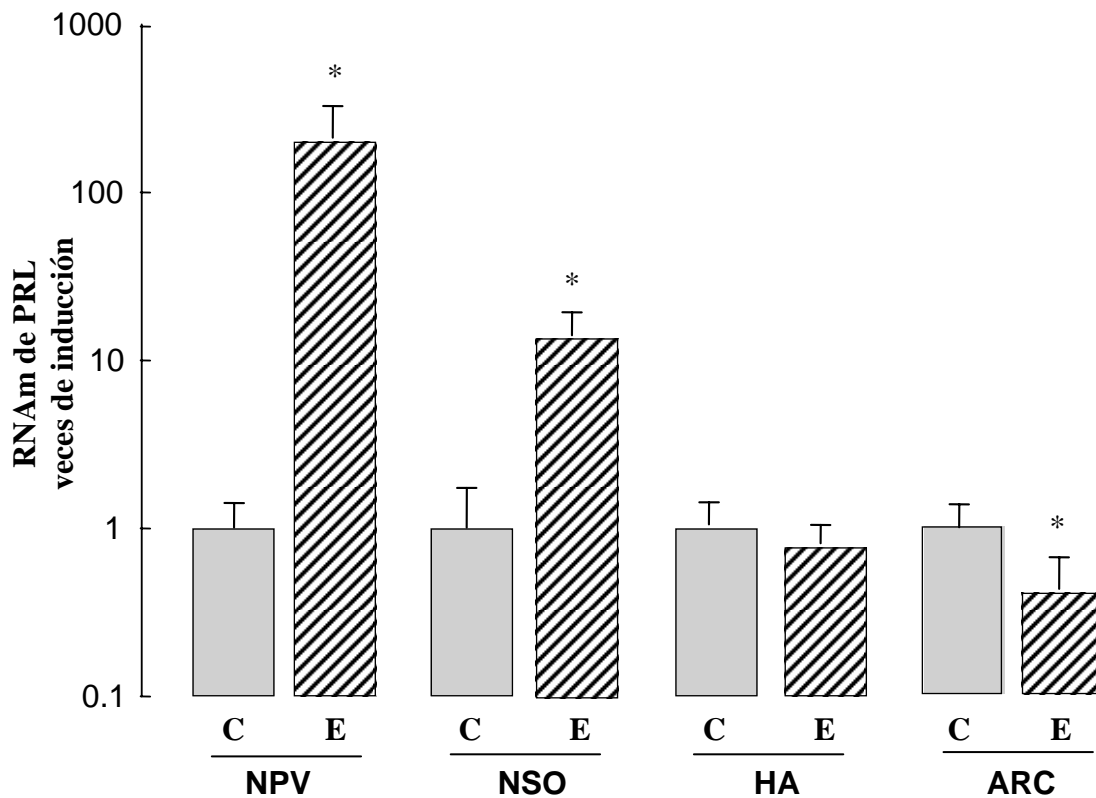


Figura 5. Promedio de doce núcleos hipotalámicos obtenidos por micropunción de seis animales control **C** y 6 estresados **E**. Núcleos paraventricular NPV, supraóptico NSO, núcleo ventromedial NVM y arcuato ARC. * $P < 0.05$ vs animales control. Los datos se analizaron mediante la prueba T de student, seguida con pruebas post-hoc.

En la figura 5 se muestran los resultados del RT-PCR cuantitativo (en el apéndice se pueden revisar las gráficas de las diluciones, los datos se corrigieron con los valores de β -actina). La gráfica indica la diferencia con respecto al nivel basal del nivel de expresión del RNA mensajero de PRL 30 min después de la aplicación de 30 min de estrés por inmovilización. Los resultados son promedios de los valores observados en

doce núcleos obtenidos de seis animales diferentes. Como se puede observar, el estrés estimuló 100 veces la expresión del RNA mensajero de PRL en el NPV y 10 veces en el NSO, pero no modificó dicha expresión en los núcleos arcuato y núcleo ventromedial. Estos resultados confirman el efecto estimulador del estrés sobre la expresión del RNA mensajero de PRL en el NPV observado previamente y su importancia como blanco principal del estrés para esta acción. Asimismo, el estrés estimula la producción de PRL en el NSO, si bien con un efecto más modesto, lo que coincide con el menor efecto observado mediante el RT-PCR convencional en el experimento de “pooles” de tejido. Por otra parte, el estrés no modificó la expresión de PRL en el NARC, ni en el VNM (Fig. 4) por lo que parece ser que esta acción estimuladora del estrés podría ser específica a los núcleos NPV y NSO del hipotálamo.

El aumento en el NPV es consistente con nuestra propuesta de que el estrés regula a la PRL local y que esta contribuye a la mediación de las respuestas al estrés integradas en este núcleo. Con respecto al SON, el estrés por inmovilización se sabe que activa a c-fos en este núcleo y que esta activación parece estar involucrada en la secreción de oxitocina y vasopresina (Pacák et al., 2001), por lo que también en este núcleo la respuesta al estrés pudiera involucrar acciones de PRLs locales. Por otra parte, se ha reportado que en el NVM no se activa c-fos en respuesta al estrés por inmovilización (Pacák et al., 2001), lo que podría ser consistente con la falta de efecto sobre la PRL observado mediante el RT-PCR no cuantitativo.

La ausencia de efecto del estrés sobre la expresión de PRL en los NVM, NARC y NA podría indicar que estos núcleos no participan en las acciones que ejerce la PRL sobre las respuestas al estrés. Se ha propuesto que la PRL puede actuar en el NVM para estimular la ingesta de alimentos y para inhibir la conducta sexual (Dudley et al., 1982, Doherty et al., 1985); que en el NARC la PRL estimula las neuronas TIDA y con ello inhibe su propia secreción (Grattan 2002), y que en el hipotálamo anterior parecen integrarse acciones inmunomoduladoras que inhiben la secreción de PRL por la hipófisis. La administración de endotoxinas en dicho núcleo produce una disminución de PRL y ACTH en plasma (Phelps et al., 2001).

En forma consistente con las acciones de la PRL, se ha descrito la presencia de su receptor en amplias regiones del hipotálamo (Crumevolle et al., 1993). En particular, se

ha propuesto que la regulación central de la expresión del receptor de PRL podría ser parte de los mecanismos activados bajo distintas condiciones funcionales. Por ejemplo, se ha descrito el estrés por restricción de movimiento induce un incremento en la expresión del receptor de la PRL en el núcleo paraventricular y en los plexos coroides (Fujikawa et al., 2006). Este incremento se ha relacionado a acciones de la PRL sobre el sistema nervioso central capaces de regular la activación del sistema hipotálamo-hipófisis adrenal y de esta manera, de proteger contra el daño y la inflamación en respuesta a la hipocalcemia y la erosión gástrica subsecuente producida por la exposición al estrés por restricción de movimiento (Fujikawa et al., 2006). Consistentemente, dicha protección se revierte mediante la administración de oligonucleótidos antisentido capaces de bloquear la expresión del receptor de PRL en el hipotálamo, particularmente en los núcleos paraventriculares, preópticos y ventromediales (Fujikawa et al., 2006).

Es probable que la regulación de la expresión de receptor por el estrés esté limitada a los núcleos donde la PRL ejerce acciones relacionadas con dicha estimulación, tal es el caso de los NPV y NSO del hipotálamo, pero también de núcleos en regiones extrahipotálicas. Por ejemplo, en núcleos del sistema límbico y de la amígdala se han reportado proyecciones prolactinérgicas capaces de secretar PRL y por lo tanto de activar receptores en dichas regiones ((Tobeau et al., 1979, Barbanel et al., 1986, Emanuele et al., 1987, Harlan et al., 1989, Siaud et al., 1989)

b. Efecto de la administración de PRL y de PRL-16K en el hipotálamo sobre la conducta de ansiedad en la plataforma elevada

Durante los 5-7 días posteriores a la implantación bilateral de cánulas guía estimada en los NPV, los animales fueron manipulados diariamente al monitorear la fase del ciclo estral mediante citología vaginal, mimetizando el proceso de inyección a seguir el día del experimento. La conducta de ansiedad se evaluó en la plataforma elevada de acuerdo a los parámetros previamente descritos (Pellow et al., 1985). Las ratas fueron colocadas en el cuarto de conducta 24 hrs antes del experimento. Todos los experimentos se realizaron entre las 12 y las 2 de la tarde, para evitar los cambios en el ciclo hormonal de los animales. Además, el día anterior al experimento se colocó un inyector dentro de la cánula guía, de tal forma que el posible rompimiento celular que conlleva la introducción de este no afectara las infusiones experimentales. Los animales en fase de diestro fueron inyectados bilateralmente con 1 μ l de vehículo (PBS), PRL-16K (100 ng) o PRL (100 ng), e inmediatamente puestos en la parte central de la plataforma elevada, donde fueron filmados por espacio de 5 minutos y valorados por medio de un programa computacional, donado por Luz Torner, Universidad de Regensburg, Regensburg Alemania, donde se realizaron los experimentos.

Ningún animal presentó defecaciones durante la manipulación de la inyección, ni dentro de la plataforma. Al finalizar la prueba, los animales se colocaron en su caja y se sacrificaron dos horas después, los cerebros se extrajeron y el sitio de inyección se evaluó en cortes coronales teñidos mediante la tinción de Nissl.

En la figura 6 se pueden observar los resultados de la evaluación conductual registrados como entradas completas a los brazos abiertos (es decir, solo se cuantifican las entradas donde las cuatro extremidades se encontraban dentro de los brazos abiertos) (A); las entradas parciales solo a los brazos abiertos (B) o solo a los cerrados (C) (definiendo entrada parcial si el animal colocaba la mitad del cuerpo dentro del brazo, es decir las dos extremidades anteriores). La PRL-16K se asoció con una tendencia a disminuir las entradas a los brazos abiertos y de aumentarlas a los brazos cerrados, que solo fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) cuando las entradas se expresaron como porcentajes obtenidos como resultado de la división de las entradas a los brazos

abiertos o cerrados (Fig. 6 D y E) entre en número total de entradas a ambos brazos (no se muestra la figura). Cuando un animal presenta menos entradas a los brazos abiertos y mas a los cerrados se le considera “ansioso”, sugiriendo que el tratamiento con PRL-16K estimula la ansiedad. En contraposición, la PRL no modificó estos parámetros con respecto al vehículo.

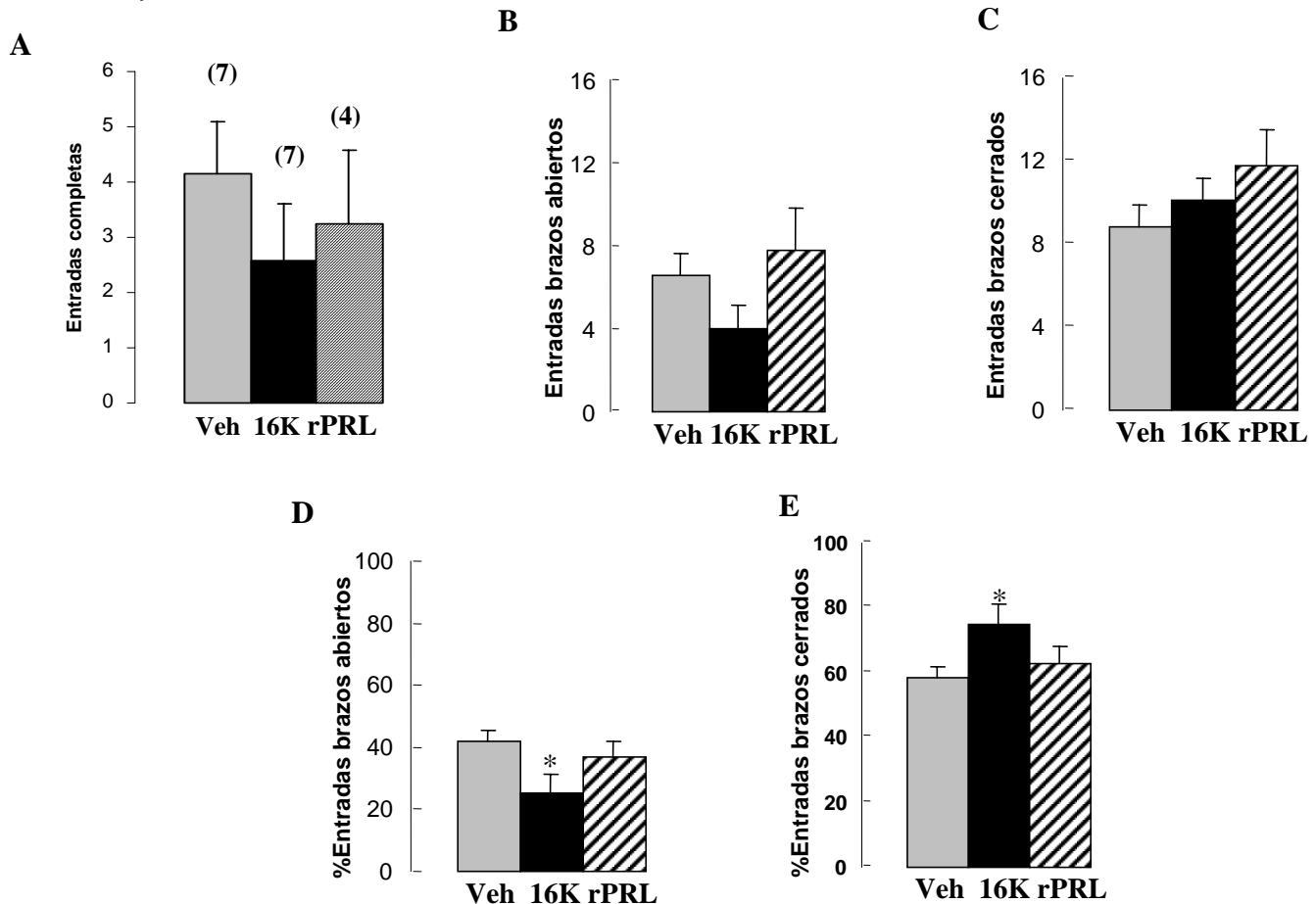


Figura 6. Parámetros conductuales de la prueba de la plataforma elevada: entradas completas a brazos abiertos (A), entradas parciales a brazos abiertos (B) y a brazos cerrados (C), porcentaje de entradas a brazos abiertos (D) o a brazos cerrados (E) sobre el total de entradas en hembras tratadas con **PBS (Veh)**, **PRL-16K** o **PRL (PRL)**, en la vecindad del NPV. En paréntesis se muestra el número de animales en cada grupo. * $p < 0.05$ vs vehículo (Anova seguida de una prueba T de Student).

Otro de los parámetros evaluados fue el tiempo total empleado en los brazos abiertos y en los brazos cerrados (Fig 7). En forma consistente, el grupo tratado con PRL-16K mostró una tendencia a pasar menos tiempo en los brazos abiertos (Fig.7 A ,C) y más en los cerrados (Fig.7 B,D), si bien esta tendencia no fue estadísticamente significativa. La PRL tampoco mostró efecto sobre este parámetro.

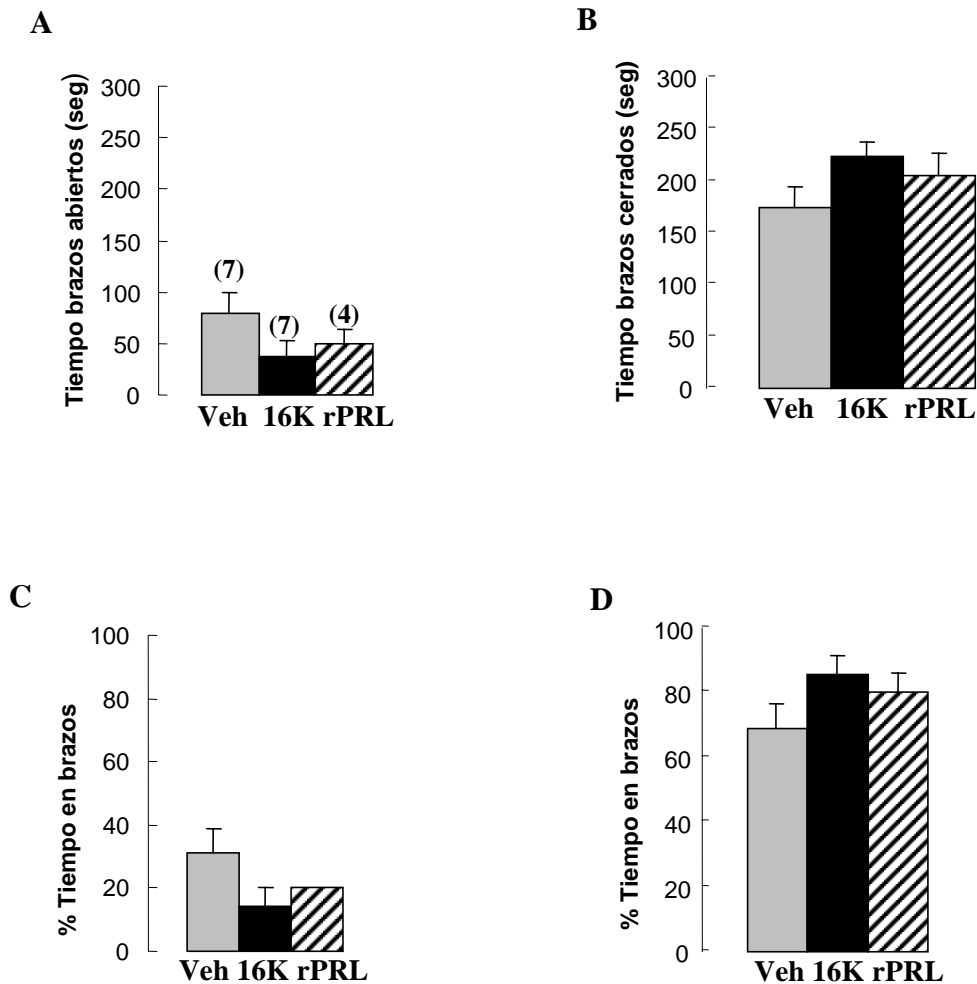


Figura 7. Tiempo total empleado en brazos abiertos (A) y cerrados (B), y porcentaje de tiempo en brazos abiertos (C) cerrados (D) con respecto al tiempo total (cinco minutos) de la prueba de la plataforma elevada en hembras tratadas con PBS (Veh), PRL-16K, y PRL de rata (rPRL), inyectadas en la vecindad del NPV. En paréntesis se muestra el número de animales en cada grupo. (Anova seguida de una prueba T de Student).

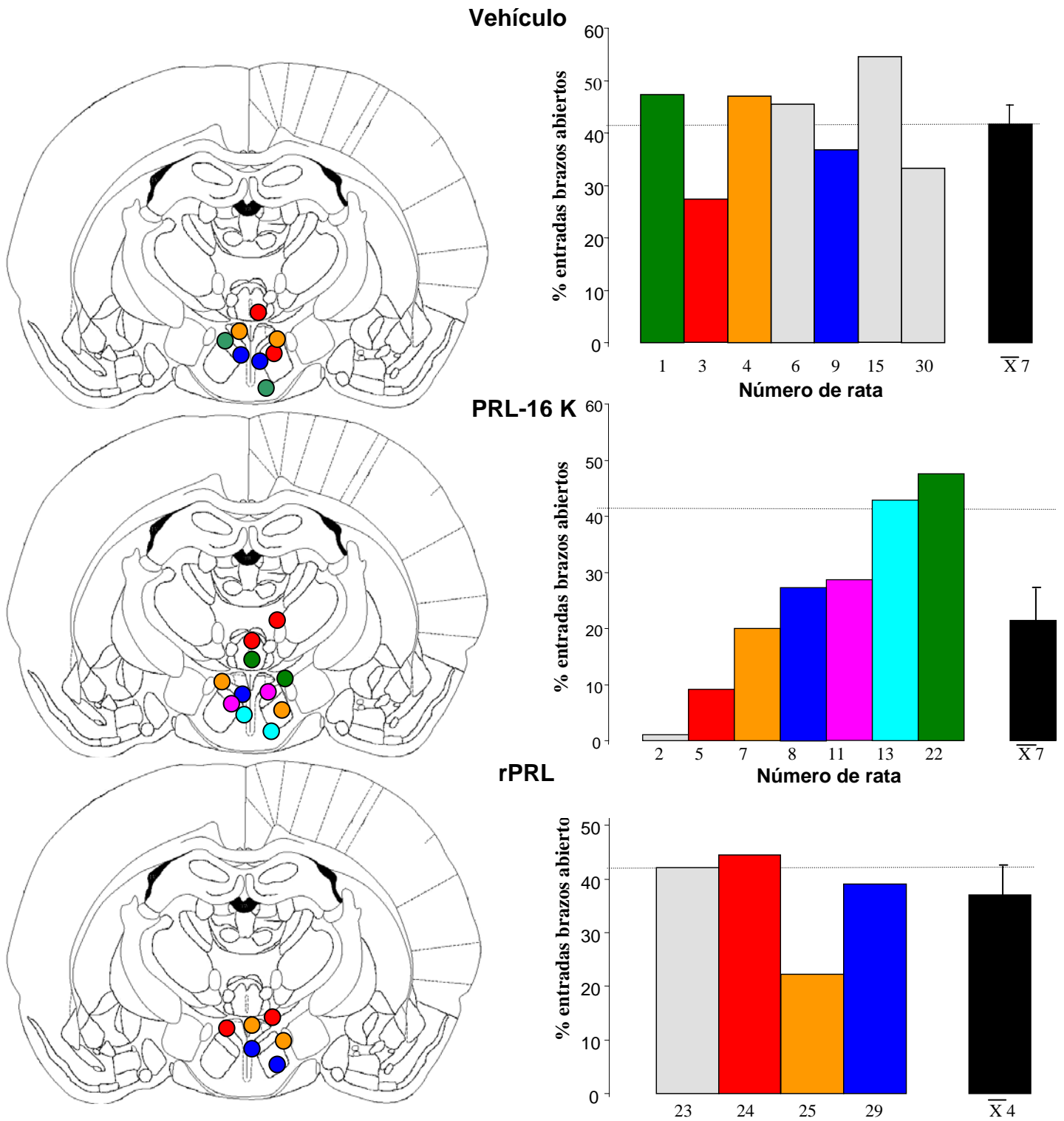


Figura 8. Distribución de las cánulas y efectos sobre ansiedad en los grupos experimentales tratados con vehículo, PRL-16K y PRL. Los círculos en cortes coronales del cerebro indican el punto más profundo de huella dejada por las cánulas. Los colores de los círculos corresponden al número del animal correspondiente a la barra del color respectivo en la gráfica de la respuesta conductual. Las barras grises representan resultados de los animales en los que no se analizó su cerebro. Las barras negras corresponden a los promedios más el error estándar de cada grupo. La línea punteada es el valor promedio de porcentaje de entradas en brazos abiertos del grupo control.

Estos hallazgos son aún de carácter preliminar debido a que el número de animales en cada grupo, particularmente en el de la PRL (rPRL), es bajo. Sin embargo, son sugerentes de que la PRL-16K tiene acciones ansiogénicas. La localización de estas posibles acciones no es clara. La distribución de las cánulas evaluada en los cerebros abarcó diversas zonas del tálamo y del hipotálamo en los tres grupos experimentales (Fig. 8). Esta amplia distribución no permitió establecer correlaciones claras entre posibles sitios de acción y la presencia del efecto, lo que además señala la gran dificultad de lograr la implantación precisa de las cánulas en la zona del PVN. Se propone en experimentos futuros investigar el efecto ansiogénico de la PRL-16K administrada en los ventrículos laterales, en un intento de lograr una administración que sea más comparable entre los tres grupos experimentales.

Las limitaciones metodológicas del estudio (número pequeño de casos y diferentes localizaciones de las cánulas) restringen la posibilidad de obtener conclusiones válidas. Sin embargo, a pesar de ser preliminares, los hallazgos sugieren las siguientes consideraciones. La PRL-16K podría ser ansiogénica más no la PRL. El que la PRL-16K tenga efectos distintos a los de la PRL no es sorprendente. Se ha propuesto que este fragmento de PRL es capaz de activar receptores distintos a los de la PRL y como resultado regular la función vascular (Corbacho et al 2002) y promover la inflamación (Corbacho et al., 2000). Así, se demostró que membranas de células endoteliales contienen sitios de unión específicos y de alta afinidad ($K_d = 1\text{nM}$) a la PRL-16K que se asocian a proteínas de 52 y 32 kDa que no interaccionan con la PRL completa (Clapp y Weiner, 1992). Sin embargo, estos posibles receptores aún no han sido identificados y por lo tanto se hace difícil su caracterización.

Por otra parte, desde hace tiempo se sabe que la PRL-16K, también puede activar al los receptores de la PRL (Clapp et al 1989), si bien como un agonista débil. Esta posibilidad, no parecería participar en este estudio, puesto que no observamos acciones de PRL, y que en todo caso estas acciones deberían operar en un sentido opuesto, i.e., efectos ansiolíticos y no ansiogénicos (Torner et al., 2001). No sabemos si la ausencia de efecto de la PRL se debe a que los resultados aún no son confiables debido al número reducido de animales en el grupo; o bien si la falta de efecto se relaciona con la especie (rata). Los efectos ansiolíticos se reportaron para la PRL ovina, cuya potencia biológica es

superior a las de las otras especies. Para analizar esta posibilidad, en experimentos en curso estamos utilizando concentraciones superiores de PRL de rata, y comparando su efecto con dosis similares de PRL ovina. Alternativamente, otra diferencia entre ambas hormonas que podría apoyar la ausencia de un efecto ansiolítico en la PRL de rata, es que la hormona de esta especie es más susceptible a ser procesada enzimáticamente hacia PRL-16K que la PRL ovina (Clapp 1987). Dado que la PRL-16K puede ser ansiogénica, las posibles acciones ansiolíticas de la PRL se verían contrarrestadas por su procesamiento proteolítico a dicho fragmento hormonal.

La posibilidad de que la PRL y la PRL-16K tengan efectos opuestos no es nueva. La PRL-16K estimula la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) (Corbacho et al 2000), mientras que la PRL la inhibe (Corbacho et al 2003); Asimismo, la PRL-16K inhibe la angiogénesis y la PRL no tiene efectos sobre la neovascularización (Corbacho et al., 2002). Además, como se mencionó, ambas moléculas activan receptores y mecanismos de señalización diferentes (Corbacho et al., 2002, Macotella et al., 2002, Corbacho et al., 2003). Por lo tanto, la resultante final del efecto de la hormona dependería importantemente de la actividad de la enzima responsable del procesamiento de PRL a PRL-16K.

Finalmente, también es posible que en la ausencia de efecto de la PRL influya la vía de administración de la PRL. En sus estudios, Torner y colaboradores administraron a la PRL icv, y dicha administración podría facilitar la acción de la hormona sobre otras regiones a las que no tiene acceso con la administración empleada en nuestro estudio. Todas estas posibilidades deberán ser analizadas experimentalmente. Al respecto, estamos ampliando los grupos experimentales y administrando a las hormonas icv y analizando la proteólisis de la PRL de rata y de la PRL ovina hacia PRL-16K por extractos de hipotálamos de animales estresados y no estresados.

13. CONCLUSIONES

En el presente estudio observamos que el estrés incrementa la expresión del RNA mensajero de PRL en el hipotálamo, y este efecto se localiza principalmente en el núcleo paraventricular y el núcleo supraóptico, los cuales tienen un papel fundamental en la respuesta al estrés. El estrés aumentó 10 y 100 veces la expresión del ARN mensajero de PRL en el NSO y en el NPV, respectivamente, pero no la modificó en los núcleos hipotalámicos ventromedial y arcuato.

Por otra parte, la administración exógena de PRL-16K en regiones del tálamo e hipotálamo de ratas intactas, parece aumentar la conducta de ansiedad valorada mediante la prueba de "la cruz elevada". El tratamiento con PRL-16K, disminuyó significativamente el tiempo que permanecieron las ratas en los brazos abiertos y también aumentó, si bien no significativamente, el tiempo de permanencia en los brazos cerrados. Estos resultados son consistentes con el involucramiento de la PRL y de sus fragmentos moleculares como mediadores centrales del estrés, al menos en respuestas como la ansiedad. Proponemos que los fragmentos moleculares de la PRL disparan respuestas ansiogénicas capaces de balancear la acción ansiolítica de la PRL íntegra

14. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera G. 1994. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol.* 15: 321-350
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, Lopez-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(8):2947-53.
- Arbogast L, Voogt J. 1997. Prolactin receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology* 138:3016-23
- Bakowska JC, Morrell JI. 1997. Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *J Comp Neurol.* 22;386(2):161-77.
- Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS. 1993. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology.* 133(2):935-8.
- Barbanel G, Ixart G, Arancibia S, Assenmacher I. 1986. Probable extrapituitary source of the immunoreactive prolactin measured in the cerebrospinal fluid of unanesthetized rats by push-pull cannulation of the 3rd ventricle. *Neuroendocrinology.* 43(4):476-82.
- Ben_Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17(6): 639-69
- Bellussi G, Muccioli G, Ghe C, Di Carlo R. 1987, Prolactin binding sites in human erythrocytes and lymphocytes. *Life Sci.* 24;41(8):951-9.
- Bodosi B, Obal F Jr, Gardi J, Komlodi J, Fang J, Krueger JM. 2000. An ether stressor increases REM sleep in rats: possible role of prolactin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279(5):1590-8.
- Bole_Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19:3 225-68

- Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shiota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. 1988. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell*. 8;53(1):69-77.
- Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE. 1990. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(20):8003-7.
- Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE. 1997 Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology*. 138(2):756-63.
- Bridges R, Rigerio B, Byrnes E, Yang L, Walker A. 2001. Central infusions of the recombinant human prolactin receptor antagonist, S179D-PRL, delay the onset of maternal behavior in steroid-primed, nulliparous female rats. *Endocrinology*. 2001 142(2):730-9.
- Bridges RS, Grattan DR. 2003 Prolactin-induced neurogenesis in the maternal brain. *Trends Endocrinol Metab*. 14(5):199-201.
- Campbell GS, Argetsinger LS, Ihle JN, Kelly PA, Rillema JA, Carter-Su C. 1994. Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7;91(12):5232-6.
- Chiu S, Koos RD, Wise PM. 1992 Detection of prolactin receptor (PRL-R) mRNA in the rat hypothalamus and pituitary gland. *Endocrinology* 130(3):1747-9.
- Chiu S, Wise PM. 1994 Prolactin receptor mRNA localization in the hypothalamus by in situ hybridization. *J Neuroendocrinol*. 6(2):191-9.
- Chomczynski P, Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *N. Anal Biochem*. 162(1):156-9.
- Clapp C. 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology*. 121(6):2055-64.

- Clapp C, Weiner RI. 1992, A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology*. 130(3):1380-6.
- Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. 1993. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*. 133(3):1292-9.
- Clapp C, Torner L, Gutierrez_Ospina G, Alcantara E, López_Gomez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejía S, Morales MA, Martínez de la Escalera G. 1994. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:22 10384-8
- Clapp C. 2004. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*. 145(12):5714-22
- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Duenas Z, Noris G, Morales MA, Martinez De La Escalera G, Clapp C. 2000. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol*. 166(1):53-62.
- Corbacho A, Macotela Y, Nava G, Jason P. Eiserich, Carroll E. Cross, Gonzalo Martínez de la Escalera, Clapp C 2003. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett*. 5;544(1-3):171-5.
- Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Jammes H, Djiane J, Kelly PA, Reymond MJ, Haour F. 1993 Prolactin receptors in the rat hypothalamus: autoradiographic localization and characterization. *Neuroendocrinology*. 57(3):457-66.
- Da Costa A, Ingram C, Lightman S. 1996. Region-specific reduction in stress-induced c-fos mRNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Res*. 742:177-84
- DeVito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C. 1992. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 130(5):2549-56.

- DeVito WJ, Avakian C, Stone S. 1992 Proteolytic modification of prolactin by the female rat brain. *Neuroendocrinology*. 56(4):597-603.
- Devost D, Boutin JM. 1999. Autoregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol*. 20;158(1-2):99-109.
- Doherty PC, Bartke A, Smith MS. 1985 Hyperprolactinemia and male sexual behavior: effects of steroid replacement with estrogen plus dihydrotestosterone. *Physiol Behav*. 35(1):99-104.
- Dorshkind K, Horseman N. 2002. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessay* (23): 288-94
- Dudley CA, Jamison TS, Moss RL. 1982 Inhibition of lordosis behavior in the female rat by intraventricular infusion of prolactin and by chronic hyperprolactinemia. : *Endocrinology* 110(2):677-9.
- Dunn AJ, Swiergiel AH, Palamarchouk V. 2004. Brain circuits involved in corticotropin-releasing factor-norepinephrine interactions during stress. *Ann N Y Acad Sci*. (1018):25-34.
- Emanuele NV, Metcalfe L, Wallock L, Tentler J, Hagen TC, Beer CT, Martinson D, Gout PW, Kirsteins L, Lawrence AM. 1987. Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from pituitary prolactin. *Brain Res*. 22;421(1-2):255-62.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 80(4):1523-631.
- Fujikawa T, Soya H, Yoshizato H, Sakaguchi K, Doh-Ura K, Tanaka M, Nakashima K. 1995. Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus. *Endocrinology* . (12):5608 –13
- Gagnerault MC, Touraine P, Savino W, Kelly PA, Dardenne M. 1993 Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J Immunol*; (150):5673-81.
- Gao J, Horseman ND. 1999. Prolactin-independent modulation of the beta-casein response element by Erk2 MAP kinase. *Cell Signal*. 11(3):205-10.

- Garcia A, Herbon L, Barkan A, Papavasiliou S, Marshall JC. 1985 Hyperprolactinemia inhibits gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulation of the number of pituitary GnRH receptors. *Endocrinology*. 117(3):954-9.
- Goffin V, Nadine B, Touraine P, Kelly P. 2002 Prolactin: The new biology of an old hormone. *Annu. Rev. Physiol.* (64):47-67
- González C, Corbacho AM, Eiserich JP, García C, López-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Díaz-Muñoz M, Rubio R, Lin SH, De La Escalera GM,
- Grattan DR, Pi XJ, Andrews ZB, Augustine RA, Kokay IC, Summerfield MR, Todd B, Bunn SJ. 2001. Prolactin receptors in the brain during pregnancy and lactation: implications for behavior. *Horm Behav* 40:2 115-24
- Grattan DR. 2001. The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog Brain Res*. 133:153-71.
- Grattan DR. 2002. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction* (123): 497 -506
- Hashimoto K, Ohno N, Aoki Y, Kageyama J, Takahara J, Ofuji T. 1982. Distribution and characterization of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in rat hypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology*. 34(1):32-7.
- Harlan RE, Shivers BD, Fox SR, Kaplove KA, Schachter BS, Pfaff DW. 1989 Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Neuroendocrinology*. 49(1):7-22.
- Herman JP, Schafer KH, Sladek CD, Day R, Young EA, Akil H, Watson SJ. 1989. Chronic electroconvulsive shock treatment elicits up-regulation of CRF and AVP mRNA in select populations of neuroendocrine neurons. *Brain Res*. 6;501(2):235-46.
- Herman J, Cullinan W, Ziegler D, Tasker J. 2002. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur J Neurosci* 16:3 381-385
- Horseman ND. 2002. Prolactin receptor diversity in humans: novel isoforms suggest general principles. *Trends Endocrinol Metab*. 13(2):47-8.

- Hunt SP, Pini A, Evan G 1987 Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* (328): 632–634
- Imaki S, Shibasaki, Wang X, Demura H. 1995. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor antagonist attenuates c-fos mRNA expression in the paraventricular nucleus after stress. *Neuroendocrinology*, (61): 450-2
- Jabbour HN, Kelly PA. 1997. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Rev Reprod*. 2(1):14-8.
- Kiss J. 1998. Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull*. 20 (6):699-708
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. 1991, The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev*.12(3):235-51.
- Kline JB, Roehrs H, Clevenger CV. 1999. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J Biol Chem*. 10;274(50):35461-8.
- Kovacs K. 1998. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*. (33): 287-297
- Lerant A, Freeman M. 1998. Ovarian steroids differentially regulates the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations. *Brain res*. 802:141-154.
- Lesueur L, Edery M, Ali S, Paly J, Kelly PA, Djiane J.1991. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1;88(3):824-8.
- Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA. 1998 Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology*. 139(10):4102-7.
- Lister. 1990. Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmac. Ther*. 46:321-340

- Lucas BK, Ormandy C, Binart N, Bridges RS, Kelly PA, 1998. Null mutation of prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* 139:4102-7
- Macotela Y, Mendoza C, Corbacho AM, Cosio G, Eiserich JP, Zentella A, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 2002. 16K prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts. *J Endocrinol.* 175(3):13-8.
- Makara GB, Stark E, Karteszi M, Palkovits M, Rappay G. 1981. Effects of paraventricular lesions on stimulated ACTH release and CRF in stalk-median eminence of the rat. *Am J Physiol.* 240(4):441-6.
- Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW. 1995. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* 136(10):4517-25
- Makino S, Hashimoto K, Gold P. 2002. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol Biochem Behav.* (73): 147-158
- Mangurian LP, Walsh RJ, Posner BI. 1992 Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology.* 131(2):698-702.
- Márquez C, Nadal R, Armario A. 2004. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilization stress in rats: individual differences. *Neuroscience* (123): 601-12
- Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. 2000. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol.* 14(10):1536-49.
- Ma XM, Lightman SL, Aguilera G. 1999. Vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene responses to novel stress in rats adapted to repeated restraint. *Endocrinology* 140, (8) :3623 –3632
- McMurray R. 2001. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *Int Immunopharmacology* 1(6):995-1008.

- Mejía S, Torner LM, Jeziorski MC, González C, Morales MA, de la Escalera GM, Clapp C. 2003. Prolactin and 16K prolactin stimulate release of vasopressin by a direct effect on hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrine* (2):155-62
- Mejía S, Morales MA, Zetina ME, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 1997. Immunoreactive prolactin forms colocalize with vasopressin in neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology* (3):151-9
- Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV. 1982. Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat.* 165(4):385-96.
- Mezey E, Kiss JZ. 1991. Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. *Endocrinology.* 129(4):1814-20.
- Milenkovic L, D'Angelo G, Kelly PA, Weiner RI. 1994. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;91(4):1244-7.
- Millan MJ. 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol.* 70(2):83-244.
- Moberg G, Mench J. (2001) *The biology of animal stress.* CABI Publishing. New York.
- Morehead M, Gala R. 1987. Restraint stress depresses prolactin surges in pseudopregnant rats and adrenalectomy does not alter the response. *Life Science* 23;41 (21):2355-62
- Moore BJ, Gerardo-Gettens T, Horwitz BA, Stern JS. 1986. Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res Bull.* 17(4):563-9.
- Nagano M, Kelly PA. 1994. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem.* 6;269 (18):13337-45.

- Nakamura K, Kurasawa M. 2001. Anxiolytic effects of aniracetam in three different mouse models of anxiety and the underlying mechanism. *Eur J Pharmacol.* 420: 33-43
- Neill JD. 1970. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* (6):1192-7
- Nicoll CS, Talwalker PK, Meites J. 1960. Initiation of lactation in rats by nonspecific stresses. *Am J Physiol.* (198):1103-6.
- Nicoll CS. 1980. Ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Fed Proc.* 39(8):2563-6.
- Noel M, Woodside B. 1993 Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats. *Physiol Behav.* 54(1):151-4.
- Pacak K, Armando I, Fukuhara K, Kvetnansky R, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS 1992 Noradrenergic activation in the para-ventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* (589):91–96
- Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Yadid G, Kopin IJ, Goldstein DS. 1995. Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci.* 29,(771):115-30.
- Pacak K, Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22(4): 502-548
- Palkovits M 1983 Punch sampling biopsy technique. *Methods Enzymol* (103):369-76.
- Palkovits M, Baffi JS, Dvori S 1995 Neuronal organization of stress response. Pain-induced c-fos expression in brain stem catecholaminergic cell groups. *Ann NY Acad Sci* (771):313–326
- Palkovits M, Baffi JS, Pacak K 1997 Stress-induced Fos-like immunoreactivity in the pons and the medulla oblongata of rats. *Stress* (1):155-168

- Palkovits M. 1999, Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol.* 20(4):270-95.
- Paxinos, G & Watson, C. (1997) *The rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* Aug;14(3):149-67.
- Pi XJ, Grattan DR. 1998 Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 15;59(1):1-12.
- Pi XJ, Grattan DR. 1998 Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J Comp Neurol.* 18;394(4):462-74.
- Pi X, Grattan DR. 1999. Expression of prolactin receptor mRNA is increased in the preoptic area of lactating rats. *Endocrine.* 11(1):91-8.
- Popeski N, Amir S, Diorio J, Woodside B. 2003. Prolactin and oxytocin interaction in the paraventricular and supraoptic nuclei: effects on oxytocin mRNA and nitric oxide synthase. *J Neuroendocrinol* (15):687-696
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 15;47(4):379-91.
- Powers CA, Hatala MA. 1990 Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: in vitro reaction requirements and cleavage sites, and detection of processed prolactin in vivo. *Endocrinology* 127(4):1916-27.
- Roky R, Paut-Pagano L, Goffin V, Kitahama K, Valatx JL, Kelly PA, Jouvét M. 1996 Distribution of prolactin receptors in the rat forebrain. Immunohistochemical study. *Neuroendocrinology.* 63(5):422-9.
- Sandi C, Venero C, Cordero M. 2001. Estrés, memoria y trastornos asociados. 1ª edición, edit. Ariel. Madrid, España

- Sauve D, Woodside B. 2000 Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res.*23;868(2):306-14.
- Sawchenko PE, Swanson LW. 1983. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol.* 1;218(2):121-44
- Sawchenko PE, Imaki T, Vale W. 1992. Co-localization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus. *Ciba Found Symp.* (168):16-30.
- Schachter BS, Durgerian S, Harlan RE, Pfaff DW, Shivers BD.1984, Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. *Endocrinology.* 114(5):1947-9.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science.* 299(5603):117-20.
- Shiu RP, Elsholtz HP, Tanaka T, Friesen HG, Gout PW, Beer CT, Noble RL. 1983. Receptor-mediated mitogenic action of prolactin in a rat lymphoma cell line. *Endocrinology.* 113(1):159-65.
- Siaud P, Manzoni O, Balmefrezol M, Barbanel G, Assenmacher I, Alonso G. 1989. The organization of prolactin-like-immunoreactive neurons in the rat central nervous system. Light- and electron-microscopic immunocytochemical studies. *Cell Tissue Res.* 255(1):107-15.
- Sinha YN. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev.* 16(3):354-69.
- Swanson LW, Sawchenko PE. 1983. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neuroscience* (6):269-324.
- Thoman EB, Conner RL, Levine S. 1970. Lactation suppresses adrenal corticosteroid activity and aggressiveness in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 70(3):364-9.
- Torner L, Nava G, Duenas Z, Corbacho A, Mejia S, Lopez F, Cajero M, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 1999. Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J Endocrinol.* 161(3):423-32.

- Torner L, Toschi N, Nava G, Clapp C, Neumann ID. 2002. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neuroscience* 15,(8) :1381-9
- Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID. 2001. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neuroscience* 21, (9): 3207-14
- Torner L, Neumann ID. 2002. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress.* (4):249-57.
- Torner L, Maloumy R, Nava G, Aranda J, Clapp C, Neumann ID. 2004. In vivo release and gene upregulation of brain prolactin in response to physiological stimuli. *Eur J Neurosci.* 19(6):1601-8.
- Toubreau G, Desclin J, Parmentier M, Pasteels JL. 1979. Cellular localization of a prolactin-like antigen in the rat brain. *J Endocrinol.* 83(2):261-6.
- Tsigos C, Chrousos GP. 2002 Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 53(4):865-71.
- Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI.1987. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* (5):1846-50
- Witcher JA, Freeman ME.1985 The proestrous surge of prolactin enhances sexual receptivity in the rat. *Biol Reprod.* 32(4):834-9.
- Whitacre C. 2001. Sex differences in autoimmune disease. *Nature* 2,(9): 777-80
- Wilson DM 3rd, Emanuele NV, Jurgens JK, Kelley MR.1992. Prolactin message in brain and pituitary of adult male rats is identical: PCR cloning and sequencing of hypothalamic prolactin cDNA from intact and hypophysectomized adult male rats. *Endocrinology.* 131(5):2488-90.
- Windle R, Brady M, Kunanandam , Da Costa A, Wilson B, Harbuz M, Lightman S, Ingram C. 1997. Reduced response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to alpha1-agonist stimulation during lactation. *Endocrinology* 138, (9) : 3741-3748

- Wotjak C, Kubota M, Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Neumann I, Landgraf R. 1996. Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating. *J Neurosci* 16:23 7725-7732
- Wotjak C, Naruo T, Muraoka S, Simchen R, Landgraf R, Engelmann M. 2001. Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* (13): 2273-2281
- Yu-Lee LY, Luo G, Book ML, Morris SM. 1998. Lactogenic hormone signal transduction. *Biol Reprod.* 58(2):295-301.
- Yu_Lee LY. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* (57): 435-55
- Zamorano Rojas Heidi M. 2003. Expresión de factores transcripcionales en estructuras subcorticales durante la adquisición y evocación de condicionamientos aversivos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. pp. 35- 37
- Zhice X. Calvario G, Day L, Jiaming Y, Ross M. 2000. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (279): 1207-1215

15. APENDICE

PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

Para cuantificar la expresión del mensajero de PRL, se realizó mediante el registro de la fluorescencia generada por el reactivo fluorescente SYBR Green® I (Qiagen) que se integra en las cadenas del DNA sintetizado (cDNA) durante la amplificación.

La reacción de PCR puede describirse como una fase inicial de ruido que es seguida por un crecimiento exponencial del producto de amplificación o fase logarítmica que empieza cuando se acumuló suficiente producto como para ser detectado y finalmente se produce una curva asintótica. La cuantificación del producto se realiza en la fase inicial del crecimiento exponencial que presenta una relación inversa puesto que a mayor cantidad de copias de DNA o producto de amplificación, menor número de ciclos se requieren para que se alcance un nivel de amplificación determinado.

Para construir la curva de estandarización se determina el número de ciclos que requirió cada estándar para alcanzar un nivel de fluorescencia que teóricamente representa la misma cantidad de producto de la PCR en todas las diluciones, con esta información se construye una curva de estandarización mediante una regresión lineal.

Cuantificación de la expresión de PRL en núcleos aislados del hipotálamo.

Cómo ya se describió en la metodología, se realizó el análisis de la expresión del RNA mensajero de PRL en núcleos aislados del hipotálamo. En la figura 9 se muestra la amplificación de muestras independientes de núcleos supraópticos de 5 animales control y de 5 animales estresados.

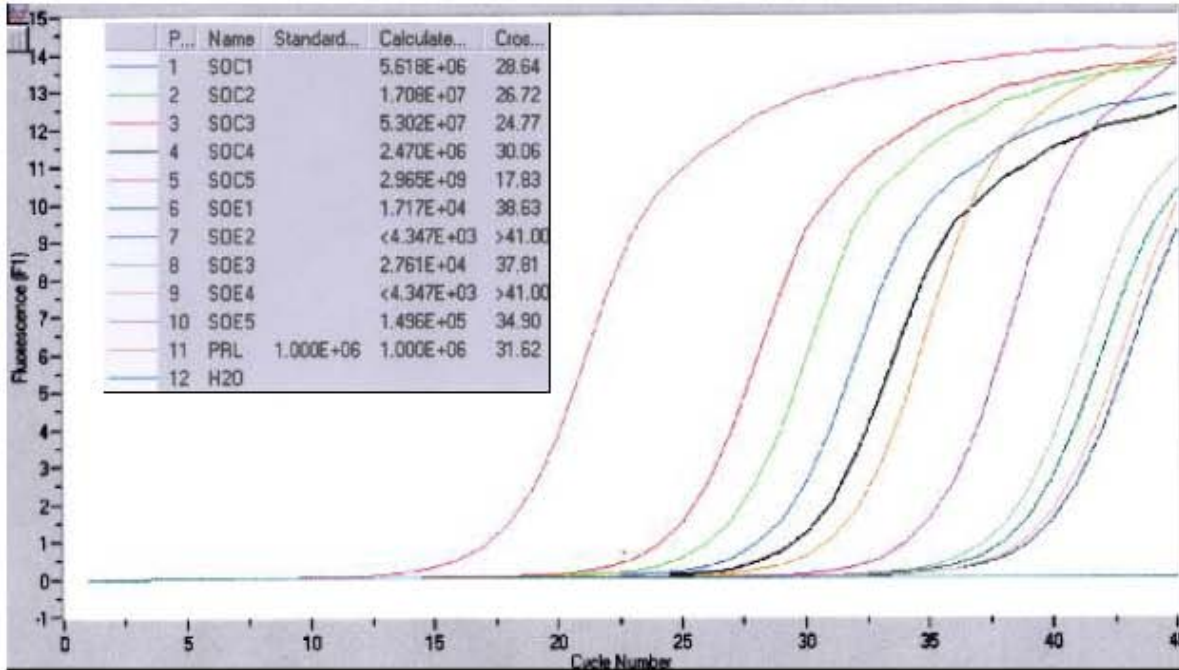


Figura 9. Curva de amplificación de PRL en el núcleo supraóptico del hipotálamo.

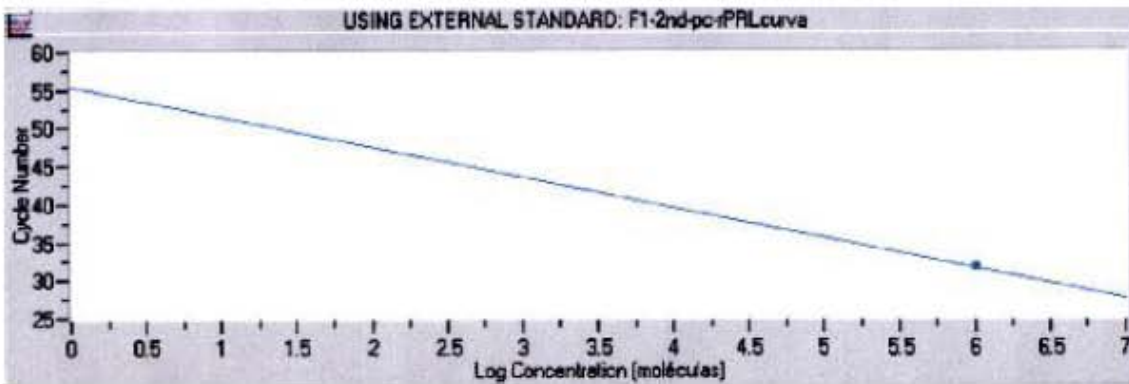


Figura 10. Se observa en la regresión lineal que el estándar utilizado se ajusta a la curva de estandarización.

De igual manera se cuantificó el gen reportero de β -actina, en la figura 11 se muestra la curva de amplificación (A) y su regresión lineal (B).

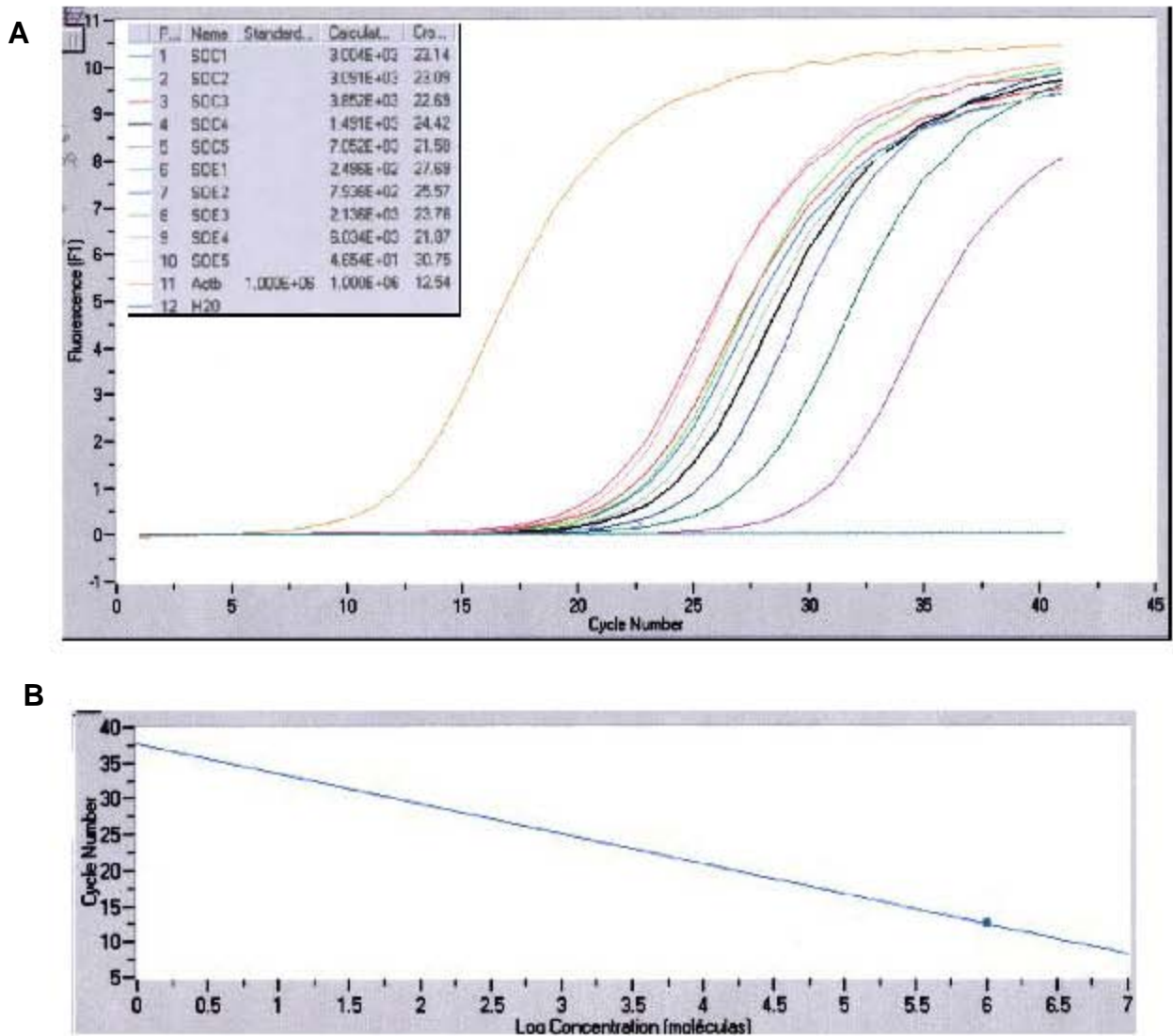
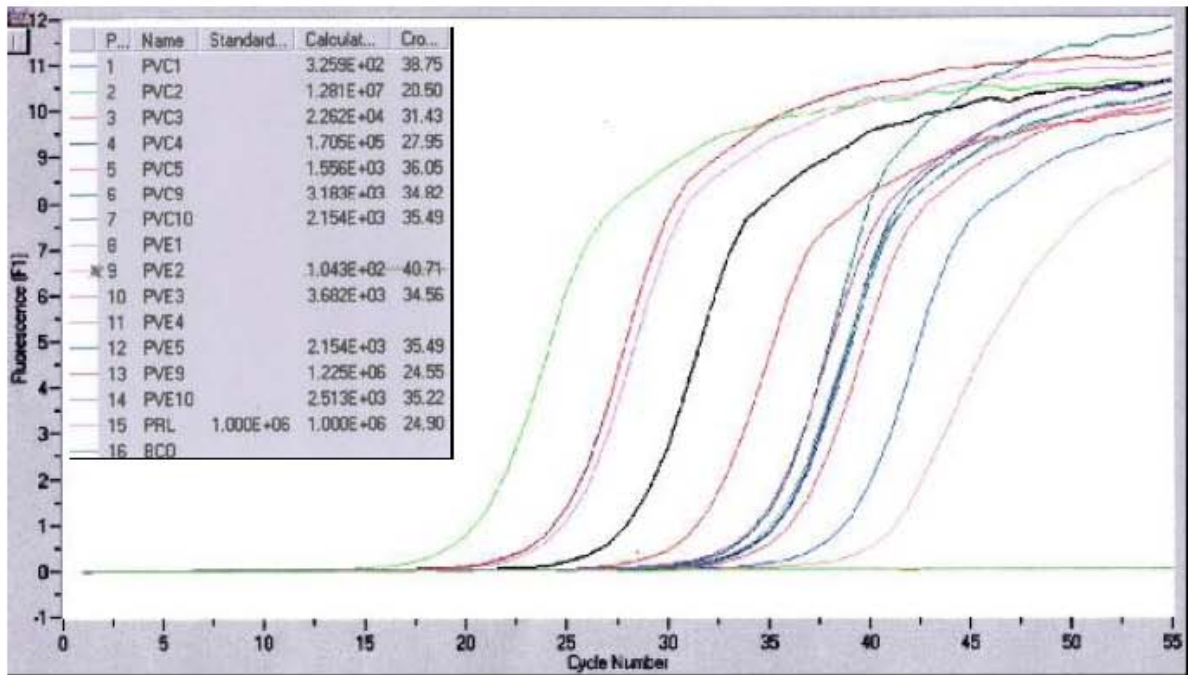


Figura 11. Curva de cuantificación de la β -actina de núcleos supraópticos aislados de manera independiente de 5 animales control y 5 animales estresados. **(A)** Gráfica de la curva de amplificación y **(B)** regresión lineal, donde se observa que el estándar de 10^6 copias de RNA mensajero se ajusta a la curva estándar realizada previamente.

De igual manera se realizó la cuantificación para el núcleo paraventricular del hipotálamo, en la figura 12 se muestra un caso representativo de la cuantificación del RNA mensajero de PRL en el NPV en animales control y en animales estresados **(A)**, así como la regresión lineal de la curva de cuantificación **(B)**, de manera similar en la

figura 13 se observa la cuantificación de β -actina (A) así como su regresión lineal (B) en los núcleos paraventriculares aislados.

A



B

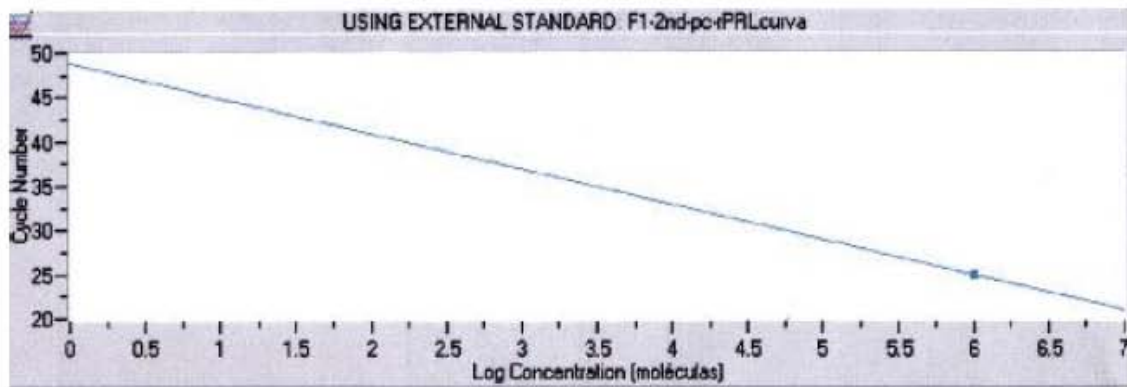


Figura 12. (A) Gráfica de la curva de amplificación de PRL (B) regresión lineal.

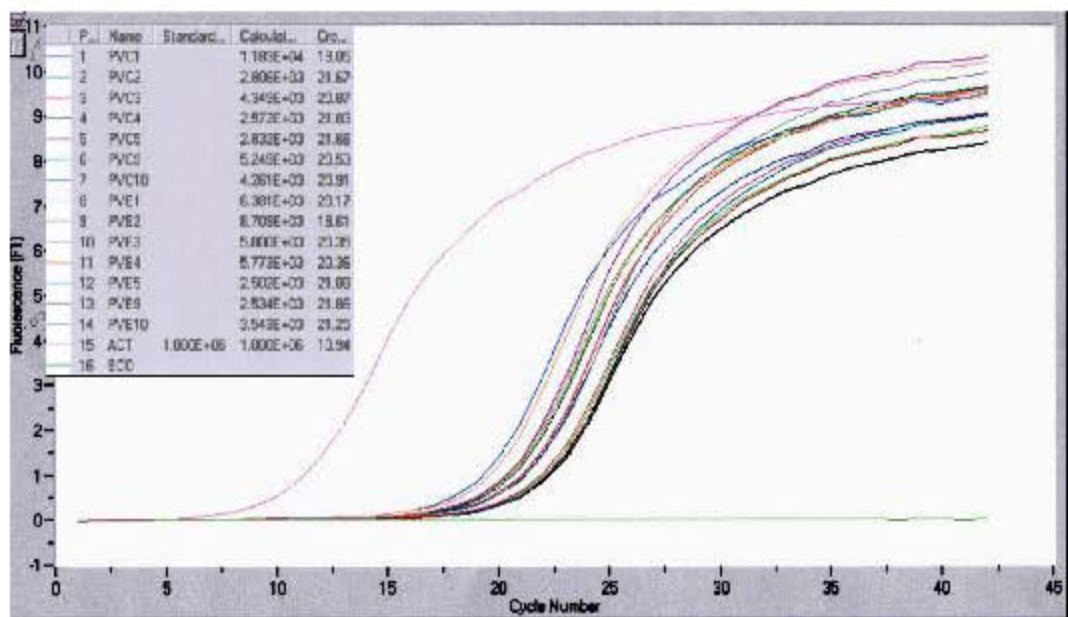
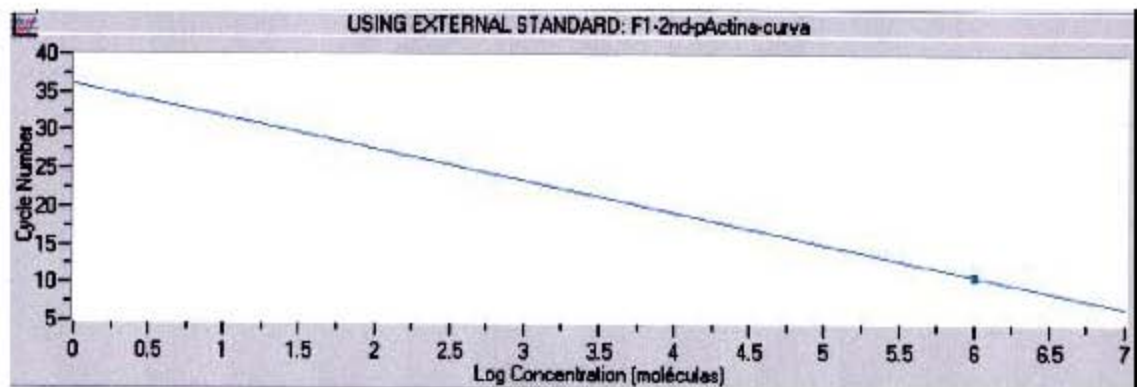
A**B**

Figura 13. (A) Gráfica de la curva de amplificación de β -actina en los núcleos paraventriculares aislados de animales control y animales estresados (B) regresión lineal.