



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
CAMPUS JURQUILLA**

---

---

**PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN  
EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO DE RATAS  
LACTANTES.**

*Tesis que presenta la*

*Lic. en Biología Nela Monasterio Ramírez*

*como requisito para obtener el grado de*

**Maestro en Ciencias (Neurobiología)**

Tutora

**Dra. María Teresa Morales Guzmán**

Comité tutor

**Dr. Carlos Valverde Rodríguez**

**Dra. Rosa María Uribe Villegas**

Juriquilla, Querétaro, Septiembre 2007

---

---



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.

Esta tesis fue dirigida por la Dra. María Teresa Morales Guzmán, y se realizó en el Laboratorio de Fisiología del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Se contó con el apoyo técnico de la Biol. María Eurgenia Ramos Aguilar, Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, M en C. Leonor Casanova Rico y la Lic. María de Lourdes Lara Ayala

# Índice

|          |   |               |
|----------|---|---------------|
| <b>1</b> | <b><i>Introducción</i></b>                      | <i>Pág. 1</i> |
| <b>2</b> | <b><i>Antecedentes</i></b>                      |               |
| 2.1      | <i>Estrés.- conceptos relacionados</i>          | 4             |
| 2.2      | <i>Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HPA)</i>   | 6             |
| 2.2.1    | <i>Respuesta neuroendocrina al estrés</i>       | 6             |
| 2.2.2    | <i>Núcleo paraventricular del hipotálamo</i>    | 8             |
| 2.3      | <i>Modelos experimentales de estrés</i>         | 11            |
| 2.3.1    | <i>Estrés Inmunológico</i>                      | 13            |
| 2.4      | <i>Lactancia</i>                                | 15            |
| 2.4.1    | <i>Neurobiología de la lactancia</i>            | 17            |
| 2.4.2    | <i>Respuesta al estrés durante la lactancia</i> | 20            |
| 2.5      | <i>Óxido nítrico</i>                            | 23            |
| 2.5.1    | <i>nNOS y hormonas gonadales</i>                | 28            |
| 2.5.2    | <i>Lactancia y óxido nítrico</i>                | 28            |
| 2.5.3    | <i>Óxido nítrico y estrés</i>                   | 29            |
| 2.5.4    | <i>Kainato y daño excitotóxico</i>              | 30            |
| <b>3</b> | <b><i>Planteamiento del problema</i></b>        | <b>31</b>     |
| <b>4</b> | <b><i>Hipótesis</i></b>                         | <b>32</b>     |
| <b>5</b> | <b><i>Objetivos</i></b>                         |               |
| 5.1      | <i>General</i>                                  | 33            |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 5.2      | <i>Particulares</i>  | 33 |
| <b>6</b> | <b><i>Estrategia experimental</i></b>  |    |
| 6.1      | <i>Diagrama experimental</i>   | 34 |
| <b>7</b> | <b><i>Materiales y métodos</i></b>   |    |
| 7.1      | <i>Animales</i>  | 35 |
| 7.2      | <i>Paradigmas experimentales</i>   | 35 |
| 7.3      | <i>Histología</i>  |    |
| 7.3.1    | <i>Perfusión y obtención de cortes</i>   | 36 |
| 7.3.2    | <i>Inmunohistoquímica</i>  | 36 |
| 7.3.3    | <i>Histoquímica para NADPH-d</i>   | 37 |
| 7.4      | <i>Determinación de nitratos y nitritos</i>  | 37 |
| 7.5      | <i>Cuantificación de corticosterona</i>  | 38 |
| 7.6      | <i>Procesamiento de imágenes</i>   | 39 |
| 7.7      | <i>Análisis estadístico</i>  | 39 |
| <b>8</b> | <b><i>Resultados</i></b>   |    |
| 8.1      | <i>Expresión de Fos y NADPH-d</i>  |    |
| 8.1.1    | <i>Expresión de Fos en el PVH inducida<br/>por la administración de clara de huevo</i> | 40 |
| 8.1.2    | <i>Expresión de Fos en el PVH inducida<br/>por la administración de ácido kaínico</i>  | 42 |
| 8.1.3    | <i>Determinación cuantitativa de la<br/>expresión de Fos en el PVH.</i>                | 44 |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 8.1.4     | <i>Expresión de NADPH en el PVH después de los tratamientos experimentales</i> | 47        |
| 8.2       | <i>Sintasas del óxido nítrico</i>  | 52        |
| 8.2.1     | <i>nNOS</i>  | 54        |
| 8.2.2     | <i>iNOS</i>  | 56        |
| 8.3       | <i>Nitritos y nitratos</i>   | 59        |
| 8.4       | <i>Corticosterona</i>  | 61        |
| <b>9</b>  | <b><i>Discusión</i></b>  | <b>63</b> |
| <b>10</b> | <b><i>Conclusiones</i></b>   | <b>75</b> |
| <b>11</b> | <b><i>Referencias</i></b>  | <b>76</b> |
| <b>12</b> | <b><i>Lista de abreviaturas</i></b>  | <b>87</b> |
| <b>13</b> | <b><i>Lista de tablas y figuras</i></b>  | <b>88</b> |
| 13.1      | <i>Índice de tablas</i>  | 90        |

## Resumen

Durante la lactancia, el cerebro materno pasa por una serie de adaptaciones específicas que le permiten contender con la demanda que representa esta función. Tales modificaciones incluyen el aumento en la expresión de las sintetasas del óxido nítrico (NOS) en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH), y una notable disminución de la respuesta neuroendocrina al estrés. En este trabajo, investigamos la respuesta activacional por medio de la expresión de Fos en el PVH de ratas lactantes, inducida por un reto inmune por ovoalbúmina (OVO) o un reto excitotóxico por ácido kaínico (KA), en comparación con ratas en diestro o ovariectomizadas (OVX); y exploramos la posibilidad de que tales estímulos modifiquen la expresión de NOS en el PVH. La mayor respuesta activacional inducida por KA en el PVH se observó en ratas en diestro, mientras que la mayor activación inducida por OVO fue en el PVH de ratas OVX. En las hembras lactantes los estímulos utilizados no provocaron cambios de activación. La detección de indicadores de NO, NADPH-d y nNOS, se localizó principalmente en la región parvocelular del PVH de las madres lactantes ante ambos retos. No se detectó la expresión de iNOS ante ninguno de los retos evaluados en ningún animal. Estos resultados confirman que durante la lactancia disminuye la respuesta de activación al estrés en el PVH en los modelos experimentales utilizados en este estudio, y muestran que el aumento de nNOS está influido por la naturaleza del reto y del estado hormonal.

## Abstract

Lactation is the final phase of the female reproductive cycle, characterized by specific adaptative changes in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA), such as the increased nitric oxide synthase (NOS) expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH), and a decreased typical neuroendocrine stress response of the HPA axis. The possibility that NOS signal in the PVH could be augmented over and above the basal-increased level of lactation was explored by giving the rats an immune challenge, and compared against excitotoxicity, a well known stimulus that induce NOS expression. Also, the influence of the hormonal state, and the type of NOS involved in the PVH response were determined. Fos and NOS expression was induced by a single injection of either Kainic acid (KA) or diluted ovoalbumin (OV) to lactating, ovariectomized (OVX) or rats in diestrus. Immunohistological detection showed an increased activational response in the PVH of rats at diestrus following KA, whereas higher response to OV was observed in OVX rats. In lactating rats, neither KA nor OV induced significant activation in the PVH. An increased of NADPH-d staining, was detected in the parvocellular-PVH of lactating rats after OV and KA treatment. Immunodetection for nNOS but not for iNOS was localized in the same PVH region where label for NADPH-d was detected. Present results confirm that the PVH response to stress is affected by the reproductive condition, and show that both, excitotoxicity or physiological stress, differentially increase nNOS depending on the hormonal status of the animal.



## 1 Introducción

La lactancia es la característica fisiológica más distintiva de los mamíferos y, salvo para los humanos, es esencial para el éxito reproductivo de la especie. Incluso, es de la función de las glándulas mamarias, de dónde deriva el nombre del taxa, *Mammalia* (McKenna y Bell, 1997). En los mamíferos, las adaptaciones necesarias para la lactancia, comienzan desde el embarazo como modificaciones de los componentes del sistema nervioso y reproductor de las hembras. A pesar de la importancia evolutiva de la lactancia, nuestro conocimiento acerca de las consecuencias fisiológicas y conductuales de este proceso para las hembras sigue siendo notablemente reducido.

En el caso de los humanos, se conoce y es ampliamente aceptado que la lactancia satisface todos los requerimientos nutricionales e inmunológicos para los infantes, no obstante, sólo hasta fechas recientes se ha reconocido la importancia que tiene la lactancia sobre la conducta y fisiología de la madre. Por ejemplo, hasta inicios de este siglo muchas culturas seguían utilizando el prolongar la lactancia como un método anticonceptivo dado que, durante esta fase del ciclo reproductivo, la ovulación se suspende. Sin embargo, ya que actualmente los patrones de lactancia en las mujeres han cambiado, también así su efectividad como método anticonceptivo. De cualquier manera, la suspensión de la ovulación durante esta fase, es un claro ejemplo de la influencia que ejerce el sistema neuroendocrino que controla la lactancia, sobre la fisiología general de la madre.

La capacidad para secretar leche se adquiere al final de la gestación y progresa durante la lactancia. Después del parto, la secreción láctea aumenta hasta su nivel más alto y va declinando progresivamente con el tiempo. Inicialmente, se demostró con estudios experimentales en ovejas, conejas y ratas, que las hormonas secretadas por la hipófisis son esenciales para la lactancia. Pero, ahora se conoce que el crecimiento

de las glándulas mamarias, la secreción y la evacuación láctea son producto de una compleja interacción entre el sistema nervioso y las hormonas: oxitocina (OT), prolactina (PRL), glucocorticoides (GC), adrenocorticotropina (ACTH), estrógenos (E2), progesterona (P), hormona de crecimiento, hormonas tiroideas e insulina, que en conjunto se denominan complejo hormonal galactopoiético (Mepham, 1987; Stern y Lonstein, 2001).

Después de décadas de investigación sobre los efectos fisiológicos de las hormonas, los estudios recientes han indicado que éstas participan en otras funciones del sistema nervioso que son importantes en la regulación de la conducta. A partir de uno de los trabajos pioneros de neurociencias cognoscitivas en ratas, se demostró que la OT, que induce las contracciones uterinas durante el parto y evacuación láctea durante la lactancia, también participa en la regulación general de la conducta materna y, en particular, en el aprendizaje y la memoria. Subsecuentemente, varios estudios en animales han mostrado que la OT, además de su papel durante el parto y la lactancia, contribuye a la manifestación de la conducta sexual, la construcción de vínculos afectivos, la conducta materna, el desempeño cognitivo y el estrés (Carter y Lightman, 1987; Theodosis y Poulain, 2001; Windle y col., 2006; Brunton y col., 2006).

Las fluctuaciones hormonales que ocurren durante el embarazo y la lactancia remodelan el cerebro femenino, aumentando el tamaño de las neuronas en algunas áreas y generando cambios estructurales o funcionales en otras. Una de las modificaciones importantes es la disminución en la respuesta neuroendocrina al estrés y la ansiedad, donde la OT y la PRL pueden tener acciones ansiolíticas. Este fenómeno, junto con otras adaptaciones del cerebro materno garantizan la capacidad de la madre para sobrellevar con éxito las demandas establecidas por la lactancia y por situaciones adversas (Russell y col., 2001).

El uso del término estrés se ha popularizado sin que la mayoría de las personas tengan claro en qué consiste el mismo. Al respecto, se encuentran una multitud de definiciones, algunas de las cuales lo abordan indistintamente desde la perspectiva del estrés como estímulo, como respuesta o como consecuencia. Sin entrar a polemizar teóricamente sobre su definición por no constituir el objeto del presente trabajo, se aborda el estrés como: la respuesta adaptativa del organismo ante los diversos estresores (Selye, 1936). La respuesta al estrés, es una respuesta automática del organismo a cualquier cambio ambiental, externo o interno, mediante la cual se prepara para hacer frente a las posibles demandas que se generen como consecuencia de la nueva situación. Estas reacciones permiten evitar el peligro, por lo que a corto plazo, son benéficas. Pero, si la situación persiste, la fatiga resultante será nociva para la salud general del organismo. Actualmente, la respuesta al estrés prolongada o inadecuada, se ha asociado con diversos padecimientos humanos, que si bien no llevan inmediatamente al individuo a la muerte, sí menoscaban su nivel de vida. Por ello, existe la creciente necesidad por entender su etiología y patogénesis, así como de generar un tratamiento adecuado de los padecimientos relacionados con el estrés, para lo que se requiere de nuevas investigaciones que lleven a conocer los mecanismos neurobiológicos que subyacen al estrés. Dentro de este contexto, una de las preguntas fundamentales en la investigación acerca del estrés es: ¿cómo los productos derivados de la respuesta al estrés pueden cambiar sus acciones de protección a daño?

Bajo esta pauta, las respuestas aún permanecen incompletas. Por consiguiente, se necesitan paradigmas de investigación diferentes, que aborden la respuesta al estrés y sus consecuencias, desde nuevas perspectivas. En este sentido, la lactancia ofrece un modelo de investigación en donde la respuesta al estrés está naturalmente atenuada, con lo cual se puede tener una aproximación a la fisiología del estrés a partir de las propiedades intrínsecas de los organismos en una situación endócrina y de estimulación sensorial particular. Esto resulta conceptualmente atractivo, ya que, sin lugar a dudas, el mecanismo más eficaz para modular la respuesta al estrés o lograr que ésta no llegue a tener consecuencias negativas, sería el que los propios organismos producen.

Por ello, la finalidad principal de esta tesis es investigar algunas de las modificaciones que ocurren en el cerebro de la madre durante la lactancia ante situaciones adversas, como el estrés fisiológico o el daño excitotóxico. Así como explorar el papel que tiene el neuromodulador gaseoso óxido nítrico, durante la respuesta neuroendocrina al estrés en el cerebro de la rata lactante.

## **2. Antecedentes**

### ***2.1 Estrés.- Conceptos relacionados***

La supervivencia de los organismos depende de su capacidad para mantener su homeostasis, lo cual implica un equilibrio complejo, dinámico y armonioso entre su medio interno y el ambiente externo. Este equilibrio se ve constantemente comprometido o amenazado por factores que lo alteran y modifican. Cuando alguno de estos factores aleja al organismo de su homeostasis, éste tiene que reaccionar activamente a través de respuestas adaptativas; las cuales deben llevarlo a la preservación o al restablecimiento de la estabilidad fisiológica (Rabin, 1999). Así, la capacidad de responder o adaptarse a un estímulo adverso contribuye a la protección del organismo. Los sistemas encargados de tales adaptaciones son; el nervioso autónomo, el cardiovascular, el metabólico y el inmunológico y, de particular importancia, el eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (eje HPA). Este proceso de mantenimiento de la estabilidad a través de variaciones, referido como alostasis, es un componente esencial para mantener la homeostasis, ya que promueve la adaptación y ayuda al organismo a contender con el estímulo estresante o estresor (McEwen, 1998). Cuando el estímulo, persiste o se intensifica, y el equilibrio no puede ser restablecido por ajustes fisiológicos o por cambios de comportamiento inmediatos, se produce una reacción de alarma en el organismo que se denomina respuesta al estrés (Schedlowski y Tewes, 1999). Durante la década de 1930, el fisiólogo Hans Selye introdujo el término “estrés” para definir: el estado fisiopatológico, asociado con cambios fisiológicos específicos que pueden ser inducidos por diversos estímulos físicos y psicológicos (Selye, 1936). Sin embargo, el estrés es un concepto amplio y complejo, que ha sido sujeto a diversas descripciones sin haberse llegado hasta la fecha a un consenso en cuanto a su definición.

La respuesta al estrés implica una amplia y coordinada gama de procesos, que comienza con la activación del sistema nervioso central y periférico, el eje HPA, secreciones hormonales y respuestas quimio-celulares (da Costa y col., 1996), además

de respuestas conductuales como la ansiedad, el miedo y la ira (Tsigos y Chrousos, 2002). Las reacciones iniciales ante un estímulo estresante, usualmente se traducen en el incremento de la presión sanguínea y del ritmo cardiaco, así como en el aumento de niveles circulantes de las hormonas reactivas al estrés; catecolaminas, hormona liberadora de corticotropina (CRH), corticosterona (CORT), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), oxitocina (OT), prolactina (PRL), entre otras (Douglas, 2005; Rabin, 1999; Morales y Sawchenko, 2003).

Sin embargo, esta respuesta al estrés varía en función de la duración y/o frecuencia del estímulo estresante, cuando éste es agudo, el organismo logra hacer frente a la demanda de manera inmediata, a través de sus respuestas adaptativas esenciales, y regresa en breve al equilibrio. Por otro lado, cuando un organismo es sometido en forma prolongada a un estímulo estresante, si bien prosigue su adaptación a dichas demandas de manera progresiva, puede ocurrir que disminuya su capacidad de respuesta debido a la fatiga que se produce y esto lo conduzca a un estado de deterioro con pérdida importante de las capacidades fisiológicas (Pacák y Palkovits, 2001; Sapolsky, 1994). Los individuos reaccionan ante el estímulo estresante con un complejo repertorio de respuestas adaptativas, que cuando son inadecuadas, excesivas o prolongadas, altera la fisiología y el comportamiento normales, lo que puede dejar al organismo vulnerable a desórdenes endócrinos, neurológicos, cardiovasculares, neoplásicos o inmunológicos, entre otros (Charmandari y col., 2005; Grange-Messent y col., 2004).

## ***2.2 Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HPA)***

### ***2.2.1 Respuesta neuroendocrina al estrés***

El hipotálamo es la vía común final por la que el sistema nervioso ejerce control sobre el sistema endocrino. El eje HPA constituye una unidad anatómica y funcional que regula procesos vitales como el balance hídrico, el control de la alimentación y el metabolismo. Una de sus funciones más importantes es la de responder a diversos

estímulos estresantes para restablecer la homeostasis, ya que tiene un papel crítico en la adaptación a tales retos (Rabin, 1999). La respuesta al estrés se genera mediante la liberación de CRH en el hipotálamo, el principal regulador del eje HPA al estimular la secreción de ACTH de la hipófisis anterior. Ante un estímulo estresante, CRH y por consiguiente ACTH, se liberan de manera exacerbada. A nivel del hipotálamo, existe una interacción recíproca entre CRH y vasopresina (VP), donde cada neuropéptido estimula la liberación del otro. En condiciones basales VP y CRH son secretadas al sistema porta de manera circádica y pulsátil (Tsigos y Chrousos, 2002; Charmandari y col., 2005), y ambos funcionan como secretagogos de ACTH. Por su parte, ACTH estimula, en la corteza de la glándula adrenal, la secreción de esteroides catabólicos a la circulación como los glucocorticoides (GC). EL nivel de GC es la señal que se encarga de orquestar las respuestas de todo el organismo para restablecer su homeostasis, ya que actúan sobre numerosos órganos, incluido el cerebro, para modular la fisiología y la conducta (Sapolsky y col., 2000).

En condiciones basales, la secreción de los glucocorticoides es regulada por el cerebro, casi exclusivamente, por un pequeño número de neuronas que residen en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH, por sus siglas en inglés) y cuya identidad química principal es la de CRH y VP. En el PVH se encuentran neuronas que proveen la triada de eferencias (eminencia media, la hipófisis posterior y centros autonómicos en tallo cerebral y médula espinal), que juntas dirigen (Sawchenko y col., 1996; Palkovits, 1999) las acciones consecuentes de los corticotropos de la adenohipófisis y de la corteza adrenal (Herman y col., 2002).

La secreción de CRH es pulsátil, aumenta por la mañana, lo que resulta de manera inicial en la amplitud de la secreción de ACTH y CORT. Las variaciones diurnas de ACTH y CORT son frecuentemente perturbadas por cambios de luz, horarios de alimentación y ritmos de actividad, así como por estrés. Durante el estrés agudo, hay un incremento en la amplitud y sincronización de la liberación de CRH y VP desde el PVH, hacia el sistema de circulación porta hipotálamo-hipofisario (Charmandari y col.,

2005). Además, dependiendo del estímulo estresante, otros factores, tales como angiotensina II, citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés), interleucinas: IL-1 $\alpha$  y  $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 e interferones, que participan como mediadores de la inflamación, son secretadas y actúan sobre los componentes hipotalámicos, hipofisarios y/o adrenal del eje HPA aumentando su activación (Rivest, 2001; Charmandari y col., 2005). Los glucocorticoides juegan un papel muy importante en la regulación de la actividad basal del eje HPA. Estos esteroides son importantes para la terminación de la respuesta al estrés incidiendo en los centros extrahipotalámicos, en el hipotálamo y en la hipófisis. Por medio de la circulación, llegan al cerebro y regulan de manera negativa la síntesis y secreción de CRH en el hipotálamo y de ACTH en la adenohipófisis (Rivest, 2001; Herman y col., 2002; Tsigos y Chrousos, 2002; Charmandari y col., 2005).

Además, existen evidencias experimentales obtenidas con métodos de lesión o con trazadores neuronales que sugieren la existencia de una importante red de estímulos excitadores que dirige la respuesta al estrés en el eje HPA. Estos llegan al PVH provenientes de la médula oblonga y son mediados por noradrenalina (Sawchenko y Swanson, 1983; Nishioka y col., 1998; Douglas, 2005). La concentración de noradrenalina en el PVH se eleva durante la exposición al estrés debido a la disminución de la actividad de su enzima degradadora, la monoamina-oxidasa (Douglas, 2005). Además, la respuesta a estímulos estresantes, tales como el reto inmunológico, se pierde después de la destrucción de las aferencias noradrenérgicas del PVH, lo que indica que ésta es la principal vía de estimulación del eje HPA (Walker y col., 2001a). Aunque tanto el estrés psicológico como el físico reclutan células noradrenérgicas que se proyectan al PVH, la señal también debe activar neuronas del PVH-CRH indirectamente, a través de una vía de intra-señalización propia del PVH (Douglas, 2005).

### ***2.2.2 Núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH)***



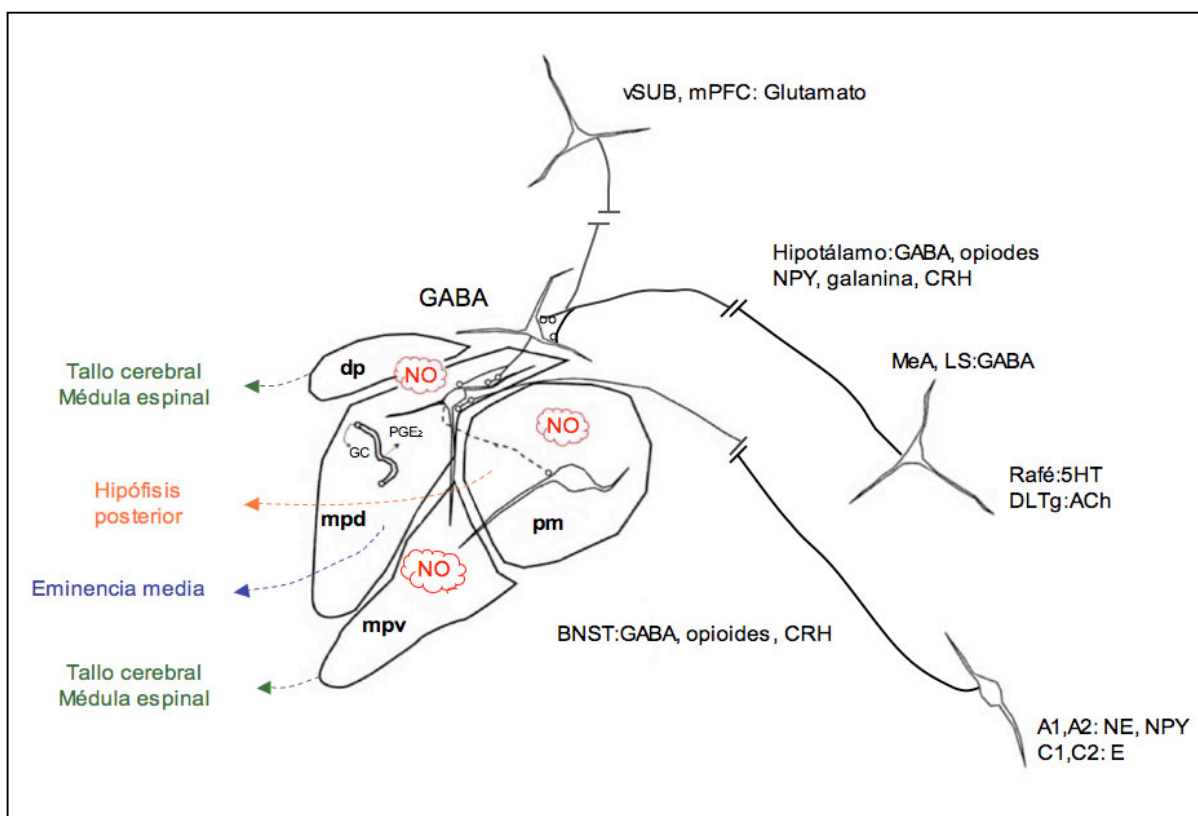
Entre los núcleos que conforman el hipotálamo, el PVH es una de las regiones críticas en el mantenimiento de la homeostasis y en la respuesta al estrés (Swanson y Sawchenko., 1983; Palkovits, 1999; Douglas, 2005; Buller, 2003). Este núcleo está localizado como una estructura par en ambos lados del tercer ventrículo en la base del cerebro. Morfológicamente, el PVH se divide en dos regiones celulares, parvocelular y magnocelular, denominadas así por el tamaño de sus somas neuronales (Figura 1). A su vez estas regiones se han subdividido, con base en su citoarquitectura, conectividad y fenotipo neural, de la siguiente manera: neuronas magnocelulares, en la región posterior del PVH (pm), liberan VP y OT directamente a la circulación sistémica desde el lóbulo posterior de la hipófisis. Estas hormonas controlan el balance hídrico, la presión sanguínea, la lactancia y el parto. Las neuronas de la región dorsal parvocelular (dp) y ventro-medial parvocelular (mpv), expresan somatostatina, CRH, OT y VP, envían sus proyecciones hacia el tallo cerebral y a la médula espinal, ejerciendo control directamente sobre el sistema nervioso autónomo. Finalmente, las neuronas de la porción dorsomedial parvocelular (mpd), de las cuales un gran porcentaje expresan CRH, además de otros péptidos como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), neuropéptido Y (NPY), encefalinas (ENK, por sus siglas en inglés) y VP, envían sus proyecciones hacia la eminencia media (Swanson y Sawchenko, 1983; Sawchenko y col., 1992) (Figura 1). Entre estos neuropéptidos, el CRH actúa como el principal secretagogo de ACTH. El CRH es transportado por las proyecciones neuronales a la lámina externa de la eminencia media, donde es secretado hacia el sistema porta hipotálamo-hipofisario hasta alcanzar la hipófisis anterior, donde estimula la síntesis y liberación de ACTH hacia la periferia (Merchenthaler y col., 1982). El principal órgano blanco de la ACTH es la corteza de la glándula adrenal, donde estimula la secreción de glucocorticoides, cortisol en humanos y corticosterona en la rata. Los niveles elevados de glucocorticoides tienen efectos catabólicos importantes que resultan en la conversión de proteínas y glucógeno a glucosa en el músculo. También disminuyen la utilización celular de glucosa en los órganos y tejidos que no son necesarios en una situación de emergencia, aumentan la movilización de ácidos grasos y glicerol del tejido adiposo, por lo que aumenta su concentración en la sangre a favor de la síntesis de glucosa. Como resultado, los glucocorticoides mantienen la concentración de glucosa

en sangre necesaria para contender contra las demandas metabólicas que ejerce el estrés sobre el organismo (Sapolsky y col., 2000).

Además de las conexiones intranucleares, el PVH integra aferencias de centros superiores (corteza cerebral y sistema límbico) y recibe proyecciones catecolaminérgicas del tallo cerebral, de órganos circunventriculares y de áreas del sistema límbico, como el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), el septum, el hipocampo y la amígdala (Swanson y Sawchenko, 1983) (Figura 1).

| SUBDIVISIÓN                               | REFERENCIAS                         | FENOTIPO                      | FUNCIÓN   |
|---|-------------------------------------|-------------------------------|---|
| Parvocelular<br>Dorsal y<br>Ventre-medial | Tallo cerebral<br>Médula<br>espinal | CRH, VP, OT,<br>Somatostatina | Modulación del<br>sistema nervioso<br>autónomo.         |
| Parvocelular<br>Dorso-medial              | Eminencia<br>media                  | TRH, CRH,<br>NPY , ENK        | Secreción de<br>ACTH.                                   |
| Magnocelular<br>Posterior                 | Hipófisis<br>posterior              | PRL, OT. VP                   | Lactancia, parto,<br>antidiuresis,<br>presión arterial. |

**Tabla 1. Cuadro de las subdivisiones funcionales del PVH.** Se muestran las subdivisiones en las que se encuentra dividido el PVH, las regiones a las que envía sus proyecciones, el fenotipo celular y sus funciones mejor descritas para cada grupo celular (Modificado de: Swanson y Sawchenko, 1983).



**Figura 1. Diagrama de la microanatomía en el núcleo paraventricular del hipotálamo.**

Las neuronas parvocelulares en la región dorsolateral medial (mpd), reciben aferencias de grupos de neuronas del tallo cerebral: noradrenérgicas (A1 y A2), adrenérgicas (C1 y C2) y peptidérgicas. La información peptidérgica y GABAérgica se recibe de varios núcleos hipotalámicos, así como del lecho de la estría terminal (BNST) y de las neuronas en la periferia del PVH. En estas neuronas parvocelulares converge la información descendente que viene del sistema límbico [subiculum ventral (vSub), corteza prefrontal medial (mPFC) amígdala medial (MeA) y septum lateral (LS)], las aferencias colinérgicas (ACh) que provienen del núcleo tegmental dorsolateral (DLTg), así como información serotoninérgica (5HT) que llega del tallo cerebral. Las neuronas de mpd envían sus proyecciones principalmente hacia eminencia media, además extienden colaterales de sus axones hacia neuronas magnocelulares así como a las regiones parvocelulares dorsal (dp) y medial ventral (mpv). Las dendritas neuronales se ramifican a través de límites funcionales dentro del mismo núcleo. Las neuronas parvocelulares (dp y mpv) envían sus proyecciones a grupos de neuronas autonómicas en el tallo cerebral y la médula espinal. Las neuronas de la región magnocelular sintetizan principalmente OT y VP, y proyectan al lóbulo posterior de la hipófisis. Las neuronas del PVH también reciben información de señales circulantes en la sangre como glucocorticoides (GCs) y prostaglandinas (PGE2). Finalmente, las neuronas magnocelulares y parvocelulares pueden producir óxido nítrico (NO) y monóxido de carbono (CO<sub>2</sub>), los cuales actúan como neuromoduladores dentro del PVH (Modificado de: Herman y col., 2002).

### **2.3 Modelos experimentales de estrés**

Con la ventaja que ofrece la detección de genes de respuesta temprana como c-Fos, se ha estudiado experimentalmente la respuesta del PVH ante diferentes estímulos estresantes. Esto ha permitido determinar que los diversos tipos de estímulos estresantes generan diferentes patrones de actividad neuronal y utilizan diferentes vías neurales para el establecimiento de la respuesta neuroendocrina al estrés, tal como la activación de las células que producen CRH en el PVH (Charmandari y col., 2005; Sawchenko y col., 2000). Es común que para el estudio del estrés se definan dos grandes categorías de estímulos estresantes o estresores: a) estresor psicológico o neurogénico: estímulos que representan una situación potencialmente amenazante, como restricción de movimiento, choque eléctrico, ruido, estos estímulos llegan y se procesan en la corteza y el sistema límbico; y b) estresor físico o sistémico: estímulos que resultan en una alteración de los parámetros fisiológicos que son traducidos por un número reducido de receptores periféricos o centrales, y cuyo aspecto esencial no es percibido de manera consciente, tales como estrés cardiovascular, inmunológico y osmótico (Kovács y Sawchenko, 1996).

Acerca de las vías por las que viajan los estímulos estresantes prevalecen tres conceptos. El primero, es que hay una gran diversidad de vías que son específicas para el tipo de estímulo estresante que activan las neuronas CRH-positivas en el PVH, predominantemente a través de inervaciones GABAérgicas (Figura 1). Estas vías incluyen las aferencias aminérgicas del tallo cerebral, las cuales procesan estímulos sistémicos y psicológicos que requieren de estructuras en centros superiores. Las proyecciones GABAérgicas que provienen de regiones corticales y del sistema límbico modulan las conexiones intra-PVH, lo cual da a las neuronas la característica de responder específicamente a ciertos tipos de estímulos estresantes (Lasaga y col., 1998). Segundo, el PVH integra y modula una gran diversidad de señales neuroendocrinas a través de vías autonómicas y neuroendocrinas para orquestar la

activación adrenal. Tercero, las acciones promovidas por glucocorticoides tienen una gran diversidad sobre distintas áreas del cerebro. Por lo que el control de los glucocorticoides depende de la fase del pulso generador de CRH, de la naturaleza y la duración del estímulo aferente, así como de los mecanismos que subyacen el procesamiento del estímulo estresante (Sapolsky y col., 2000; Rabin, 1999).

En la actualidad existen una gran variedad de datos experimentales y clínicos que ponen de manifiesto que, dependiendo de su intensidad y duración, el estrés puede producir alteraciones considerables en muchas regiones del cerebro. Estas, incluyen desde modificaciones más o menos leves y reversibles, hasta situaciones en las que se produce muerte neuronal. Se sabe que el efecto perjudicial que puede producir el estrés está directamente relacionado con los niveles de glucocorticoides que son secretados en la respuesta fisiológica al estrés (McEwen, 1998; Sapolsky y col., 2000). Aunque la presencia de determinados niveles de estas hormonas son de gran importancia para la fisiología del organismo, el exceso de GC puede producir toda una serie de alteraciones a distintos niveles del organismo (Pacák y Palkovits, 2001; Buller, 2003). Numerosos trabajos experimentales, han establecido que la exposición continua o excesiva a las hormonas secretadas durante la respuesta al estrés puede causar tres tipos de efectos perjudiciales en el sistema nervioso: i) Atrofia dendrítica: es un proceso de retracción de las prolongaciones dendríticas, que se produce en ciertas neuronas. Siempre y cuando termine la situación de estrés, se puede producir recuperación de la arborización dendrítica, por tanto, puede ser un proceso reversible; ii) Neuroexcitotoxicidad; es un proceso que ocurre como consecuencia del mantenimiento sostenido de altos niveles de excitabilidad neuronal causada por un exceso de ácido glutámico (Glu) o GC, y causa la muerte neuronal; iii) Exacerbación de distintas situaciones de daño neuronal; este es otro mecanismo importante, por el cual, si al mismo tiempo que se produce agresión neural (apoplejía, anoxia, hipoglucemia), coexisten altos niveles de GCs, se reduce la capacidad de las neuronas para sobrevivir a dicha situación dañina (Sapolsky y col., 2000).

En general, estas categorizaciones proveen un marco de trabajo, acerca del control

central de la respuesta al estrés, sus vías de procesamiento y sus efectos específicos sobre grupos neuronales (Tsigos y Chrousos, 2002; Charmandari y col., 2005; Crane y col., 2005).

### **2.3 Estrés inmunológico**

La respuesta estereotipada al estrés involucra la activación de las vías catecolaminérgicas (adrenalina y noradrenalina) en el sistema nervioso central y periférico, así como la liberación de hormonas del eje HPA, en particular ACTH y glucocorticoides. Si el estímulo estresante incluye inflamación o infección, el sistema inmunológico también se activa. Aunque el sistema nervioso, el endocrino y el inmunológico pueden actuar de manera separada e independiente el uno del otro, el establecimiento de una respuesta al estrés viable, saludable y coordinada, requiere no sólo que se comuniquen entre sí, sino que además necesitan regular entre ellos su actividad (Buller, 2003; Rabin, 1999).

La regulación neuroendocrina de las diferentes fases de las respuestas inflamatoria e inmunológico, requieren un intercambio activo de señales entre las células del sistema inmunológico y los mecanismos que están directamente bajo el control del sistema nervioso. Este intercambio de información es particularmente relevante durante condiciones patológicas, en las cuales muchas funciones del organismo están alteradas, y a pesar de esto, el sistema inmunológico debe operar eficazmente. Se ha propuesto que las respuestas neuroendocrinas, mediadas por productos derivados del sistema inmunológico, son inducidas después de la activación de dicho sistema. Estas respuestas implican que el cerebro recibe información del sistema inmunológico y tiene la capacidad de responder a estas señales (Mc Ewen, 1998; Sapolsky, 1994).

Durante la fase aguda de la respuesta a un reto inmunológico, las citocinas pro-inflamatorias son liberadas por células del sistema inmunológico hacia la circulación y pueden desencadenar la activación del sistema nervioso central, ya sea a través de la

activación de neuronas sensoriales o por mecanismos humorales (Besedovsky y del Rey; 2002; Buller, 2003). En tanto que, en los procesos inmunológicos, las interacciones immuno-neuroendócrinas inician cuando el sistema inmunológico activado libera citocinas que, estimulan al sistema nervioso y a su vez responde a través de la liberación de hormonas y la activación de redes neuronales que controlan al mismo sistema inmunológico. De los diversos sistemas neuroendocrinos que regulan al sistema inmunológico, la participación del eje HPA ha sido una de las más estudiadas, por su particular importancia en el mantenimiento de la homeostasis. En este eje, las citocinas inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ ), como productos solubles del sistema inmunológico activado, estimulan la secreción hipotalámica de CRH y VP, los cuales inducirán la liberación de ACTH.

Numerosos estudios en los que se examinan la comunicación entre estos sistemas han investigado los mecanismos por lo cuales la administración aguda sistémica de la IL- $\beta$ , la IL-6 ó el TNF- $\alpha$ , estimula la liberación de ACTH a través de un mecanismo dependiente de CRH (Földes y col., 2000; Rivier, 2003). Esto se ha corroborado mediante anticuerpos específicos para CRH, los cuales anulan los efectos estimuladores de las señales inmunológicas. Incluso, los anticuerpos anti-VP también disminuyen la liberación de ACTH en respuesta a la administración de IL- $\beta$ , aunque con menor intensidad que cuando se bloquea CRH. Esto sugiere que la VP tiene un papel secundario en la respuesta ante un estímulo inmunológico. La activación de las neuronas del PVH, puede generarse a partir de la información que llega a través de sus aferencias o bien como efecto de la presencia de mensajeros intermediarios de la inflamación, como las prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) y las catecolaminas, los cuales son inducidos por la presencia de citocinas en la circulación que afectan las células de los órganos circunventriculares, las paredes de los ventrículos y la glía (Schiltz y Sawchenko, 2003). Sin embargo, por cualquiera que sea la vía de activación de las neuronas que producen VP y CRH, traerá como consecuencia, la producción de glucocorticoides (GC). A partir de lo cual, se genera uno de los efectos más importantes del estrés sobre el sistema inmunológico, que es el causar una re-distribución de las

células inmunológicas por el cuerpo, y movilización que es mediada en parte por GC (Buller, 2003). Las acciones de los GC sobre el sistema inmunológico son diversas. Las células del sistema inmunológico, son sensibles a la cantidad y duración del nivel circulante de GC, y una excesiva producción de éstos altera el metabolismo, la conducta, e induce inmunosupresión. Por el contrario, en dosis baja y transitoria, estimula el sistema inmunológico, como sucedería ante un estímulo estresante crónico o agudo. Las interacciones y una adecuada modulación entre estos tres sistemas es esencial para mantener la vida durante situaciones de estrés inmunológico (Sapolsky, 1994; Sapolsky y col., 2000).

## **2.4 Lactancia**

Las hembras de los mamíferos, desde los roedores hasta los humanos, pasan por importantes cambios fisiológicos y de comportamiento durante su ciclo reproductivo. Este ciclo comprende varias fases subsecuentes estrechamente relacionadas como son: el embarazo, el parto y la lactancia. La transición entre estas fases implica que lo que antes era un organismo dedicado a satisfacer sus propias necesidades metabólicas y ver por su supervivencia, ahora necesita adaptarse a las demandas de sus crías y redirigir todos sus recursos disponibles para procurar la supervivencia de la camada (Mephram, 1987; Kinsley y Lambert, 2006). Tales adaptaciones inician con el embarazo y finalizan con el destete, e inciden en la fisiología general de la madre, en particular, sobre aspectos del metabolismo, la regulación neuroendocrina, y la conducta materna (Carter y col., 2001; Russell y col., 2001; Neumann, 2001; Neumann y col., 2005).

Durante el embarazo, prevalecen niveles altos de estradiol ( $E_2$ ), progesterona (P), lactógeno placentario y PRL, que preparan a las glándulas mamarias para la lactancia. Después del parto inicia la lactancia como efecto de la disminución de las hormonas feto-placentarias, lo que deja a la hipófisis materna a merced de la retroalimentación positiva que ejerce la PRL a medida que su secreción aumenta. A partir de ese momento, la secreción de PRL y la secreción láctea dependen totalmente del estímulo



de la succión. La transferencia de leche a la camada se lleva a cabo mediante el proceso de evacuación láctea durante la succión, para la cual la OT es esencial. Este proceso representa el ejemplo clásico de reflejo neuroendocrino donde la estimulación dada por la succión es recibida por receptores específicos localizados en el pezón, estas señales son transmitidas por los nervios segmentarios al SNC, y de ahí son conducidas por la médula espinal y el tallo cerebral hasta el hipotálamo que es la vía final común de esta estimulación (Mepham, 1987; Russell y col., 2001). Como se mencionó antes, las neuronas oxitocinérgicas se localizan en el PVH y en respuesta a la succión, la OT se libera hacia la circulación para llegar a la glándula mamaria donde se une a receptores específicos de las células mioepiteliales para generar la contracción que origina la evacuación de la leche acumulada en la glándula mamaria (Wakerley y col., 1995). Otras respuestas neuroendócrinas dependientes de la succión incluyen la supresión de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), por lo cual se inhibe el ciclo ovárico. Además durante la lactancia se observa una reorganización de las redes neurales, en particular con las que están involucradas en mantener las demandas sobre el metabolismo y el balance hídrico de la madre (Russell y col., 2001).

En el caso particular de la lactancia, se hace una división en tres etapas subsecuentes y con características específicas en cuanto a las fluctuaciones en las concentraciones circulantes de PRL, OT,  $E_2$  y P. Con respecto a estas hormonas ováricas, el nivel circulante de  $E_2$  aumenta considerablemente al momento del parto (ovulación posparto), disminuye gradualmente en los días subsecuentes y se mantiene bajo durante la mayor parte de la lactancia (Lee y col., 1989). Los niveles de P se mantienen elevados gracias al mantenimiento del cuerpo lúteo durante la lactancia. Por su parte, la OT, que se incrementa para la inducción del parto, y la evacuación láctea, y al igual que PRL, mantiene niveles relativamente elevados durante el tiempo que el estímulo de la succión esté presente (Smith, 1981).

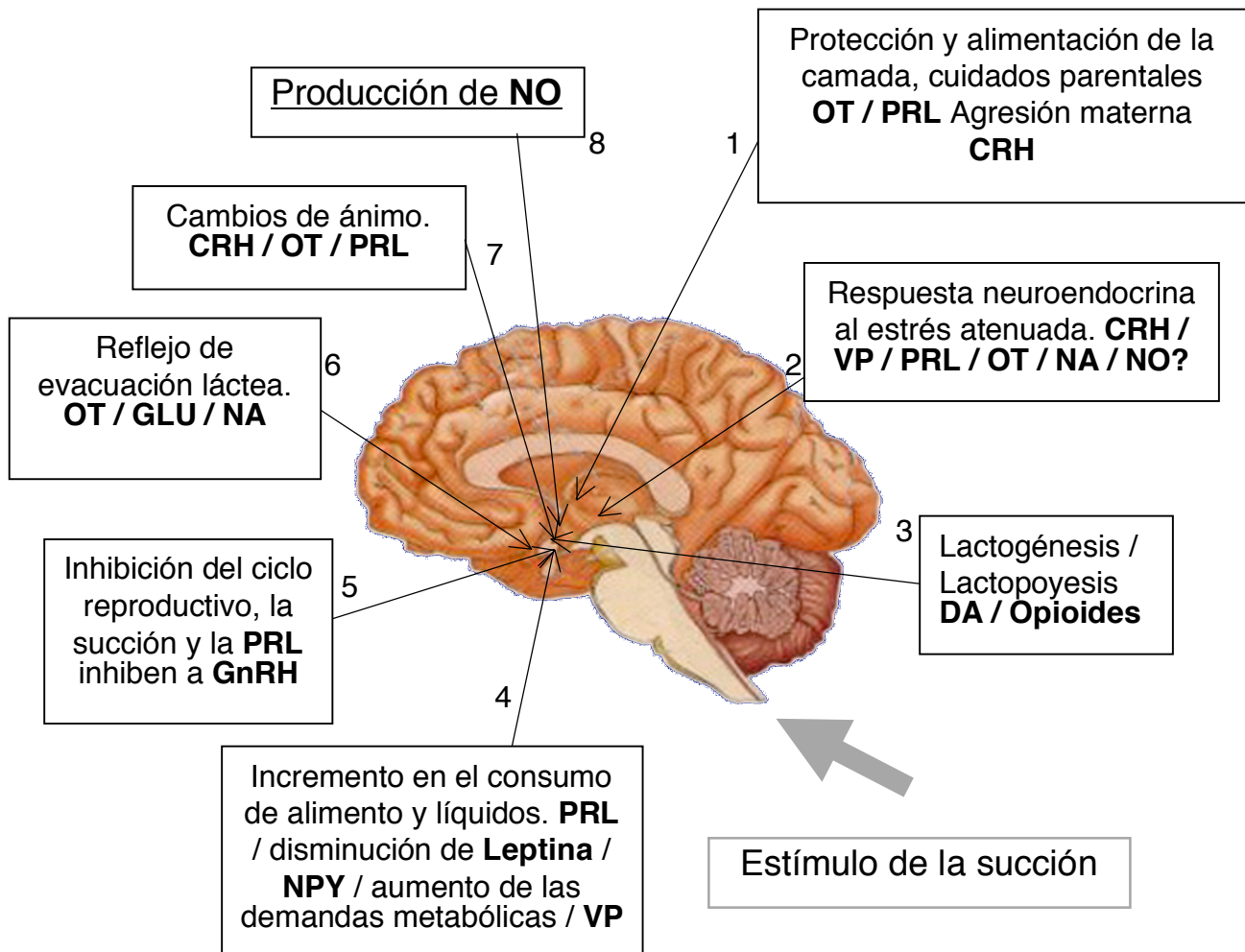
### **2.4.1 Neurobiología de la lactancia**

Aunque desde hace mucho tiempo se habían observado algunos de los cambios más evidentes que caracterizan la transición entre parto y lactancia, como el cese temporal del ciclo reproductivo, aumento en el consumo de líquidos y alimento, manifestación de la conducta materna, la secreción y evacuación láctea, es hasta fechas recientes que se ha comenzado a entender cuáles son los mecanismos que los subyacen (Smith, 1981; Kinsley y Lambert, 2006). Al respecto, investigaciones recientes indican que las fluctuaciones hormonales que ocurren durante, y a lo largo de estas tres fases pueden remodelar el cerebro femenino. Entre los cambios observados en el cerebro materno incluyen el aumento del tamaño neuronal en algunas regiones y cambios estructurales en otras (Figura 2). Algunas de estas regiones, como el PVH, están involucradas en la regulación de las conductas maternas, como la construcción de un nido, acicalamiento y la protección de las crías ante los depredadores. Otras de las regiones cerebrales en donde también se observan cambios son las que están involucradas en procesos como la memoria, el aprendizaje y la respuesta al estrés (Figura 2).

Sin embargo, durante esta fase, algunos de los cambios más marcados se observan en el eje HPA, especialmente en el PVH, dada su importancia en la preservación de la homeostasis y en la respuesta al estrés, la cual durante la lactancia está atenuada. Las modificaciones que contribuyen a esta disminución al estrés durante la lactancia son diversas. En relación con el eje HPA, se sabe que se pierde la ritmicidad pulsátil de la secreción de CORT, además prevalece un nivel relativamente alto y estable de secreción de glucocorticoides. Como se mencionó, los glucocorticoides juegan un papel importante en la determinación de la actividad en un amplio rango de procesos homeostáticos (Jonhstone y col., 2000). Además, disminuye la expresión de CRH y como consecuencia hay un aumento en sus receptores, así como también se ha propuesto la disminución en sensibilidad de la hipófisis a la retroalimentación negativa que genera los glucocorticoides sobre la síntesis y secreción de CRH y ACTH (Lightman y col., 2001; Jonhstone y col., 2000). Del mismo modo se ha reportado la

disminución de las aferencias noradrenérgicas que llegan al hipotálamo. Se ha sugerido que este conjunto de adaptaciones del eje HPA, podrían ser las responsables de la respuesta al estrés atenuada durante la lactancia. No obstante, una de las contribuciones más recientes, y contradictorias, a las modificaciones que existen en el cerebro de la rata lactante, es el aumento en la expresión de las enzimas que sintetizan óxido nítrico (NO), y se ha sugerido que su expresión es dependiente del estímulo de la succión, además se ha mostrado que su inhibición interrumpe algunas conductas maternas (Neumann, 2002).

Otras de las modificaciones que se observan en diversas áreas del cerebro de la rata durante la lactancia, incluyen la inhibición de crisis convulsivas inducidas por la activación de receptores N-Metil D L-Aspartato (NMDA) (Abbud y col., 1992; Abbud y col., 1994) y la neuroprotección inducida por ácido kaínico (Abbud y Smith, 1993; Olazábal y Ferreira, 1997) que probablemente esté asociada a la disminución de los receptores glutamatérgicos (Standley, 1999), También se presenta un aumento del número y densidad de dendritas en hipocampo (Kinsley y Lambert, 2006), mayor complejidad y distribución de células gliales (Armstrong y Hatton, 2006) así como reorganización neuronal en el hipotálamo (Theodosis y Poulain, 2001).



**Figura 2. El cerebro materno.** El diagrama muestra las principales adaptaciones y procesos en el cerebro materno. Las regiones anatómicas involucradas en estas adaptaciones son: 1.- bulbo olfatorio, sistema límbico, área preóptica media, núcleo ventromedial, área ventral tegmental, sustancia gris periacueductal, núcleo accumbens, sistema límbico, corteza cerebral, hipocampo, PVH; 2.- tallo cerebral, sistema límbico, PVH región parvocelular; 3, vías ascendentes de médula espinal y tallo cerebral, núcleo arcuato, hipófisis anterior; 4.- núcleo arcuato, área preóptica media; 5.- órgano vasculoso de la lámina terminal, órgano subfornical, núcleo supraóptico (SON), PVH, núcleo del lecho de la estría terminal, hipófisis posterior; 6.- sistema límbico, amígdala, tallo cerebral; 7.- sistema límbico, corteza cerebral, SON, PVH; 8.- SON y PVH (Modificado de: Russell y col., 2001)

### ***2.4.2 Respuesta al estrés durante la lactancia***

En condiciones fisiológicas particulares donde la respuesta al estrés está atenuada de manera natural, existe la posibilidad de que se mantenga la mínima respuesta necesaria que le permita contender si se pone en riesgo la homeostasis del organismo. Aunque existen varios estados fisiológicos en los que esto sucede, uno de los mejores ejemplos es el que se observa en las hembras de mamíferos durante la última fase del embarazo y la lactancia (Tilbrook y Clark, 2006; Carter, 1987). Las alteraciones que sufre el eje HPA que llevan a una respuesta al estrés atenuada, inician en la última fase del embarazo y continúan durante la lactancia. De manera general, se considera como un cambio adaptativo que contribuye a establecer la conducta materna que garantice el desarrollo óptimo de la camada (Carter y Altemus, 1997; Herman y col., 2002).

La atenuación de la respuesta neuroendocrina al estrés durante la lactancia se ha demostrado con una gran variedad de estímulos estresantes como el choque eléctrico (footshock), exposición a éter, ruido, frío, nado forzado, restricción de movimiento, intruso en la jaula materna, orina de zorro, inyección peritoneal de cloruro de sodio e inyección de lipopolisacárido (LPS) (Da Costa y col., 1986; Neumann y col., 2005; Olazabal y Ferreira, 1997; Shanks y col., 1997 y 1999; Windle y col., 1997). Las ratas lactantes también muestran una respuesta atenuada a estímulos estresantes de índole psicológico en donde se observa reducción de los niveles circulantes de OT, no hay un aumento en el nivel de PRL, en comparación con hembras no lactantes (Carter y col., 1987; Higuchi y col., 1989; Banky y col., 1994).

Los mecanismos que subyacen a la respuesta al estrés atenuada durante la lactancia no son del todo entendidos, pero hay suficiente evidencia experimental que demuestra que existen cambios en todos los niveles del eje HPA. Es evidente que la actividad alterada del eje HPA puede deberse a una serie de mecanismos, incluidos la reducción en la síntesis de CRH y AVP, modificaciones en la eficacia de la retroalimentación negativa de los glucocorticoides, cambios en la información noradrenérgica que llega al

PVH, así como la reducción en la respuesta de la hipófisis a las acciones de el CRH y la AVP. También es posible que existan cambios en las señales reguladoras que llegan al PVH, así como variaciones en la respuesta a OT, PRL y péptidos reguladores del apetito que contribuyan a la actividad reducida del eje HPA (Neumann, 2001).

En la rata lactante, la síntesis y secreción de CRH y VP está modificada, tanto en condiciones basales como ante una situación de estrés. La expresión basal del mRNA de CRH en el PVH de ratas lactantes disminuye en comparación con las no-lactantes. El efecto de la lactancia sobre AVP es menos clara, ya que los estudios de microdiálisis no han mostrado un incremento en el mRNA de AVP en el PVH durante la lactancia (Walker y col., 2001a).

Las características de estas respuestas neuroendocrinas al estrés varían significativamente durante el ciclo reproductivo, particularmente durante la lactancia (Stern y Levine, 1972; Walker y col., 2001b). A este respecto, como se mencionó previamente, durante la lactancia aumenta la secreción basal de glucocorticoides y ACTH, se pierde la ritmicidad diurna de la actividad del eje HPA y disminuye la respuesta al estrés (Calza y col., 1993; Walker y col., 2001a; Neuman, 2001; Douglas, 2005). Como consecuencia, las ratas lactantes, a pesar de tener concentraciones basales elevadas de ACTH y CORT, tienen una menor expresión de c-Fos (proteína y mRNA) y mRNA de CRH en neuronas del PVH en respuesta a varios estímulos estresantes (Okere y col., 1999; Jonhstone y col., 2000; Walker y col., 2001b; Tilbrook y col., 2006), tanto físicos y metabólicos, incluyendo inyección de salina hipertónica, estrés por nado, inhalación de éter, inyección de LPS (Walker y col., 2001b), así como a estímulos psicológicos, como ruido, inmovilización o estrés social (Douglas, 2005; Deschamps y col., 2003; Lightman y col., 2001). Así mismo, se ha demostrado una reducción en la actividad de las vías aferentes al PVH y modulación diferenciada de la activación de las neuronas de dicho núcleo (Deschamps y col., 2003).

Al igual que para CORT y de manera contraria a lo que sucede con las hembras vírgenes o los machos, muchos estudios han documentado una disminución en los niveles circulantes de varias hormonas y neurotransmisores inducidos por estrés, como OT (Carter y Lightman, 1987; Neumann y col., 2001), catecolaminas, PRL (Higuchi y col., 1989), ACTH y CORT (Stern y Voogt, 1973; Walker y col., 2001; Windle y col., 1997b; Brunton y col., 2006) durante la lactancia. Los mecanismos por los cuales la respuesta neuroendocrina al estrés está atenuada durante la lactancia aún no son entendidos, pero la succión y la presencia de las crías pueden ser estímulos importantes en la inducción de este fenómeno (Deschamps y col., 2003; Tilbrook y col., 2006). En ratas, se ha encontrado que cuando se retiran las crías durante un periodo de 24 h, las mediciones de la actividad del eje HPA en hembras lactantes son similares a las no lactantes. Esto ha sido mostrado por la disminución en los niveles de mRNA de CRH y ACTH y la secreción de CORT (Banky y col., 1994; Deschamps y col., 2003; Walker y col., 2001b). Estos resultados sugieren que los mecanismos de la reducción de la actividad del eje HPA inducida por la succión durante la lactancia involucra modificaciones a nivel del hipotálamo o de la hipófisis, dado el aumento en la concentración plasmática de ACTH durante aislamiento o restricción de movimiento que fueron substancialmente reducidas en borregas lactantes comparadas con las no lactantes (Tilbrook y col., 2006). Esto puede deberse a la reducción en la secreción de CRH y/o de VP del hipotálamo hacia el sistema portal hipofisiario y/o a la reducción en la respuesta de la hipófisis anterior a las acciones de CRH y/o VP (Brunton y col., 2006).

Existen evidencias sobre la reducción en la síntesis de CRH y VP y alteraciones en la respuesta de la hipófisis a CRH y VP que contribuyen a la atenuación de la respuesta al estrés en hembras lactantes. Por ejemplo, los niveles de mRNA de CRH y c-Fos inducidos por estrés en neuronas del PVH de las ratas lactantes son menores en comparación con las no-lactantes (Abbud y col., 1992). Incluso, las ratas vírgenes ciclantes tienen un aumento del transcrito primario para VP después del reto inmunológico comparado con las ratas lactantes (Da Costa y col., 1996). El tratamiento con CRH resulta en un aumento de ACTH en las ratas vírgenes en comparación con

las ratas lactantes (Da Costa y col.,1997). En contraste, se ha encontrado una disminución de la respuesta a VP en la hipófisis de las ratas lactantes, lo que sugiere que las acciones de CRH y VP pueden estar alteradas de manera distinta durante la lactancia (Wintrip y col., 1997).

Se ha sugerido que la respuesta atenuada del eje HPA durante la lactancia resulta de la alteración de la retroalimentación negativa de los glucocorticoides y la reducción en la estimulación noradrenérgica que llega del tallo al PVH. La atenuación de la actividad del eje HPA inducida por el estrés durante la lactancia parece ser un mecanismo multifactorial que involucra la disminución de la secreción de ACTH por la hipófisis anterior. Si bien, no se ha determinado hasta que punto estos cambios se deben a la secreción de CRH y VP del hipotálamo y la falta de respuesta de la hipófisis anterior (Higuchi y col., 1989; Da Costa y col., 1996; Nishioka y col., 1998; Tilbrook y Clarke, 2006).

Actualmente se consideran varios mecanismos potenciales para la disminución de la respuesta al estrés durante la lactancia, como el papel de la actividad central noradrenérgica disminuída (Douglas, 2005), la liberación central de PRL y OT (Neumann, 2002), la acción inhibitoria de los opiodes, así como cambios en la eficacia de la retroalimentación de glucocorticoides.

## **2.5 Óxido nítrico (NO)**

Desde la década pasada, el descubrimiento de una molécula producida por el sistema nervioso, el Óxido Nítrico (NO por sus siglas en inglés) revolucionó el concepto clásico que se tenía sobre el efecto y mecanismo de acción de los neurotransmisores (Bredt y Snyder, 1994; Rivier, 2002). El NO es un gas extremadamente inestable que se considera un neurotransmisor atípico ya que no se encuentra almacenado en vesículas sinápticas, y una vez sintetizado, difunde a través de la membrana donde actúa en sus diferentes células blanco, sin tener una molécula receptora específica o un mecanismo para su reciclamiento. El NO puede actuar como neurotransmisor o



neuromodulador, dado que el perímetro de su difusión varía entre 40 - 300  $\mu\text{m}$ , lo que implica que las células vecinas a la que generó el NO, podrían estar bajo su influencia (McCann, 1996; Esplugues, 2002; Grange-Messent y col., 2004; Guix y col., 2005).

La regulación de la actividad del NO la provee únicamente el control de su síntesis. El NO se produce a partir de tres isoformas de la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS), dos de ellas constitutivas, la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), así como una inducible (iNOS) (Turnbull y Rivier, 1996; Horn y col., 1994; Esplugues, 2002). En el sistema nervioso, las tres isoformas de la enzima están presentes, eNOS se localiza en las células epiteliales que conforman los capilares. Cuando se induce la expresión de iNOS, ésta se localiza principalmente en microglía y astrocitos. Sin embargo, la principal isoforma presente en el sistema nervioso, es la nNOS (Grange-Messent y col., 2004; Guix y col., 2005). Todas las neuronas positivas a nNOS, también exhiben actividad para la diaforasa del óxido nítrico Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH-d), la cuál se utiliza como un marcador para las neuronas que producen NO (Nagano, 1999). La actividad de nNOS se regula por la concentración de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el citosol, el cual estimula a la enzima a través de su interacción con calmodulina. Al llegar un potencial de acción a la neurona, se activan los canales a voltaje dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que resulta en la liberación de este ión desde vesículas intracelulares. Esto aumenta la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo requerido para que calmodulina se una a nNOS, activando así a la enzima. Cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  regresa a los niveles basales, se disocia nuevamente la calmodulina de nNOS, por lo que el  $\text{Ca}^{2+}$  funciona como un “switch” para nNOS (McCann, 1996; Esplugues, 2002).

Todas las isoformas de NOS tienen 4 grupos prostéticos: dinucleótido flavina-adenina (FAD), mononucleótido flavina (FMN), un grupo hemo (hierro protoporfirina IX) y tetrahidrobiopterina (BH4). El FAD, el FMN y el grupo hemo son cofactores involucrados en las reacciones reductoras que llevan a la síntesis de NO. El grupo hemo y la BH4 funcionan como sustrato. La estructura de NOS tiene dos dominios que funcionan de manera independiente. El primero consta de un dominio C-terminal con

actividad reductasa que une NADPH, FAD, FMN y  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina desencadena la activación de la apertura de la enzima al flujo de electrones hacia el centro activo de NOS. El dominio N-terminal tiene actividad oxigenasa y contiene los sitios de unión a  $\text{BH}_4$ , el grupo hemo y L-arginina (L-Arg). La L-Arg es utilizada por NOS para producir NO y citrulina, en un proceso que requiere NADPH y oxígeno ( $\text{O}_2$ ) (Bredt y Snyder, 1994; Rodrigo y col., 1994; Esplugues, 2002) (Figura 3).

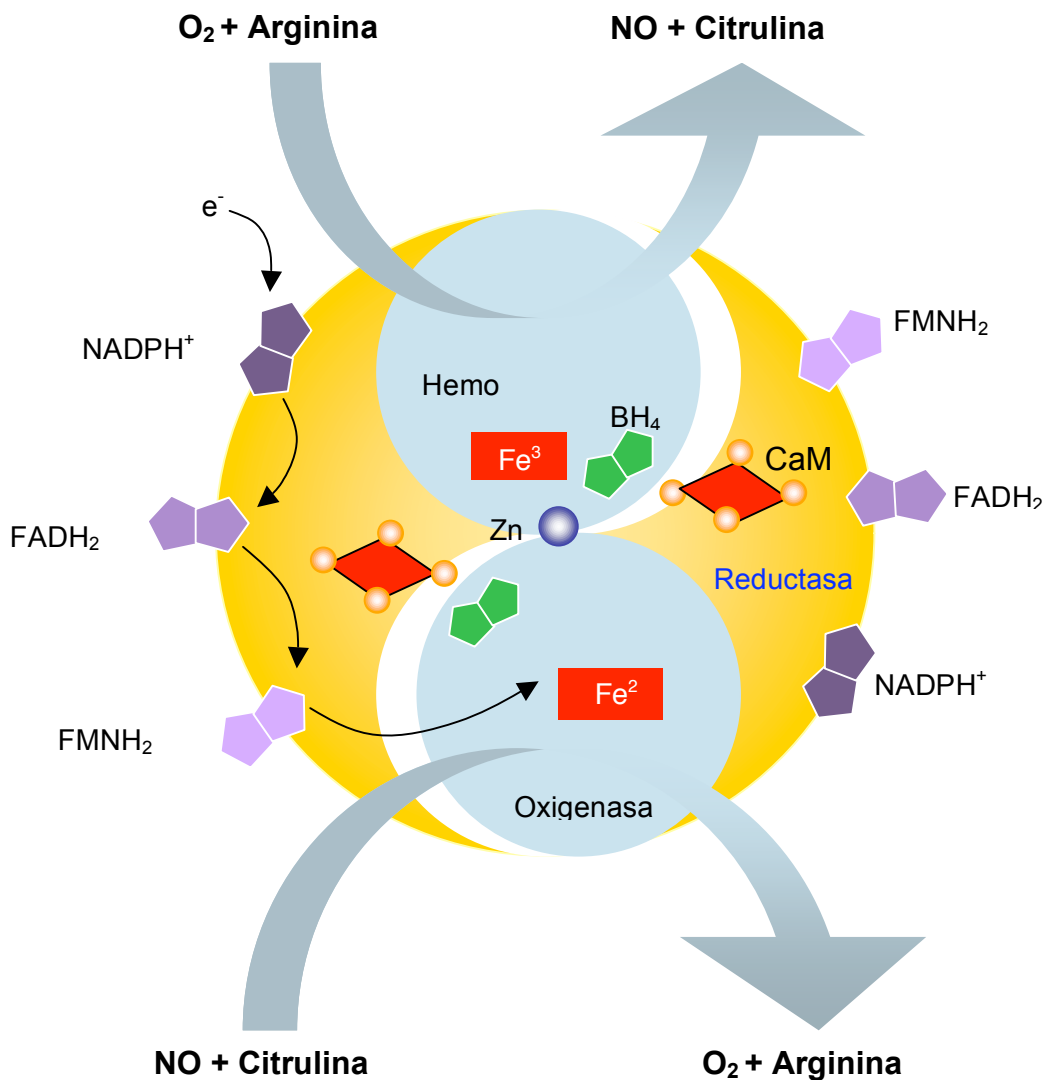
El NO participa en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos, tanto a nivel del sistema nervioso central como del autonómico (Bredt y Snyder, 1994; Popeski y col., 1999), tales como excitotoxicidad (Dawson y col., 1991) enfermedades neurodegenerativas, neuroplasticidad (Scott y col., 1995) y modulación del sistema cardiovascular (Radomski y Moncada, 1993).

En el sistema nervioso central, el NO se libera en grupos neuronales que presentan receptores glutamatérgicos del tipo NMDA y kainato. La estimulación del receptor NMDA genera una corriente entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  que incrementa la concentración de este ión en la terminal sináptica. El  $\text{Ca}^{2+}$  al unirse a nNOS la activa y así estimula la síntesis de NO. El NO producido en el citoplasma de la célula postsináptica, difunde a través de la membrana en dirección retrógrada hacia la neurona presináptica. Una vez que ha difundido en el citoplasma de la célula presináptica, se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa para activar la síntesis de GMP produciendo un incremento en este nucleótido. Estas neuronas que expresan marcadores de NO, como la nNOS o la NADPH-d, se les denomina nitrérgicas (Vincent y Kimura, 1992; Rodrigo y col., 1994).

A nivel del eje HPA, el NO tiene un papel importante en la regulación de las funciones neuroendocrinas, tanto a nivel del hipotálamo como de la hipófisis (Rivier, 2002; McCann, 1996). De manera consistente con esta función, mediante técnicas de inmunohistoquímica o hibridación in situ, se ha localizado nNOS en diversos núcleos

hipotalámicos incluidos el núcleo medial ventral (VMN), el área preóptica media (MPOA)(Okamura y col., 1994), el núcleo supraóptico (SON) (Miyagawa, 1994; Calka y col., 1994), así como en las subdivisiones parvo- y magnocelular del PVH (Calza y col., 1993; Horn y col., 1994). Con respecto a este núcleo, se ha mostrado que nNOS se colocaliza con neuronas que expresan CRH (Calza y col., 1993), OT (Miyagawa y col., 1994), VP (Calka y Block, 1993a), angiotensina (Calka y Block, 1993b), somatostatina (Alonso y col., 1992) y tirosina hidroxilasa (TH) (Blanco y col., 1997).

En el PVH, el NO es una de las moléculas mensajeras que se producen en respuesta al estrés, así como por cambios en la presión arterial y durante fallas cardíacas (Zhang y col., 1997; Moro y col., 1998). Sin embargo, también existen condiciones fisiológicas en las cuales se observa un aumento en los niveles de NO en el PVH, como es el caso de la lactancia (Cecatelli y Eriksson, 1993; Neuman y col., 2001; Popeski y col., 2003). Al respecto, evidencias recientes sugieren que el NO tiene un papel importante en la regulación neuronal durante la lactancia (Popeski y col., 2003), mismo que es dependiente del estímulo de la succión (Cecatelli y Eriksson, 1993; Otukonyong y col., 2000, Okere y col., 1999) y su inhibición interrumpe la conducta materna (Popeski y Woodside, 2004; Service y Woodside, 2007).



**Figura 3. Síntesis de óxido nítrico.** Los grupos prostéticos dinucleótido flavina-adenina (FAD), mononucleótido flavina (FMN) y el grupo hemo son cofactores involucrados en las reacciones reductoras que llevan a la síntesis de NO. El grupo hemo y la tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) funcionan como sustrato. La estructura de NOS tiene dos dominios que funcionan de manera independiente. El primero consiste de un dominio C-terminal con actividad reductasa que une NADPH, FAD, FMN y Ca<sup>2+</sup>-calmodulina. La unión de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina desencadena la activación de la apertura de la enzima al flujo de electrones hacia el centro activo de NOS. El dominio con actividad oxigenasa y contiene los sitios de unión a BH<sub>4</sub>, el grupo hemo y L-arginina (L-Arg). La L-Arg es utilizada por NOS para producir NO y citrulina, en un proceso que requiere NADPH y oxígeno (O<sub>2</sub>).

### **2.5.1 nNOS y hormonas gonadales**

La distribución de nNOS en diferentes regiones del cerebro se superpone con la de los receptores a hormonas gonadales. Existen regiones que se caracterizan por la presencia de receptores a progesterona (PR) así como a estrógenos, como son el receptor a estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y el beta ( $ER\beta$ ). Estas regiones cerebrales incluyen el BNST, la amígdala, la región preóptica, el hipotálamo y el núcleo supraóptico. La mayor parte de los resultados que se han obtenido en mamíferos muestran que existe una relación entre los receptores a esteroides gonadales y nNOS o NADPH-d. Sin embargo, parece que existen diferencias ecalzaspecíficas en cuanto a la colocalización entre especies (Knowles y Moncada, 1994).

La distribución de nNOS y receptores a hormonas ováricas, en regiones cerebrales específicas, sugiere la existencia de una relación neuroendócrina con NO. En mamíferos, los esteroides sexuales controlan la expresión de nNOS en la región preóptica hipotalámica. En las hembras, el  $E_2$  aumenta la reactividad a NADPH-d en el núcleo ventrolateral, en el MPOA y en el PVH (Ceccatelli y col., 1996). Aunado a estos resultados, recientemente se ha mostrado que durante la respuesta al estrés psicológico el  $E_2$  actúa sobre el NO, que se produce en el PVH, contribuyendo a la disminución de la presión sanguínea en estas respuestas (Gingerich y Krukoff, 2006). De tal manera, parece que los efectos del  $E_2$  sobre nNOS parecen ser regionalmente específicos. El  $E_2$  disminuye el número de neuronas positivas a NADPH y a nNOS en el PVH así como su mRNA en ratas OVX, por un mecanismo dependiente del receptor a estrógenos  $\beta$ . Al presentarse un estímulo estresante como la restricción de movimiento, los niveles de NO aumentan en respuesta al estrés en el PVH de hembras OVX tratadas con  $E_2$  (Popeski y col., 2003).

### **2.5.2 Lactancia y óxido nítrico**

Las adaptaciones fisiológicas y de comportamiento que se observan durante la lactancia están asociados con cambios neuroquímicos en el cerebro materno, muchos

de los cuales son dependientes del estímulo de la succión. Entre estos cambios existe un aumento en la expresión de NOS tanto en las regiones magnocelular como parvocelular del PVH (Otukonyong y col., 2000; Popeski y col., 1999), en donde prevalece una colocalización predominante con OT. La síntesis de NOS aumenta cuando el sistema oxitocinérgico se activa, como sucede durante la succión continua o bien su expresión se reactiva al reunirse la camada con la madre después de un periodo de separación (Otukonyong y col., 2000). Asimismo, se ha mostrado que después de la deshidratación se inhibe la producción de NO y aumenta la liberación de oxitocina (Kadowaki y col., 1994; Summy-Long y col., 1997). Por otro lado, se ha sugerido que el NO también tiene una contribución en la conducta materna, ya que la inhibición de NOS afecta algunos aspectos de la conducta materna, como la agresión hacia un intruso o el reflejo de acarreo de las crías hacia el nido (Popeski y col., 1999; Service y Woodside, 2007). Estos resultados sugieren que existe una relación, entre NO y la liberación de OT, y se ha sugerido que el NO puede tener un papel importante en la regulación neuronal durante la lactancia (Popeski y col., 2003), donde el estímulo de la succión tendría un papel fundamental para mantener el nivel basal elevado de NO que prevalece en la lactancia (Cecatelli y Ericksson, 1993; Otukonyong y col., 2000; Okere y col., 1999).

### ***2.5.3 Óxido nítrico y estrés***

El óxido nítrico es un gas altamente difusible y con actividad de radical libre, sin embargo también al NO se le han atribuido una plétora de funciones en el sistema nervioso. Su implicación en neuroprotección y neurotoxicidad ha sido ampliamente estudiada (Turnbull y Rivier, 1996; Cheng y col., 2003; Guix y col., 2005). En este contexto, parece claro que el NO producido por eNOS y nNOS tienen un papel protector (Esplugues, 2002; Grange-Messent y col., 2004), mientras que el NO producido por iNOS puede tener un efecto neurotóxico (Grange-Messent y col., 2004; Guix y col., 2005). Esto puede ser explicado en función de la cantidad de NO generado así como por la temporalidad de su síntesis. Mientras que niveles bajos y síntesis temprana de NO por eNOS y nNOS son benéficos por su efecto local de vasodilatación

e inhibición neuronal, los niveles altos y producción sostenida de NO por iNOS son neurotóxicos principalmente por estrés oxidativo (Esplugues, 2002; Guix y col., 2005).

Evidencia experimental apoya la posible participación del NO en la regulación de la liberación de las hormonas relacionadas con el estrés, ACTH y corticosterona, y se ha encontrado que la actividad de NOS y su transcripción aumentan en el eje HPA después de estímulos estresantes (Kadowaki y col., 1994; Guix y col., 2005). También, a través de un mecanismo de retroalimentación, los glucocorticoides regulan la transcripción y activación de NOS después de la activación del eje HPA. Por otro lado, los glucocorticoides aumentan la excitotoxicidad neuronal al aumentar la expresión de receptores a Glu y la inhibición de la recaptura de Glu (Sapolsky y col., 2000).

Si bien existen evidencias que indican que el NO tiene un importante papel en la regulación del eje HPA, hasta el presente, este papel no está bien definido. Se ha sugerido que el NO puede actuar como mensajero celular en procesos de memoria (Son y col., 1996), plasticidad (Okere y col., 1999) y desarrollo (Cheng y col., 2003), al facilitar la activación o liberación de otros neurotransmisores (Guix y col., 2005), al mediar respuestas del sistema inmunológico (Uribe y col., 1999; Turnbull y Rivier, 1996), y como vasodilatador en la regulación del flujo sanguíneo (Zhang y col., 1997).

#### **2.5.4 Ácido kaínico y daño excitotóxico**

Desde hace más de 30 años, se ha usado la estimulación con aminoácidos excitadores (Olney y col., 1974) como una herramienta para explorar los cambios inducidos por la lactancia sobre el sistema nervioso de la madre (Olazabal y Ferreira, 1997; Abbud y col., 1994; Parker y Crowley, 1993). Se sabe que la administración sistémica de ácido kaínico (KA), un análogo sintético del Glu, produce daño excitotóxico. El daño depende de la dosis, especie y cepa de los animales, pero el resultado es la muerte de las neuronas en las regiones vulnerables, la proliferación de astrocitos y el aumento de fibras gliales (Ferrer, 2002). Uno de los efectos importantes

generados a partir de la estimulación con aminoácidos excitadores es la generación de oxígeno reactivo o radicales libres lo que puede inducir apoptosis por daño excitotóxico (Zelena y col., 2005). En este sentido, al NO que funciona como molécula mensajera en el sistema nervioso, también se le ha implicado en la neurotoxicidad y procesos neurodegenerativos. El NO reacciona rápidamente con superóxido ( $O_2^-$ ) y produce peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cual es un radical libre altamente reactivo que es mediador en la excitotoxicidad por NO (Milatovic y col., 2002), con el que desencadenan procesos de muerte celular, tanto por apoptosis como por necrosis.

Se ha sugerido que uno de los sitios de acción primaria del Glu, el principal neurotransmisor excitador, cuando es inyectado vía intracerebroventricular (i.c.v.), es a nivel del hipotálamo (Zelena y col., 2005). Al respecto, se ha observado que la administración de KA aumenta los niveles de NO en el hipotálamo de ratas macho (Zelena y col., 2005). Sin embargo, la administración de KA a homogenados de hipotálamo de ratas hembra, ciclantes o OVX, no produce cambios en la actividad de NOS, por lo que se sugiere que el efecto del KA está influenciado por el estado gonadal (Lasaga y col., 1998). Asimismo, se ha reportado que la respuesta hipotalámica (Pohl y col., 1989; Lee y col., 1993), hipocampal y cortical (Abbud y col., 1992) a aminoácidos excitadores disminuye durante la lactancia y se ha sugerido que esta reducción depende de la succión (Abbud y col., 1993) y del ambiente hormonal de la lactancia, caracterizado por altos niveles de progesterona y bajos niveles de estrógenos (Smith, 1981 y 1984; Lee y col., 1989).



### **3 Planteamiento del problema**

De manera consistente, se ha descrito que el estrés generado por diversos estímulos en ratas macho o en hembras ciclantes, resulta en la activación de vías catecolaminérgicas, del eje HPA y en la inducción de la síntesis de NO en el PVH. Sin embargo, la respuesta al estrés puede variar en función del ciclo reproductivo en las hembras, como se ha observado durante el ciclo estral (Viau y Meaney, 1991) y la lactancia (Tilbrook y Clarke, 2006), ya que en esta fase las respuestas neuroendócrinas ante diferentes estímulos estresantes están disminuidas. Al respecto, el único sistema de neurotransmisión que se ha estudiado, como una de las probables vías de señalización involucradas en la respuesta atenuada al estrés durante el embarazo y la lactancia, es el noradrenérgico (Douglas, 2005), además de la influencia del incremento de OT y PRL en el hipotálamo (Torner y Neumann, 2002). Pese a los resultados de estos estudios, no se ha llegado a conocer cuáles son los factores que participan y los mecanismos que expliquen este fenómeno. Las evidencias recientes sugieren que el NO, generado por el estímulo de la succión, puede participar en la regulación neuronal a nivel del hipotálamo durante la lactancia (Cecatelli y Eriksson, 1993; Otukonyong y col., 2000).

Con base en estos estudios, parece razonable plantear que el NO producido y mantenido por el estímulo de la succión durante la lactancia, además de participar en la secreción de OT también contribuye a la regulación fina de la hiporesponsividad al estrés que presentan las ratas lactantes.

Por lo anterior, aún queda por dilucidar el papel fisiológico y los mecanismos de acción que el NO pudiera tener en la respuesta al estrés de la madre lactante. Esto hace necesario profundizar más acerca de la contribución del NO, en su papel de

neuromodulador, en las modificaciones que se observan a nivel del PVH durante la lactancia.

## **4 Hipótesis**

La lactancia inducirá un nivel alto de NO en el PVH que se mantendrá sin variación en respuesta a un estímulo estresante o al daño excitotóxico.

## **5 Objetivos**

### **5.1 General**

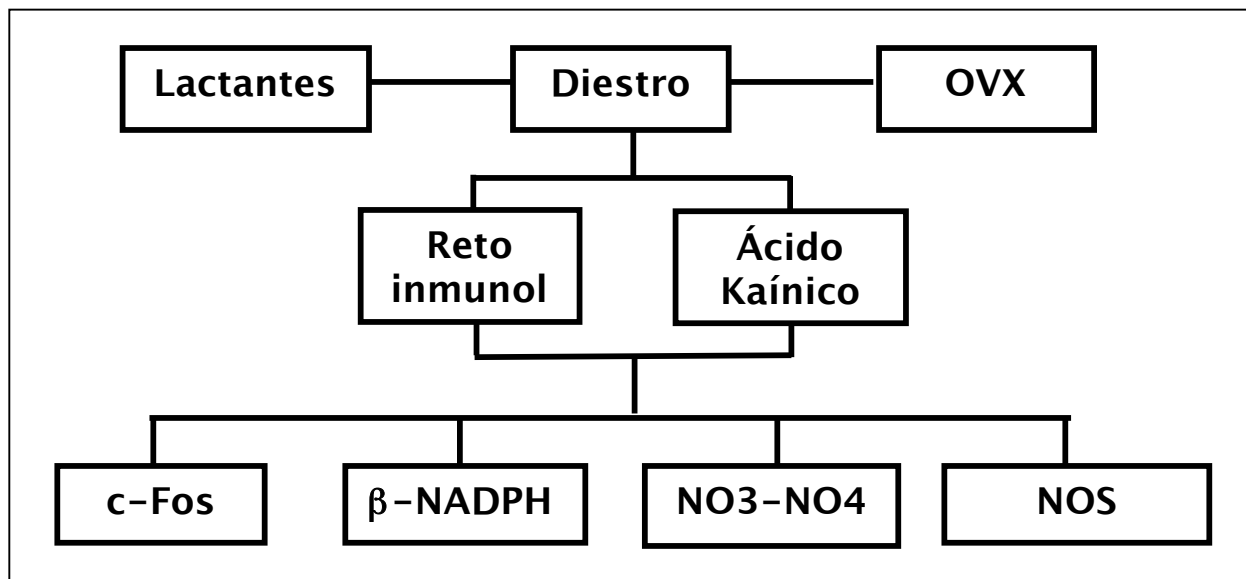
Comparar el efecto del estrés inmunológico y el daño excitotóxico sobre la producción de NO en el PVH de madres lactantes.

### **5.2 Particulares**

- ◆ Analizar el patrón de activación, mediante la detección de Fos-ir, de las neuronas del PVH inducido por el estrés inmunológico y el daño excitotóxico en ratas lactantes.
- ◆ Determinar la distribución de neuronas que producen NO en el PVH en animales expuestos al estrés inmunológico y al daño excitotóxico.
- ◆ Investigar el tipo de NOS implicada en la producción del NO en el PVH de ratas lactantes.
- ◆ Explorar la contribución de las hormonas ováricas sobre la expresión de c-Fos y de NO, inducidos por el estrés inmunológico y el daño excitotóxico.
- ◆ Cuantificar la activación de las enzimas productoras de NO por medio de indicadores de síntesis de NO, después del estrés inmunológico o la excitotoxicidad.

## 6 Estrategia experimental

### 6.1 Diagrama experimental



## **7 Materiales y métodos**

### **7.1 Animales**

En el presente estudio se utilizaron ratas Wistar hembras adultas (250 gr. de peso corporal) en diferentes condiciones: 1) ciclantes en diestro, 2) ovariectomizadas (2 semanas antes de experimento) y 3) lactantes primíparas (entre los días 10-14 de lactancia y con una camada de 8 a 10 crías). Estos animales fueron mantenidos en condiciones estándar de luz/oscuridad (12/ 12), temperatura controlada a  $23 \pm 2$  C°, con humedad del 40 - 50% y con agua y comida *ad libitum* en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, los animales fueron manejados de acuerdo con los lineamientos de las normas internacionales para el manejo y uso de animales de laboratorio de la National Academy of Sciences 2003.

### **7.2 Paradigmas experimentales**

Reto inmunológico por administración sistémica de ovoalbúmina (OVO). El estrés inmunológico se indujo con una inyección intraperitoneal (ip) de ovoalbúmina fresca, 50% v/v solución estéril salina, dosis 5 ml/Kg. pc diluido 1:1. Los animales control recibieron el mismo volumen de solución salina isotónica, todos los animales fueron perfundidos 3 hr después de la inyección.

Daño excitotóxico por la administración sistémica de KA. Los animales recibieron una inyección ip. de ácido kaínico 5mg/kg, los animales controles recibieron el mismo volumen de solución salina isotónica. Todos los animales fueron perfundidos 24 horas después de la inyección, la cual se realizó a las 2:00PM en todos los casos.

## **7.3 Histología**

### **7.3.1 Perfusión y obtención de cortes**

Después del tratamiento correspondiente, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (35 mg/Kg. ip), se colectó una muestra de sangre para la medición de hormonas en suero. Inmediatamente después fueron perfundidos vía intracardiaca con solución salina seguida de 350 ml de paraformaldehído al 4% en buffer de boratos 0.1M (pH 9.5, 10°C). Los cerebros se postfijaron durante 3 h y fueron crioprotectados en solución de sacarosa al 10% en amortiguador de fosfatos toda la noche a 4°C. El cerebro fue dividido en dos bloques, encéfalo y el tallo cerebral, de los cuales se colectaron 5 series de rebanadas coronales de 30  $\mu$ m de espesor. Estos tejidos se preservaron, en solución crioprotectora fría, y almacenaron a -20°C hasta su procesamiento histoquímico.

### **7.3.2 Inmunohistoquímica**

Los patrones de activación neuronal se detectaron por medio de la localización inmunohistoquímica de la proteína Fos, producto de la expresión del gen temprano c-Fos. Esta técnica ha sido empleada extensivamente para el mapeo de áreas del cerebro activadas por varios estímulos estresantes, incluida la inmovilización (da Costa y col., 1996). La expresión de mRNA de c-Fos e inmunoreactividad a Fos por inmovilización han sido detectados en un amplio rango de estructuras corticales, límbicas, hipotalámicas y de médula espinal, incluido el PVH (Wintrip y col., 1997). La detección inmunohistoquímica de Fos se realizó con un método estándar de peroxidasa (Sawchenko y col., 1990) usando un antisuero policlonal (Santa Cruz; 1:4000) purificado por afinidad, inducido en conejo contra un péptido sintético correspondiente a los residuos 4-17 de la porción N-terminal de la proteína Fos humana. Este antisuero no muestra actividad cruzada con cualquier antígeno identificado y relacionado con Fos.

La detección inmunohistoquímica para las sintetasas del óxido nítrico se realizó con antisueros policlonales dirigidos contra las enzimas iNOS (Santa Cruz; 1:150) y nNOS (Chemicon; 1:4000), purificados por afinidad, inducidos en conejo contra péptidos cercanos a la porción N-terminal de nNOS o iNOS de origen humano. La detección se realizó utilizando el método de inmunohistoquímica citado previamente.

El revelado se llevó a cabo mediante una técnica convencional de peroxidasa asociada con avidina-biotina, ya que da una mayor sensibilidad en términos de la cantidad de marca enlazada al sitio antigénico. El doble marcaje para Fos y NOS, se realizó en secuencia, primero la localización de la inmunorreactividad a Fos con un protocolo estándar con níquel (coloración negra), seguida de la incubación en antisuero para NOS y la identificación de la inmunorreactividad de NOS sin níquel (color café).

### **7.3.3 Histoquímica para NADPH-d**

La detección de la diaforasa nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADPH-d) es una técnica histoquímica basada en la presencia de la enzima que cataliza la conversión dependiente de NADPH, de la sal soluble tetrazolium a una forma insoluble y visible, formazán (Talavera y col., 1995). Éste método es útil en la identificación de poblaciones neuronales que contienen sintetasa de óxido nítrico. La distribución histoquímica de NADPH-d se detectó mediante la reacción de la enzima  $\beta$ -NADPH por la reducción del colorante azul de nitrotetrazolio.

### **7.4 *Determinación de nitratos y nitritos***

Después del tratamiento correspondiente, los animales fueron sacrificados por decapitación. Los hipotálamos se disecaron del resto del cerebro en fresco y se colectó una muestra de sangre para la medición de hormonas en suero. Inmediatamente después de su obtención las muestras de hipotálamo fueron congeladas y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su procesamiento. Cada muestra de tejido fue homogenada en PBS pH 7.4 durante 2 minutos, posteriormente se centrifugaron durante 20 minutos a 10,000

rpm a 10C°, se obtuvieron los sobrenadantes y se repitió el proceso una vez más. Posteriormente las muestras se filtraron por centrifugación con filtros de polisulfona de 10 kD (Cole Parmer).

Los niveles de nitritos y nitratos fueron determinados con un kit comercial (Total nitric oxide assay kit, Assay designs, Ann Harbor, MI, USA). Este kit nos da un índice de la cantidad de NO producida por medio de la conversión enzimática de nitratos a nitritos, basándose en la reacción de Griess, en la cual los nitratos son reducidos a nitritos por una reacción acoplada a la oxidación de la NADPH-d. Se detecta la disminución de la enzima por la reducción del colorante azul nitrotetrazolio a un compuesto estable, formazan. La placa fue leída inmediatamente después de detener la reacción a 550 nm en un lector automatizado para ELISA (Bio Rad, Hércules, CA, USA).

### ***7.5 Cuantificación de corticosterona***

La concentración de corticosterona (CORT) fue determinada en el plasma obtenido de los animales en las diferentes condiciones experimentales. Se utilizó el método de inmunoensayo competitivo EIA (Assay designs correlate EIA corticosterone kit, Assay designs, Ann Harbor, MI, USA). El kit de CORT es un inmunoensayo para la determinación cuantitativa de CORT en fluidos biológicos. Este kit utiliza un anticuerpo policlonal que se une, de manera competitiva a la CORT. Se realizan una serie de 3 incubaciones, se adiciona el sustrato, y finalmente se detiene la reacción generando un patrón de coloración que indica la concentración de CORT. La placa fue leída inmediatamente después de detener la reacción a 405 nm en un lector automatizado para ELISA (Bio Rad, Hércules, CA, USA).

### ***7.6 Procesamiento de imágenes***



Se determinaron los niveles relativos de expresión de Fos, NADPH-d, iNOS y nNOS con el uso de un microscopio y se tomaron fotomicrografías de secciones representativas de las áreas cerebrales que muestran activación, con la ayuda del atlas del cerebro (Swanson, 1998) para la localización de las regiones de interés. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio marca Nikon Eclipse 600 a una amplificación de 20x, capturadas con una cámara (Nikon) a nivel de microscopio y procesadas posteriormente con el programa IpLab (BD Biosciences- Bioimaging Division).

### **7.7 *Análisis estadístico***

Para analizar las diferencias entre los valores obtenidos en cada uno de los grupos experimentales, los datos se procesaron con el paquete estadístico Prisma 3.1 (Graphpad). Las comparaciones se realizaron con una prueba ANOVA de una vía, seguido de la prueba Post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, en el que se hace una comparación entre grupos. El nivel de  $\alpha$  mínimo para considerar significativas las diferencias se fijó en  $p \leq 0.05$ .

## **8 Resultados**

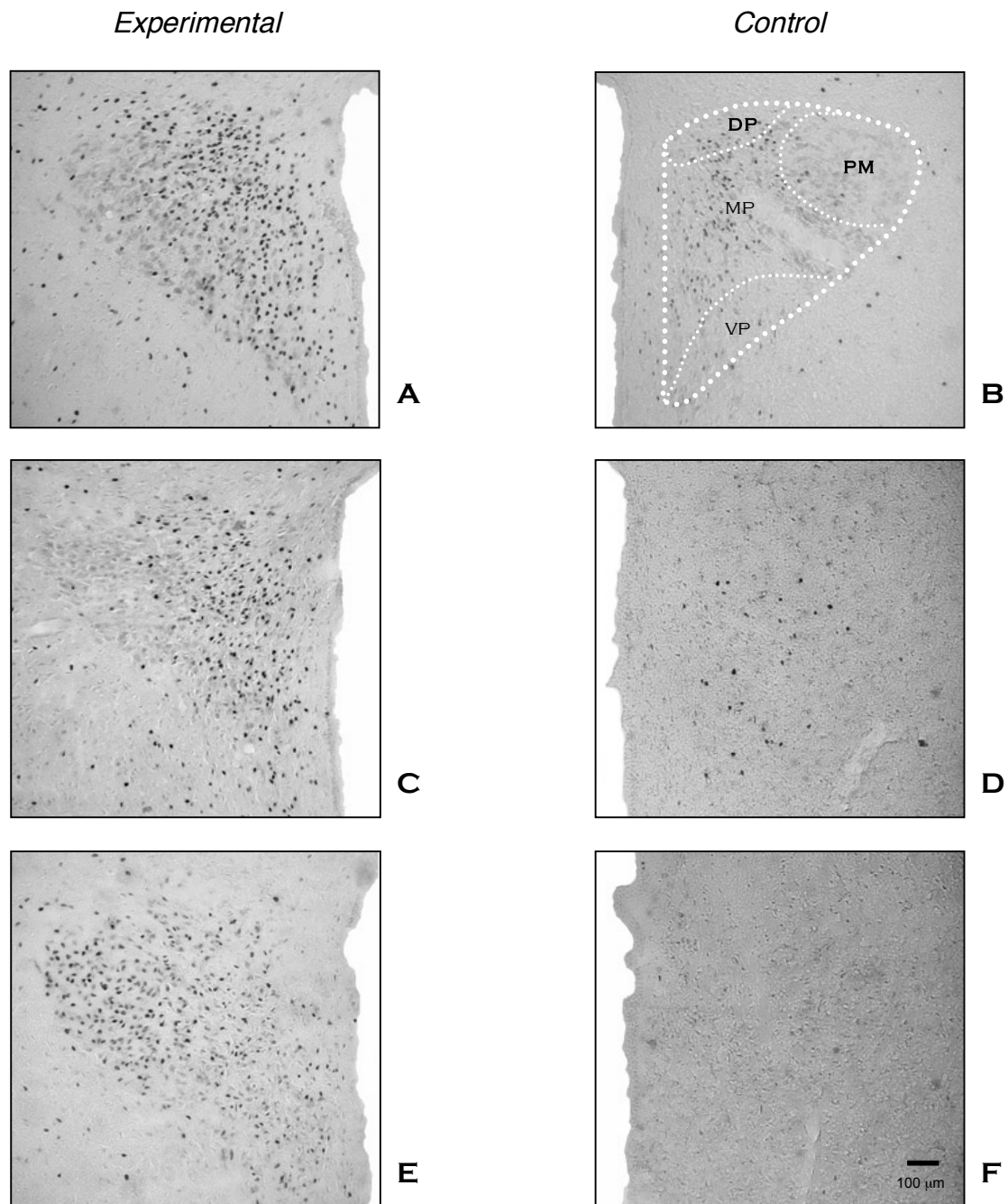
### **8.1 Expresión de Fos**

#### **8.1.1 Expresión de Fos en el PVH inducida por la administración de ovoalbúmina**

La inyección ip de ovoalbúmina (OVO) induce una respuesta inmunológico de tipo anafilactoide en los animales y se emplea como un modelo experimental de estrés inmunológico (Foldes y col., 2000). Este tratamiento produjo un aumento significativo en la expresión de Fos en el PVH de ratas ovariectomizadas (OVX) y en diestro, con respecto a las ratas lactantes. La distribución de la señal de la inmunoreactividad a Fos en el PVH de animales en diestro y lactantes se localizó exclusivamente en la región medial parvocelular del PVH, que se sabe contiene a las células que producen CRH, TRH y otros péptidos, envían sus proyecciones a la eminencia media (Figuras 4-A, 4-C y 8). En el caso de los animales OVX la marca estuvo distribuída de manera dispersa por el PVH, incluyendo tanto la región parvocelular como magnocelular (Figuras 4-E y 8). Las ratas lactantes fueron las que presentaron un menor número de células positivas a Fos de las tres condiciones hormonales usadas. En todas las condiciones el tratamiento con OVO aumentó la expresión de Fos, con respecto a sus controles (Figuras 4-B, 4-D y 4-F, Tabla 2).

Tanto las ratas en diestro como las OVX presentaron síntomas anafilactoides como los que se han descrito previamente (Földes y col., 2000) para el paradigma de reto inmunológico por OVO, caracterizado por edema en las patas y rascado alrededor del hocico, sin embargo, las ratas lactantes no presentaron ningún síntoma aparente.

## Expresión de Fos en el PVH inducida por ovoalbúmina



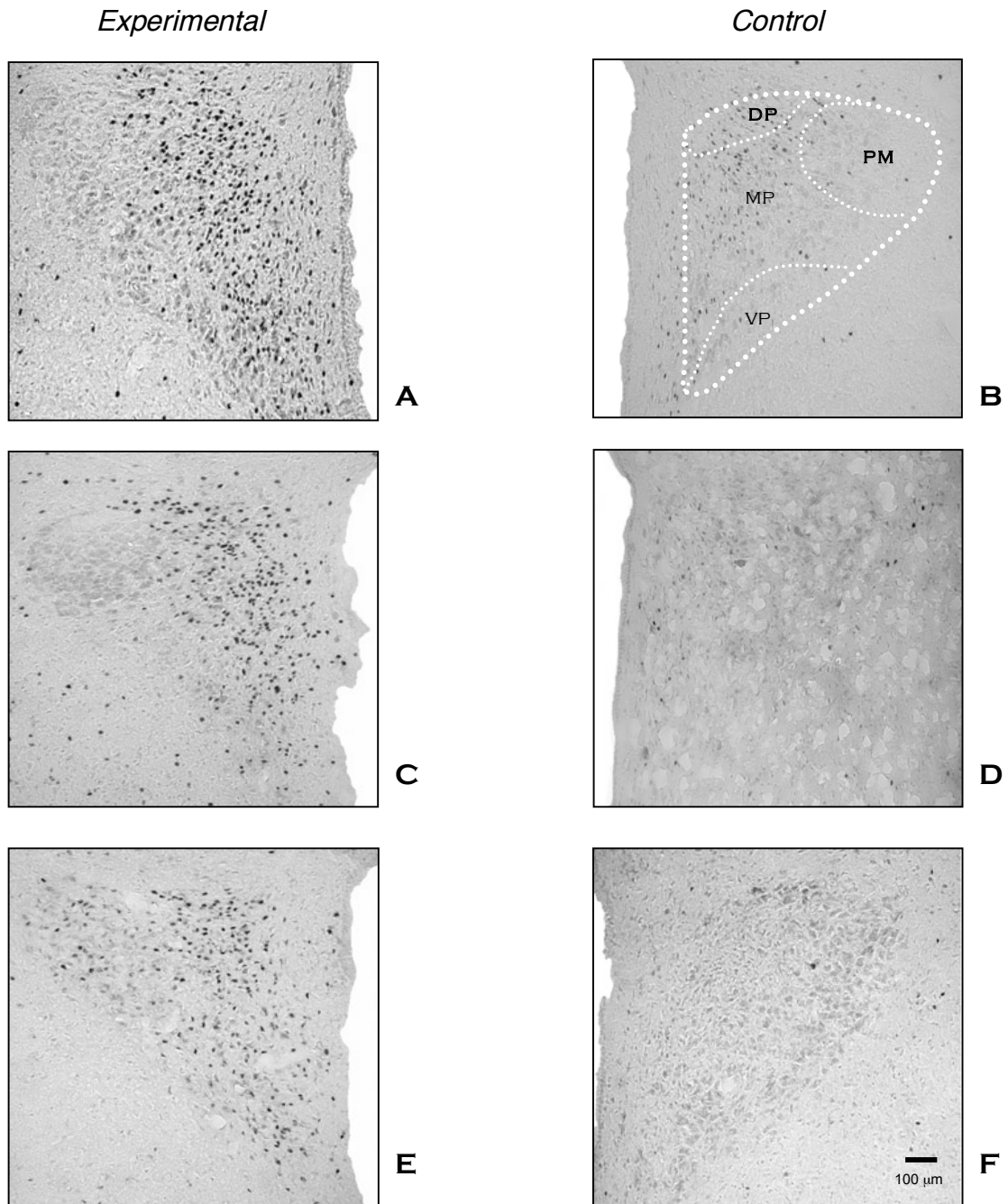
**Figura 4. Efecto de la administración de ovoalbúmina sobre la expresión de Fos en el PVH.** Fotomicrografías representativas del PVH de ratas en Diestro (A), Lactantes (C) y OVX (E) 3 h después del reto inmunológico con ovoalbúmina (5 ml/kg); ratas control a las que se les aplicó solución salina isotónica en Diestro (B), Lactantes (D) y OVX (F). Objetivo 20X. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.

### **8.1.2 Expresión de Fos en el PVH inducida por ácido kaínico**

La inyección ip. de ácido kaínico (KA) indujo un aumento significativo en la expresión de Fos en el PVH de ratas en diestro con respecto a los animales lactantes (Tabla 2), la distribución de la marca de la inmunoreactividad a Fos en los animales en diestro y lactantes estuvo delimitada a la región ventral parvocelular del PVH (Figuras 5-A, 5-C y 8). Sin embargo, en los animales OVX observamos que, de manera similar a la inyección de OVO, la actividad se observó en la región parvocelular y magnocelular del PVH (Figuras 5-E y 8). Asimismo, después del tratamiento excitotóxico, las ratas lactantes fueron las que presentaron un menor número de células reactivas a Fos (Tabla 2). En este experimento, se encontró un aumento significativo de células reactivas después de la inyección de KA en las tres condiciones, con respecto a sus respectivos controles (Figuras 5-B, 5-D y 5-F, Tabla 2).

Antes de la perfusión de las ratas en diestro y las OVX, se observaron sacudidas de perro mojado (wet dog shakes) y levantamientos de las extremidades superiores (jerking), que se conocen como conductas estereotipadas del daño excitotóxico por aminoácidos excitadores; nuevamente estas conductas no se observaron en las ratas lactantes.

Expresión de Fos en el PVH inducida por ácido kaínico



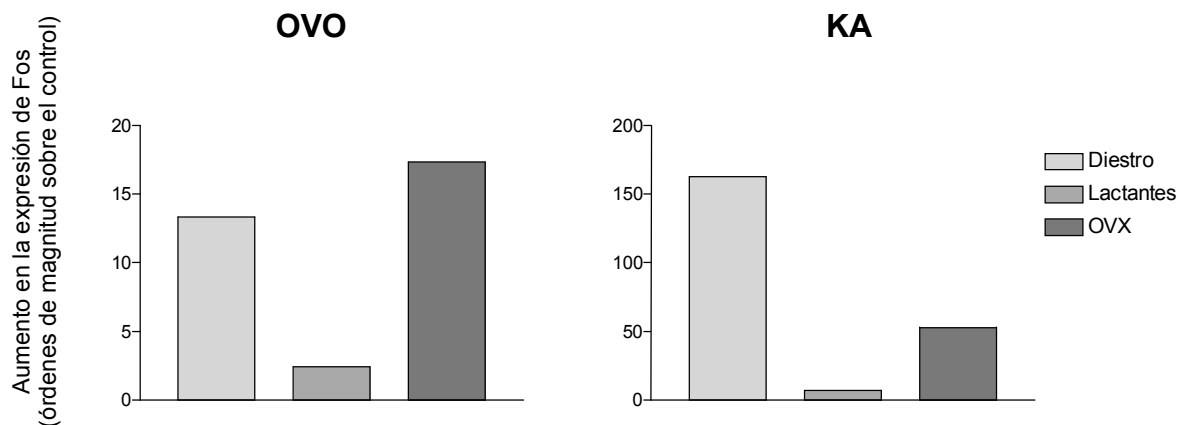
**Figura 5. Efecto de la administración de KA sobre la expresión de Fos en el PVH.** Fotomicrografías representativas del PVH de ratas en Diestro (A), Lactantes (C) y OVX (E) 24 h después del reto excitotóxico con KA (5 ml/Kg.); ratas control a las que se les aplicó solución salina isotónica en Diestro (B), Lactantes (D) y OVX (F). Objetivo 20X. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.

### 8.1.3 Determinación cuantitativa de la expresión de Fos en el PVH

La cuantificación de la expresión de Fos, se realizó con el conteo de núcleos celulares con marca positiva. La medición se realizó en todas las rebanadas de tejido que contenían el PVH, aproximadamente 4 por animal, en una de las 5 series colectadas.

La gráfica en la Figura 6 (panel izquierdo) muestra que las ratas de los grupos OVX y diestro presentaron un aumento significativo ante el reto inmunológico con respecto a sus controles, lo que sugiere que las hormonas ováricas no tienen una influencia importante en la activación de las neuronas del PVH durante el reto inmunológico que se les aplicó. Asimismo, se observa que el PVH de las ratas lactantes presentó una menor respuesta inducida por el reto con respecto a su control, e incluso con respecto a las otras dos condiciones con el mismo tratamiento experimental (Tabla 2).

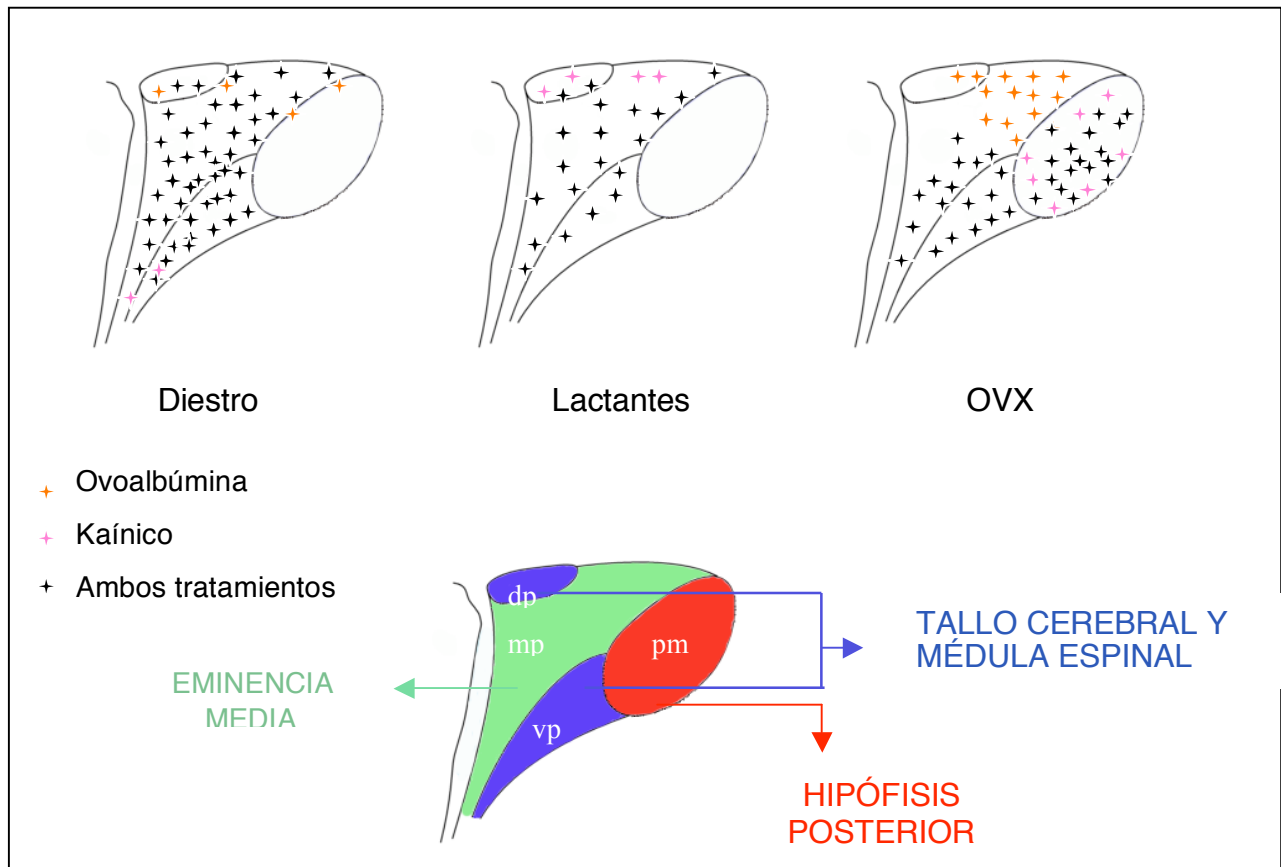
En la Figura 6 (panel derecho) se muestra el aumento en la expresión de Fos después del tratamiento excitotóxico con KA. Con este tratamiento se observó un aumento estadísticamente significativo de núcleo positivos en las tres condiciones, con respecto a sus controles (Tabla 2). El grupo en diestro fue el que presentó un aumento significativo con respecto a las otras dos condiciones con el mismo tratamiento. Sin embargo, ante este reto, el grupo de las hembras lactantes fueron las que presentaron un menor número de células positivas a Fos en el PVH. Los valores de los grupos control en la condición lactante, fueron similares a los reportados previamente, en los que se observan niveles elevados de células positivas a Fos, aún en condiciones basales.



**Figura 6. Aumento en la expresión de Fos en el PVH en respuesta al reto de ovoalbúmina y al reto excitotóxico con KA.** La gráfica muestra el aumento con respecto a los grupos control en órdenes de magnitud.

| Condición | Ctrl. 3 h     | OVO             | Ctrl. 24 h    | KA              |
|-----------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| Diestro   | 44.41 ± 12.28 | 592.4 ± 79.9 *  | 5.24 ± 0.76   | 851.6 ± 121.3 * |
| Lactantes | 136.1 ± 36.51 | 336.4 ± 87.04 @ | 71.66 ± 14.97 | 523.9 ± 57.55 * |
| OVX       | 47.16 ± 5.57  | 818.5 ± 170.5 * | 12.17 ± 1.95  | 646.9 ± 53.37 * |

**Tabla 2. Número de células positivas a Fos después de los tratamientos experimentales.** Los valores expresados como media ± E.E.M., n= 5 por grupo, análisis realizado por ANOVA de 1 vía. \* P< 0.001, @P<0.01.



**Figura 8. Localización de Fos en el PVH después de los tratamientos experimentales.** El diagrama muestra la expresión de Fos en el PVH ante los diferentes retos, cada marca representa 5 núcleos positivos a Fos. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.



#### **8.1.4 Expresión de NADPH en el PVH después de los tratamientos experimentales**

Como se mencionó en la sección de antecedentes, la detección histoquímica de diaforasa del óxido nítrico Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH-d), se utiliza como un marcador para las neuronas que sintetizan NO. La distribución de esta enzima se detectó mediante la reacción de la enzima  $\beta$ -NADPH por la reducción del colorante azul de nitrotetrazolio como se describe en la sección de material y métodos.

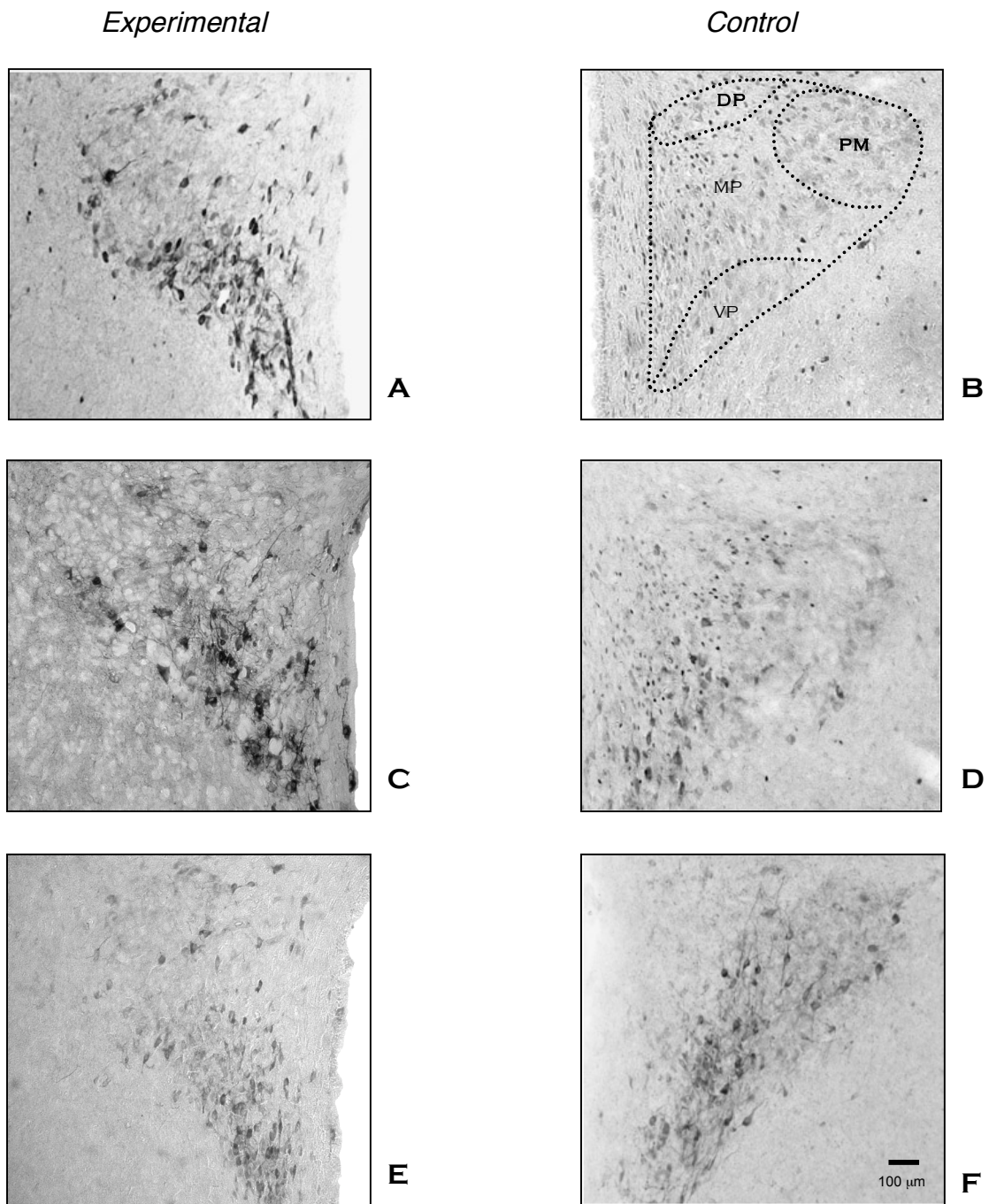
Los resultados de la histoquímica para NADPH-d muestran que después del reto inmunológico (OVO), el marcaje para esta enzima se observa en las neuronas de la región parvocelular ventral del PVH de los animales en diestro. Esta región contiene principalmente neuronas que producen CRH, OT y VP, proyectan hacia centros autonómicos del tallo cerebral y la médula espinal (Figuras 9-A y 11). El grupo control de esta condición, no mostró expresión de la diaforasa (Figura 9-B). En el PVH de las ratas lactantes se observó la marca alrededor de la región magnocelular, que se sabe contiene a las neuronas de OT y VP que proyectan a la eminencia media. Sin embargo, ésta fue más intensa en la región parvocelular dorsal y ventral (Figuras 9-C, 11). El grupo control sólo presentó marca en algunas neuronas de la región parvocelular medial (Figura 9-D). En la figura 9-E puede observarse la reactividad a  $\beta$ -NADPH en el PVH de las hembras OVX, las cuales presentaron una densa población de células teñidas en la región parvocelular ventral después del reto inmunológico, la Figura 9-F muestra el grupo control, en el que se observa un marcaje similar en intensidad y localización al experimental.

De manera similar al reto inmunológico, el agente excitotóxico provocó una densa reactividad a  $\beta$ -NADPH en el PVH del grupo en diestro, distribuida de manera dispersa en las diferentes regiones del PVH (Figuras 10-A y 11), y el grupo control no presentó ninguna marca aparente (Figura 10-B). En el grupo de las ratas lactantes (Figura 10-D),

se observa un marcaje intenso en la región parvocelular, particularmente en la porción ventral y alrededor de la región magnocelular, en el área donde se localizan las neuronas oxitocinérgicas. A un lado se muestra una imagen representativa del PVH del grupo control (Figura 10-D), en donde sólo unas neuronas de la porción parvocelular presentaron el marcaje.

En la Figura 10-E se muestra una imagen del PVH de ratas OVX, donde se observa que el marcaje para la diaforasa fue más intenso en las regiones medial y ventral parvocelular, así como también se localizó en las neuronas alrededor de la región magnocelular, presumiblemente por su localización, éstas corresponden a neuronas oxitocinérgicas. En comparación con los controles de las otras dos condiciones experimentales, en el grupo control de las OVX se encontró una marca más intensa para la NADPH-d, la cual se localizó en la región ventral parvocelular (Figura 10-F).

Expresión de NADPH-d en el PVH después del reto inmunológico

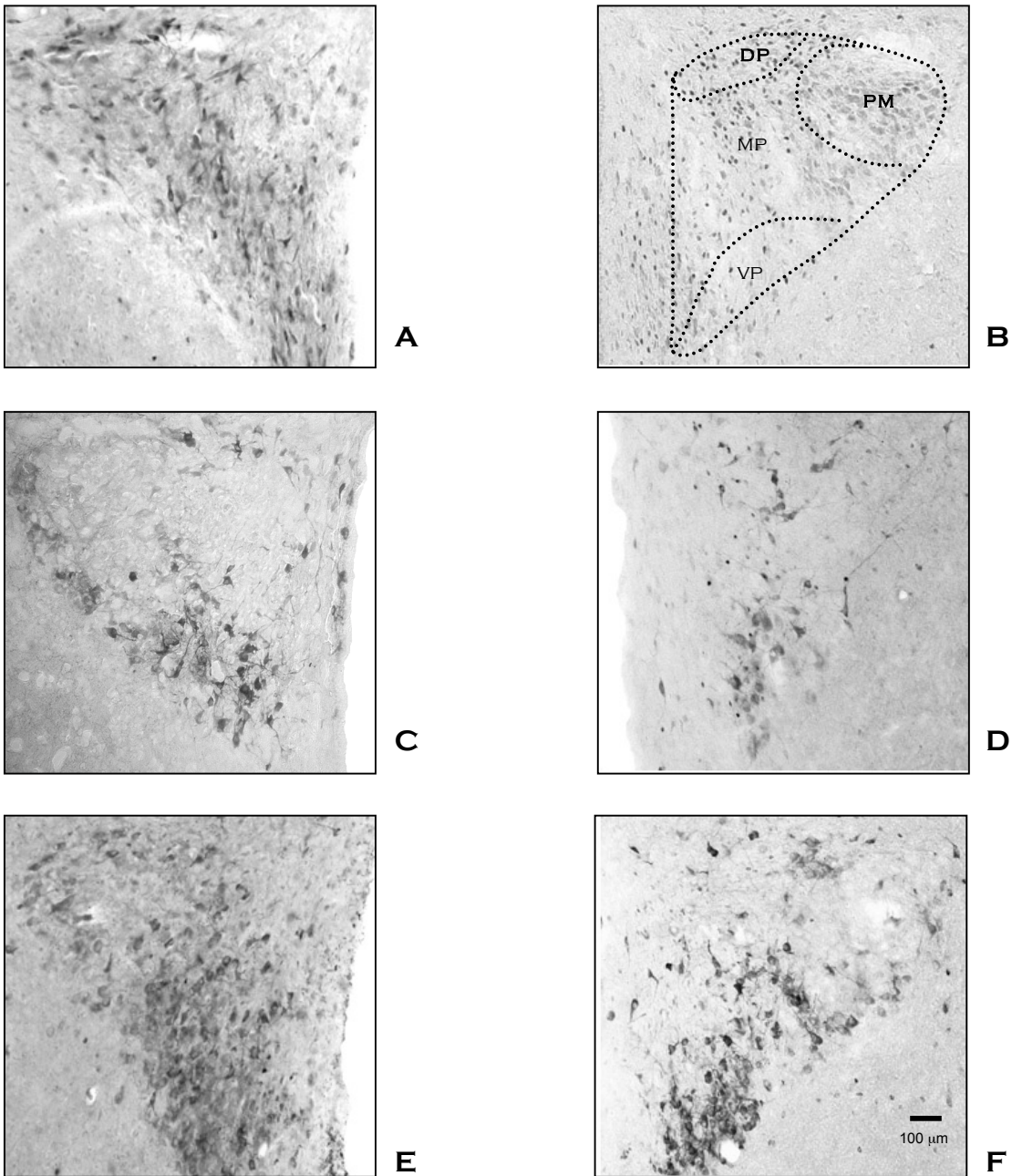


**Figura 9. Efecto de la administración de ovoalbúmina sobre la expresión de NADPH en el PVH.** Fotomicrográficas representativas que muestran la reactividad a  $\beta$ -NADPH en el PVH de ratas en Diestro (A), Lactantes (C) y OVX (E) 3 h después del reto inmunológico con ovoalbúmina (5 ml/Kg.); ratas control a las que se les aplicó solución salina isotónica en Diestro (B), Lactantes (D) y OVX (F). Objetivo 20X. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular, PM; posterior magnocelular.

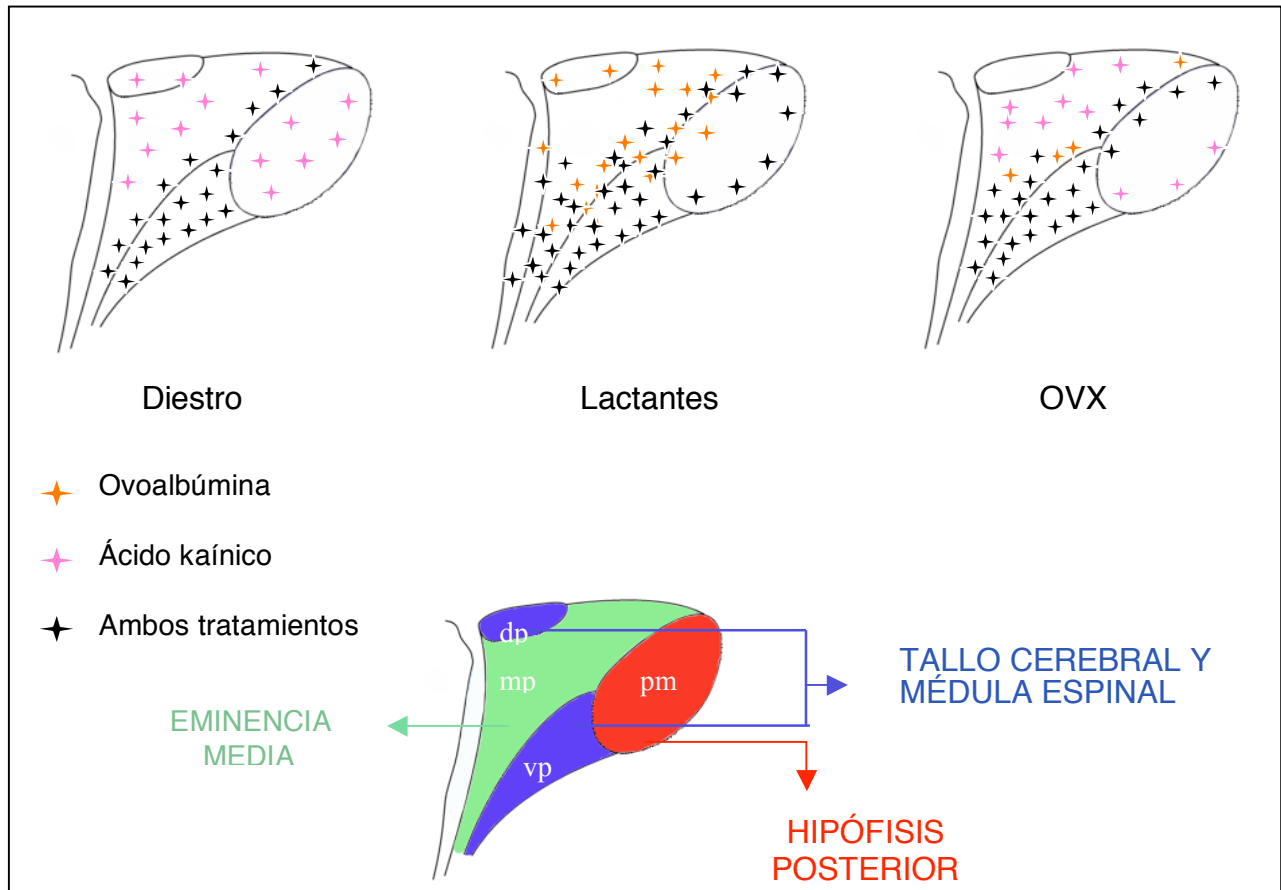
Expresión de NADPH-d en el PVH después del reto excitotóxico

*Experimental*

*Control*



**Figura 10. Efecto de la administración de KA sobre la expresión de NADPH en el PVH.** Fotomicrografías representativas que muestran la reactividad a  $\beta$ -NADPH en el PVH de ratas en Diestro (A), Lactantes (C) y OVX (E) 24 h después del reto excitotóxico con KA (5 ml/Kg.); ratas control a las que se les aplicó solución salina isotónica en Diestro (B), OVX (D) y Lactantes (F). Objetivo 20X. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.



**Figura 11. Localización de NADPH en el PVH después de los tratamientos experimentales.** El diagrama muestra las regiones que mostraron una mayor densidad de células reactivas a NADPH ante los diferentes retos. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.

## **8.2 Sintetasas del óxido nítrico**

Con el propósito de determinar si la señal de la histoquímica para NADPH observada en el PVH se correlaciona con la presencia de sintetasa del NO neuronal (nNOS) o inducible (iNOS), se realizó la detección inmunohistoquímica de estas dos enzimas mediante el método de la peroxidasa descrito en la sección de material y métodos. En este procedimiento se analizó la expresión de la forma constitutiva nNOS, la forma comúnmente expresada en neuronas, así como también de la forma inducible de esta enzima iNOS, la cuál se ha asociado con procesos inflamatorios y que en el cerebro se puede encontrar tanto en neuronas como en glía.

La marca para nNOS en el PVH de ratas en diestro después del reto inmunológico se observó distribuída en la región parvocelular del PVH de los animales en diestro. Esta región contiene principalmente neuronas que producen CRH, TRH, OT y VP, que proyectan hacia la eminencia media, centros autonómicos del tallo cerebral y la médula espinal (Figura 12-A). En el caso del grupo control de ratas en diestro, las células positivas a nNOS fueron escasas y se localizaron en la región parvocelular del PVH (Figura 12-B). En el PVH de las ratas lactantes se observó la marca alrededor de la región magnocelular, que por su localización se sabe que corresponde a las neuronas de OT que proyectan al lóbulo posterior de la hipófisis. Sin embargo, ésta fue más intensa en la región parvocelular dorsal y ventral (Figura 12-C). En el grupo control se presentó marcaje disperso en las neuronas de la región parvocelular del PVH (Figura 12-D). En la figura 12-E puede observarse la reactividad a nNOS en el PVH de ratas OVX en la población de células de la región parvocelular ventral después del reto inmunológico. La figura 12-F muestra el PVH del grupo control, en el que se observa un marcaje de mayor intensidad y de localización similar al experimental.

El tratamiento excitotóxico provocó una densa reactividad a nNOS en las células de la región ventral parvocelular del PVH del grupo en diestro (Figura 13-A), y el grupo control presentó una marca escasa en la misma región del PVH que el grupo experimental (Figura 13-B). En el PVH de las ratas lactantes (Figura 13-C), la reactividad a nNOS se observa un marcaje intenso en la región parvocelular, particularmente en la porción ventral y en algunas células de la región magnocelular. En la imagen representativa del PVH del grupo lactante control (Figura 13-D), se pueden ver las células positivas en las tres regiones de la porción parvocelular, particularmente en la región ventral.

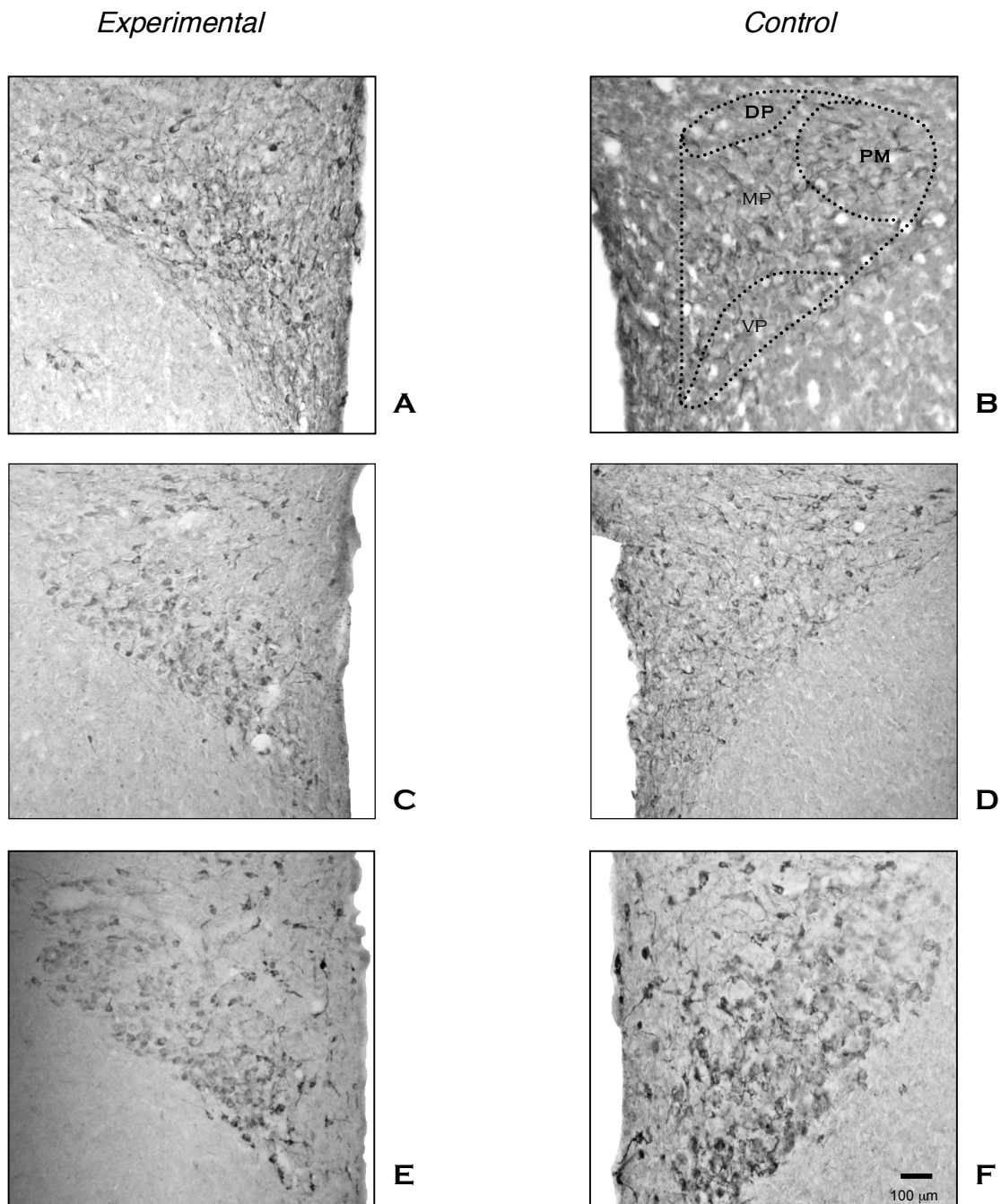
En la Figura 13-E se observa una imagen del PVH de ratas OVX, donde la reactividad a la sintetasa fue más intensa en las regiones medial y ventral parvocelular, así como también se localizó en las neuronas alrededor de la región magnocelular. El control de esta condición muestra la marca de forma escasa y esparcida por la subdivisión parvocelular (Figura 13-F).

La expresión de nNOS en el PVH, en las tres condiciones experimentales usadas, se localizó en las mismas regiones neuronales en las que se observa la señal para NADPH, aunque de intensidad diferente, dependiendo de la condición experimental.

Con respecto a la iNOS, los resultados muestran que ante el reto inmunológico, únicamente en ratas en diestro se observan células positivas a iNOS de manera clara en el PVH (Figuras 14-A a 14-F). Esta expresión se localizó en la región magnocelular y parvocelular ventral del PVH (Figuras 14-A y 14-B). Las Figuras 15-A a 15-F muestran que 24 h después de la inyección de KA, tampoco se indujo la expresión evidente de iNOS en ninguna de las tres condiciones. Sin embargo, esta expresión se localizó de manera dispersa en el PVH de animales en diestro a los que se perfundió 90 minutos después de la inyección de KA (Figura 16-A).

## 8.2.1 nNOS

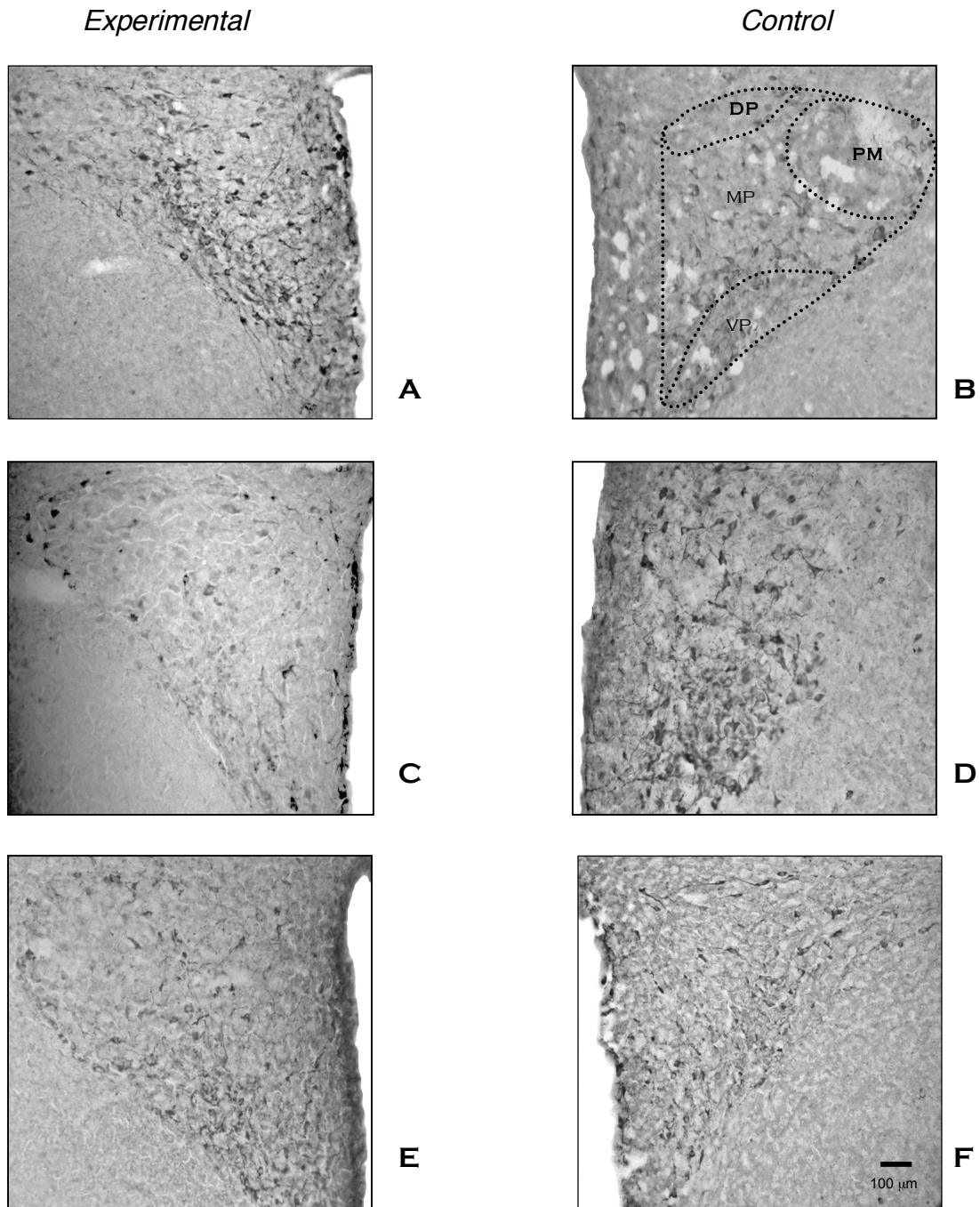
### Expresión de nNOS inducida por la administración de ovoalbúmina



**Figura 12. Efecto de la administración de ovoalbúmina sobre la expresión de nNOS en el PVH.** Fotomicrografías representativas del PVH de ratas en Diestro (A), Lactantes (C) y OVX (E) 3 h después del reto inmunológico con ovoalbúmina (5 ml/kg); ratas control a las que se les aplicó solución salina isotónica en Diestro (B), Lactantes (D) y OVX (F). Objetivo 20X. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.



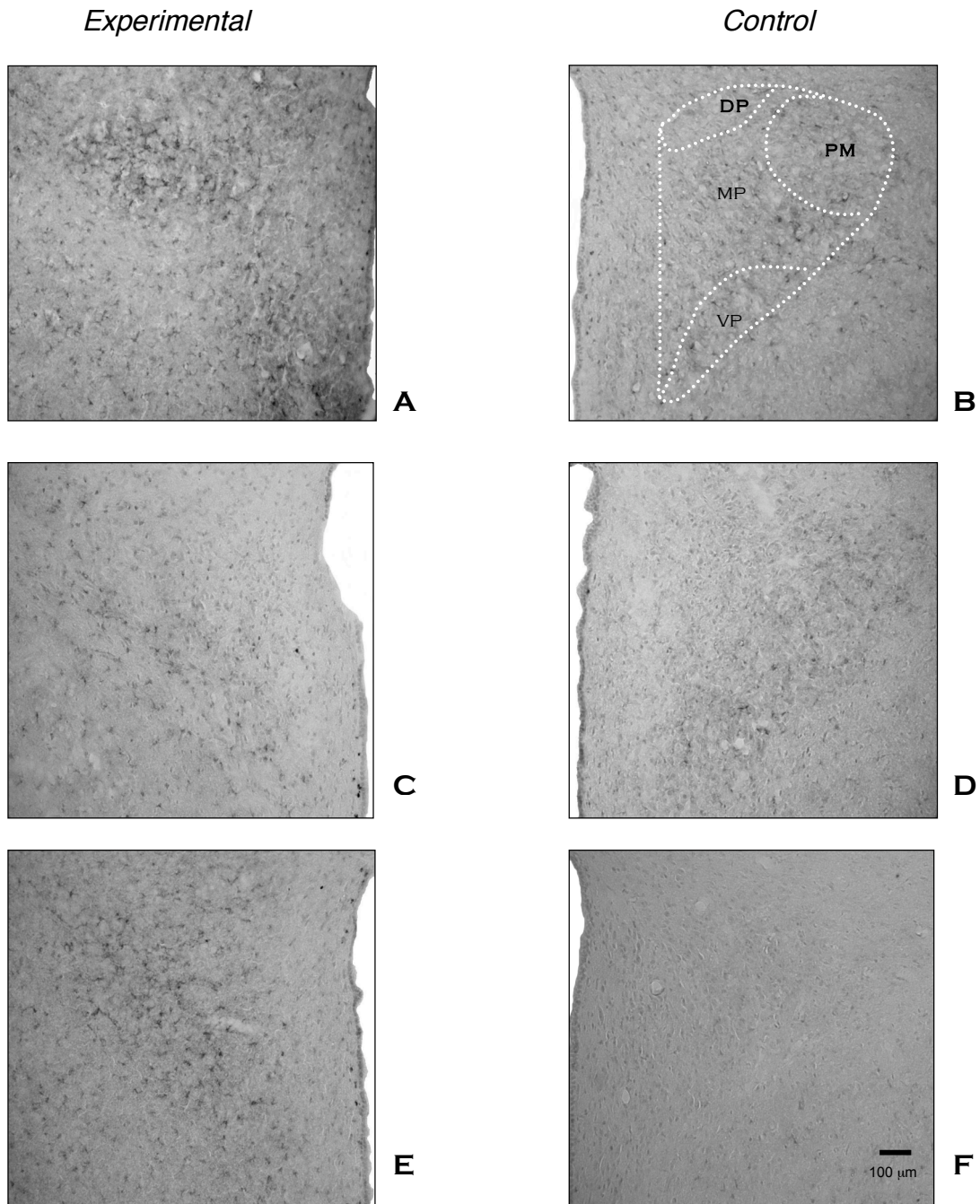
Expresión de nNOS después del reto excitotóxico



**Figura 13. Efecto de la administración de KA sobre la expresión de nNOS en el PVH.** Fotomicrografías representativas del PVH de ratas en Diestro (A), Lactantes (C) y OVX (E) 24 h después del reto excitotóxico con KA (5 ml/Kg.); ratas control a las que se les aplicó solución salina isotónica en Diestro (B), Lactantes (D) y OVX (F). Objetivo 20X. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.

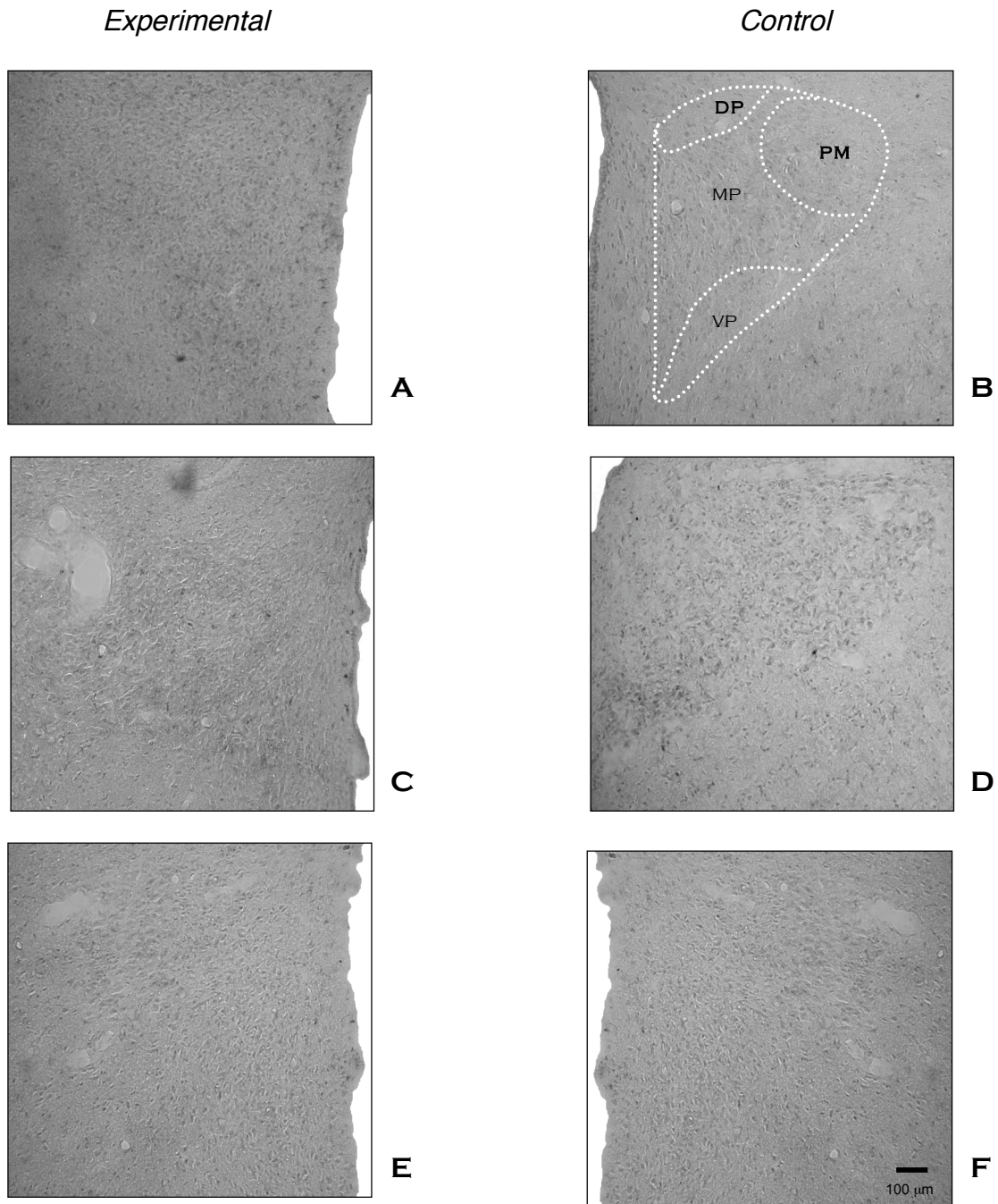
## 8.2.2 iNOS

### Expresión de iNOS después del reto inmunológico



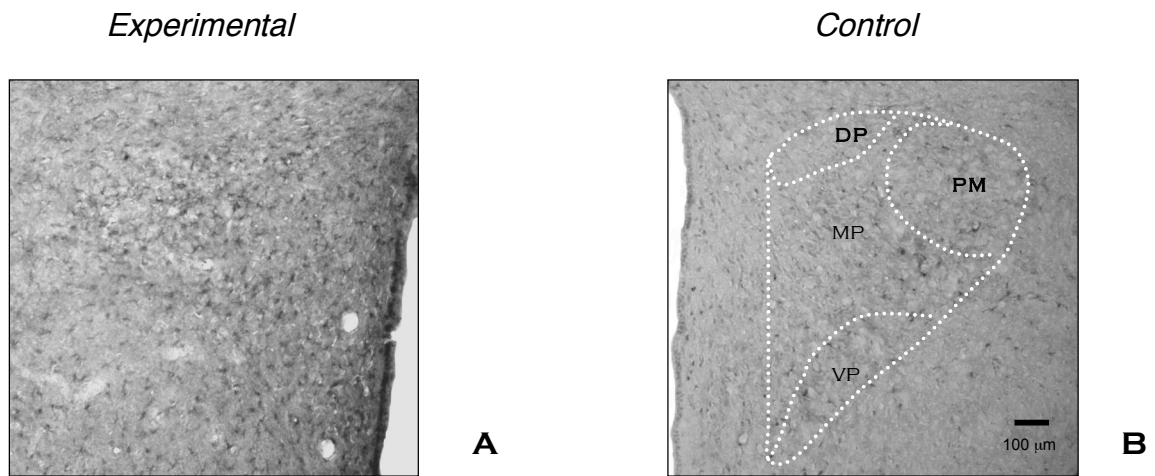
**Figura 14. Efecto de la administración de ovoalbúmina sobre la expresión de iNOS en el PVH.** Fotomicrografías representativas del PVH de ratas en Diestro (A), Lactantes (C) y OVX (E) 3 h después del reto inmunológico con ovoalbúmina (5 ml/kg); ratas control a las que se les aplicó solución salina isotónica en Diestro (B), Lactantes (D) y OVX (F). Objetivo 20X. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.

Expresión de iNOS inducida por la administración de ácido kaínico



**Figura 15. Efecto de la administración de KA sobre la expresión de iNOS en el PVH.** Fotomicrografías representativas del PVH de ratas en Diestro (A), Lactantes (C) y OVX (E) 24 h después del reto excitotóxico con KA (5 ml/Kg.); ratas control a las que se les aplicó solución salina isotónica en Diestro (B), Lactantes (D) y OVX (F). Objetivo 20X. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.

Expresión de iNOS inducida por la administración de ácido kaínico



**Figura 16. Efecto de la administración de KA sobre la expresión de iNOS en el PVH.** Fotomicrografías representativas del PVH de ratas en diestro, 90 min después del reto inmunológico con ovoalbúmina (5 ml/kg) (A); y después de la inyección de solución salina isotónica (B). Objetivo 20x. DP, dorsal parvocelular; MP, medial parvocelular; VP, ventral parvocelular; PM, posterior magnocelular.

### **8.3 Nitritos y nitratos**

#### Determinación de Nitritos y nitratos

La determinación de nitratos y nitritos se utiliza ampliamente como un índice de la cantidad de NO (NOx) producida a partir de la conversión enzimática de nitratos a nitritos, basándose en la reacción de Griess. En este trabajo de tesis se realizó esta determinación en muestras de hipotálamo de cada condición, los cuales se procesaron para realizar la determinación de NOx con un Kit comercial.

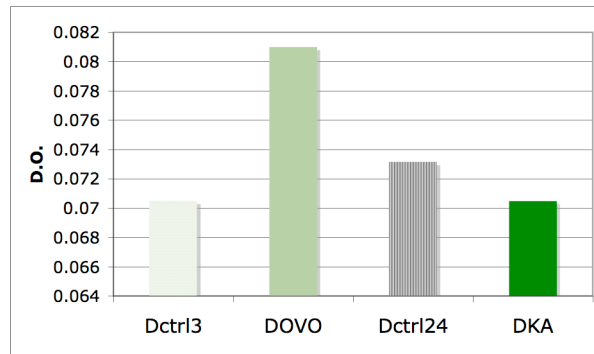
Las figuras 17 a la 19 muestran los valores de densidad óptica derivados del ensayo de nitritos/nitratos. Sin embargo, estas mediciones deben ser tomadas con reserva ya que no se pudo determinar la concentración de NOx. Uno de los reactivos del kit adquirido se degradó y se sustituyó con otro por separado, lo cuál limitó las mediciones de la curva estándar. No obstante este contratiempo, los valores de densidad óptica nos dan una idea de la tendencia en las determinaciones de NO. Además, el segmento de la curva que sí se obtuvo quedó dentro de los valores esperados de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit.

Los resultados obtenidos mostraron que en ratas en diestro se observa una tendencia hacia el aumento en los valores de densidad óptica para los grupos experimentales, en comparación con su control correspondiente. Este aumento fue más evidente para el grupo que recibió el tratamiento con ovoalbúmina (Figura 17). Sin embargo, la determinación de NOx en animales sacrificados 24 h después del tratamiento no muestra diferencias claras, ya que los grupos control mostraron una tendencia al aumento sobre los experimentales.

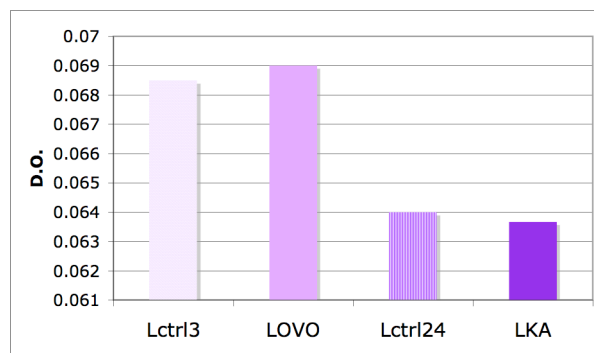
En el caso de las hembras lactantes también se observa una tendencia hacia el aumento en los valores de densidad óptica en el grupo tratado con OVO, sin embargo el valor del grupo control de 3 h fue muy cercano. Los resultados del grupo tratado con

KA, mostraron un valor más bajo, similar a su grupo control correspondiente (Figura 18). Los valores de densidad óptica obtenidos de los animales OVX fueron muy cercanos entre los grupos experimentales, así como con respecto a sus controles (Figura 19).

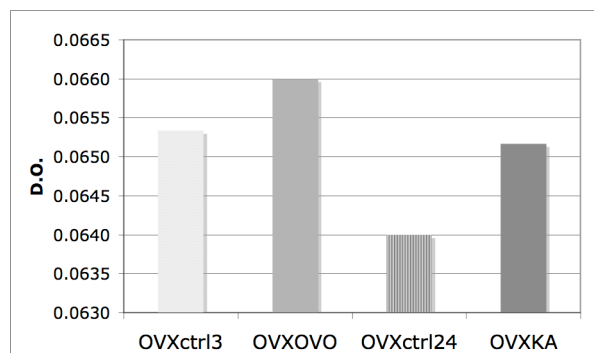
### Determinación de nitratos y nitritos



*Figura 17. Densidad óptica obtenida del ensayo de nitratos y nitritos en homogenados de PVH del grupo en diestro.*



*Figura 18. Densidad óptica obtenida del ensayo de nitratos y nitritos en homogenados de PVH del grupo de madres lactantes.*



*Figura 19. Densidad óptica obtenida del ensayo de nitratos y nitritos en homogenados de PVH del grupo OVX.*

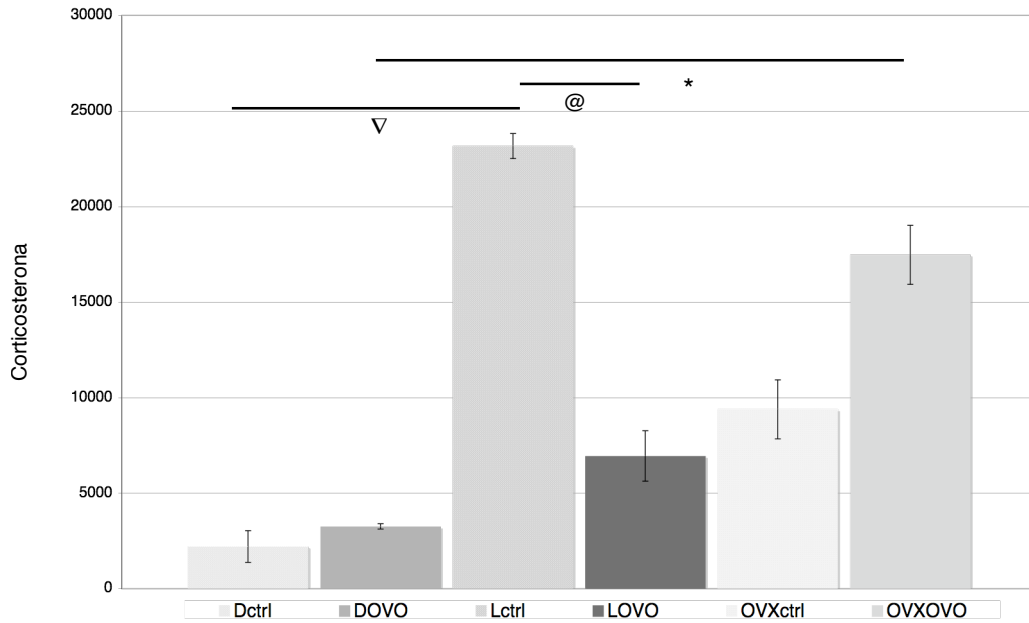
#### **8.4 Concentración de Corticosterona plasmática**

La respuesta neuroendocrina al estrés se genera mediante la activación del eje HPA, lo que resulta en el aumento de niveles circulantes de la corticosterona (CORT). Por lo cual, con el fin de determinar las diferencias en la respuesta hormonal inducida por KA o ovoalbúmina, se cuantificó la concentración de CORT circulante en plasma de los animales en las diferentes condiciones experimentales, mediante un kit comercial que utiliza el método de inmunoensayo competitivo.

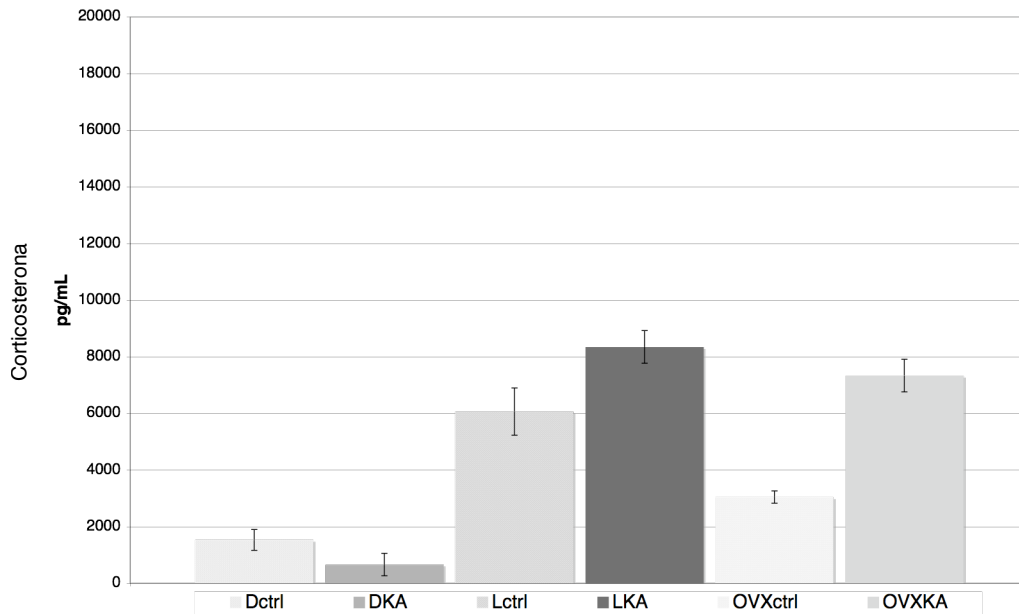
Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en el grupo control de las ratas lactantes con respecto al experimental, lo cual concuerda con la noción previa acerca del incremento en el nivel basal de CORT durante la lactancia. En contraste, el grupo de ratas lactantes tratado con OVO, no presentó un aumento en la concentración de CORT significativo ante el reto inmunológico. El grupo de ratas en diestro, no mostró modificaciones en la concentración de CORT plasmática inducido por el tratamiento con OVO. Los animales OVX, presentaron un aumento significativo en la concentración de CORT en el grupo experimental con respecto al grupo control. Sólo se observaron diferencias en la concentración de CORT entre las condiciones OVX y en diestro (Figura 20).

En la Figura 21 se muestran los cambios en la concentración de CORT en las tres condiciones ante el reto excitotóxico. A pesar de que los resultados no mostraron ser estadísticamente diferentes, se puede observar una tendencia hacia el aumento en la concentración de CORT en los grupos experimentales, tanto en las ratas lactantes como en las OVX. Como se había observado a las 3h, en el grupo control de ratas lactantes se sigue observando, 24 h después del tratamiento, una concentración más elevada con respecto a los controles de las otras dos condiciones.

### Cuantificación de Corticosterona



**Figura 20. Concentración de corticosterona plasmática en respuesta al reto inmunológico.** La gráfica muestra las medias y E.E de cada grupo. Los valores expresados como media  $\pm$  E.E.M., n= 5 por grupo. LOVO vs LCtrl3 @P< 0.05, OVXOVO vs DOVO \*P<0.01, DCtrl3 vs. LCtrl3  $\nabla$  P< 0.001.



**Figura 21. Concentración de corticosterona plasmática en respuesta al reto excitotóxico.** La gráfica muestra las medias y E.E.M de cada grupo.



## 9 Discusión

La lactancia tiene características particulares que la hacen un modelo de investigación invaluable. Esta fase del ciclo reproductivo se acompaña no sólo de cambios neuroendócrinos, conductuales y metabólicos, sino también de una notable disminución de la respuesta neuroendocrina al estrés.

Durante la lactancia, ocurren adaptaciones funcionales específicas del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), que se reflejan en la pérdida de la secreción circádica de corticosterona y en la disminución de las respuestas neuroendocrinas inducidas por una variedad de estímulos estresantes. Al respecto se ha propuesto que la falta de respuesta ante estímulos estresantes durante la lactancia, es el resultado de mecanismos adaptativos que ocurren en diferentes regiones cerebrales, entre ellas, la reducción de la actividad de las vías aferentes al PVH y una modulación diferencial de la activación del PVH.

En esta tesis se analizó el efecto de la inyección de ovoalbúmina, como estímulo estresante (reto inmunológico), y de ácido kaínico, como reto excitotóxico, sobre la respuesta activacional del PVH en tres condiciones hormonales diferentes: ratas en diestro, ratas a la mitad de la lactancia y ratas ovariectomizadas. Como índice de activación neuronal se utilizó la detección inmunohistoquímica del producto proteínico del gen de respuesta inmediata c-Fos. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada como una herramienta de mapeo para identificar células y circuitos que son activados en respuesta a diversos estímulos. En las neuronas, el nivel de expresión basal de este gen es baja y su expresión puede ser inducida por un estímulo en un intervalo de tiempo relativamente corto (30 minutos después del estímulo), por lo que ha sido utilizado en diversos estudios en el campo del estrés (da Costa y col., 1996 y 1997; Kovács y Sawchenko, 1996; Kovács, 1998; Földes y col., 2000).

Para cada tratamiento se determinaron diferentes tiempos de experimentación. En estudios anteriores se ha mostrado que la máxima expresión de c-Fos en respuesta a la inyección de ovoalbúmina intravenosa es de 2 horas después del tratamiento (Földes y col, 2000). Sin embargo, ya que el estudio fue realizado en machos y por una vía de acceso directo al sistema inmunológico, se determinaron 3 horas como el tiempo adecuado para la inducción de la respuesta por vía intraperitoneal para las madres lactantes. Los resultados obtenidos con este reto muestran un aumento significativo en la expresión de Fos en el PVH de ratas en diestro o ratas OVX, con respecto a las lactantes. Este aumento concuerda con resultados previos que mostraron que la administración de LPS no incrementa significativamente el nivel de activación de las neuronas del PVH de ratas lactantes (Shanks y col., 1999).

La distribución de la marca de la inmunoreactividad a Fos en el PVH de animales en diestro y lactantes se localizó exclusivamente en la región parvocelular del PVH, que se sabe contiene a las células que producen CRH y envían sus proyecciones hacia la eminencia media (Sawchenko y Swanson, 1983). En el PVH de los animales OVX la marca estuvo distribuida de manera dispersa por el PVH, incluyendo tanto la región parvocelular como la magnocelular. Los autores que han utilizado la administración de ovoalbúmina como reto inmunológico, reportan una activación principalmente en la región magnocelular del PVH de ratas macho, colocalizada con neuronas de VP y OT (Földes y col., 2000).

Sin embargo, en nuestro estudio sólo se observó activación en la región magnocelular del PVH en hembras OVX, que carecen de  $E_2$  y P, en contraste, el PVH de las hembras en diestro y de las lactantes únicamente mostró activación en la región parvocelular. Dado que en estas dos últimas condiciones hormonales prevalecen niveles bajos de  $E_2$  y existe un aumento de P, los presentes resultados indican que ante este reto, el nivel de estas hormonas gonadales no sea un factor determinante para la activación de la respuesta.

Aunque no se evaluó la reacción sistémica o conductual ante este tratamiento, vale la pena mencionar que tanto las ratas en diestro como OVX presentaron los síntomas anafilactoides descritos para este reto (Földes y col., 2000), caracterizados por edema en las patas y rascado alrededor del hocico. Sin embargo, las ratas lactantes no presentaron ningún síntoma aparente, lo cual sugiere que la respuesta ante el estrés inmunológico que empleamos en estos estudios está atenuada y se corrobora con la escasa activación observada en el PVH.

Los resultados muestran, que el reto excitotóxico provoca un aumento significativo en la expresión de Fos en el PVH preferentemente de ratas en diestro con respecto a los animales lactantes. Lo cual coincide con estudios previos en los que se ha reportado que la respuesta hipotalámica (Pohl y col., 1989; Lee y col., 1993), hipocampal y cortical (Abbud y col., 1992) hacia los aminoácidos excitadores disminuye durante la lactancia y se ha sugerido que esta reducción depende de la succión, la expresión de receptores a kainato y el nivel de la P (Abbud y col., 1993).

En estos resultados, de manera similar a los obtenidos con el reto inmunológico, la distribución de la inmunoreactividad a Fos en el PVH de las ratas en diestro y de las lactantes estuvo delimitada a la región parvocelular del PVH. Lo cual sugiere que, de manera independiente a la vía de señalización que utilizan las sustancias para llegar al PVH y activarlo, las células que responden en este núcleo hipotalámico son las que ejercen su influencia sobre centros autonómicos y la eminencia media.

Sin embargo en los animales OVX, al igual que con la inyección de OVO, observamos que la respuesta de activación neuronal inducida por KA se presentó en la región parvocelular y magnocelular del PVH. También en este paradigma de daño excitotóxico, fueron las ratas lactantes las que presentaron un menor número de células reactivas a Fos. Con este reto, las ratas de las tres condiciones mostraron un aumento

significativo de células reactivas a Fos, con respecto a sus controles. Este resultado muestra que, a pesar de la detección de Fos en las células del PVH de las hembras lactantes, ésta no resulta en la cascada de activación de los componentes del eje HPA.

En las ratas en diestro y en las OVX, esta respuesta de activación neuronal estuvo acompañada de algunas expresiones conductuales como sacudidas de perro mojado y levantamientos de las extremidades superiores, que son manifestaciones estereotipadas del daño excitotóxico por ácido kaínico; estas conductas no se observaron en las ratas lactantes. Si bien, no se realizó una evaluación sistemática de la conducta, estas observaciones representan un dato que concuerda con los resultados obtenidos del procesamiento inmunohistoquímico del PVH.

Con la cuantificación del número de células positivas a Fos en el PVH, se determinó que las ratas en diestro muestran la mayor respuesta a ambos retos, seguida de las ratas OVX y en menor grado las lactantes. No obstante que el nivel basal de Fos en los grupos control de lactantes es más alto que el de los otros grupos control, se observó un aumento en respuesta al reto. Este resultado sugiere que, al contrario de muchos de los paradigmas de estrés reportados en la literatura (Neumann, 2001), el sistema inmunológico y por tanto la respuesta del PVH ante tal reto, no se encuentra del todo abolida.

Por otro lado, con respecto al incremento en la activación neuronal del PVH de ratas OVX, cabe la posibilidad de que en parte se deba a que el sistema inmunológico de estos animales se mantuvo reactivo después del procedimiento quirúrgico de la ovariectomía.

Ante el reto excitotóxico, se encontró un aumento de varios órdenes de magnitud en el número de células reactivas a Fos en el PVH de ratas en diestro en comparación con

su propio control y con las ratas lactantes. En este mismo grupo, el tratamiento con ácido kaínico indujo una mayor activación de las neuronas del PVH que con el reto inmunológico. Estos resultados muestran que la activación del PVH de la madre lactante ante los retos presentados, no es diferente, y existe una respuesta limitada a las neuronas parvocelulares del PVH.

Con la finalidad de conocer la distribución inicial y la inducida por los diferentes tratamientos de las neuronas que sintetizan NO en el PVH de ratas en las diferentes condiciones hormonales utilizadas, en este trabajo se realizó la detección histoquímica para la diaforasa del óxido nítrico (NADPH-d). Al respecto, nuestros resultados muestran una evidente inducción de la NADPH-d por los tratamientos en el PVH de animales lactantes y OVX en comparación con las ratas en diestro. Sin embargo, también se observan células teñidas en el PVH de animales lactantes y OVX del grupo control, resultados que coinciden con experimentos previos en los que se ha reportado que la lactancia o la ovariectomía inducen un aumento en el nivel basal de la diaforasa (Otukonyong y col., 2000; Popeski y col., 2001). En este sentido, se ha mostrado que la ausencia de hormonas gonadales tienen un efecto en la regulación de la expresión de esta enzima en la síntesis de NO, no obstante la relación que existe entre el NO y las hormonas gonadales es hasta la fecha controversial. Al respecto, se ha mostrado en hembras OVX, que cuando se les aplica una terapia de reemplazo con E2 y P, y eventualmente se les retira la P, éstas presentan un incremento en la expresión de la diaforasa en el PVH (Popeski y col., 1999), con una distribución e intensidad similar a la que se observa en los presentes resultados para los animales lactantes u OVX. Con respecto a la lactancia, existen estudios en los que se ha mostrado un incremento en la presencia de la NADPH-d durante esta fase, en uno de los cuales además, sugieren que este aumento es dependiente del estímulo continuo de la succión (Otukonyong y col., 2000). Los resultados obtenidos en este trabajo, concuerdan con estos estudios previos tanto en el aumento de la expresión de la enzima, así como en las regiones del PVH en la que se localizan las neuronas positivas a la NADPH-d.

Si bien, la producción de NO es un proceso que se genera de manera natural, existen condiciones fisiológicas y patológicas en las que éste se sintetiza de manera exacerbada. Con la finalidad de conocer el tipo de sintetasa a partir de la cuál se genera el NO durante la lactancia, y que se indujo a partir de los dos tratamientos experimentales empleados, se realizaron detecciones inmunohistoquímicas para iNOS y nNOS (Esplugues, 2000). La expresión de nNOS se ha relacionado con una gran variedad de mecanismos, que van desde los asociados con el envejecimiento natural, las patologías neurodegenerativas, procesos de memoria, neurodesarrollo y neuroprotección. En los presentes resultados, se encontró una mayor expresión de nNOS durante la lactancia, incluidas las regiones magnocelular y parvocelular del PVH, lo cuál concuerda con reportes previos en los que se registra un incremento en el mRNA de nNOS en el PVH durante la lactancia (Cecatelli y col., 1996).

Una de las modificaciones que se observan en la expresión de nNOS en el PVH, es la localización de neuronas positivas entre los animales tratados y los controles en las tres diferentes condiciones utilizadas. En los controles, la distribución de la marca aparece sin una regionalización específica, al contrario de los grupos experimentales en los que independientemente del tipo de tratamiento y condición hormonal, las neuronas positivas a nNOS, en general, se concentran en las regiones ventral y medial parvocelular del PVH. Será necesario realizar una doble tinción histoquímica para NADPH-d e inmunohistoquímica para nNOS para determinar el grado de coincidencia de estos dos marcadores de neuronas de NO que también son denominadas nitrérgicas.

Al hacer una comparación entre los mapas de distribución en el cerebro de las neuronas que son positivas para nNOS y las que muestran actividad para la NADPH-d, la correlación de ambas no es tan clara (Vincent y Kimura, 1992; Rodrigo y col., 1994). En muchos núcleos, tal como se ha señalado (Hope y col., 1991), todas las neuronas que contienen actividad NADPH-d también son positivas para nNOS, haciendo posible

que la actividad NADPH-d esté presente en neuronas activamente productoras de NO y que las técnicas tanto inmunocitoquímicas como histoquímicas den resultados semejantes. No obstante, también existen núcleos y neuronas concretas que sólo muestran inmunoreactividad para nNOS y no la actividad NADPH-d, lo que ha llevado a pensar en la posibilidad de que este tipo de núcleos o neuronas inmunopositivas, cuando carecen de actividad NADPH-d podrían ser consideradas como neuronas silentes en cuanto a la producción de NO (Rodrigo y col., 1994). En la actualidad estos datos continúan confirmándose en diferentes situaciones experimentales, demostrándose que existen neuronas que tienen nNOS que no muestran actividad NADPH-d, tal como se observó en las neuronas del PVH de las hembras lactantes y OVX, y como se ha reportado que ocurre en la corteza cerebral de ratas viejas o sometidas a hipoxia/isquemia-reperfusión, donde se observa que aparecen un número elevado de neuronas que expresan nNOS pero que son negativas para la actividad NADPH-d (Rodrigo y col., 2001).

Con respecto a la iNOS, la sintetasa inducible o relacionada con el sistema inmunológico que se expresa a partir de procesos inflamatorios y cuya activación se ha relacionado con procesos de neurodegeneración y muerte neuronal por excitotoxicidad (Moro y col., 1998), la inmunohistoquímica para iNOS no mostró expresión de esta enzima en el PVH de ratas de los diferentes grupos experimentales ante el reto inmunológico. Incluso, tampoco es evidente la presencia de esta enzima, después de la inducción del daño excitotóxico salvo en el PVH de los animales en diestro. Con base en estos resultados, y dado que iNOS se considera una de las principales fuentes de NO ante cualesquiera de los retos utilizados en este trabajo, se decidió aplicar el tratamiento de KA por 90 minutos en animales en diestro. Los resultados de este experimento muestran una intensa expresión de iNOS distribuída de manera dispersa en el PVH. Este resultado indica que los intervalos utilizados a partir de los retos aplicados no fueron adecuados para detectar la expresión de iNOS, ya que si el estímulo no persiste, el organismo tiende a regular la sobreproducción de NO.

Con la finalidad de conocer la contribución de los cambios observados en la expresión de NADPH y nNOS, sobre la producción total de NO, se realizó una determinación enzimática de la conversión de nitratos a nitritos como índice de producción de NO. Si bien, esta determinación estuvo limitada por cuestiones metodológicas del kit utilizado, y a pesar de que las muestras procesadas contenían todo el hipotálamo, incluido el PVH, los datos obtenidos muestran una relación con los resultados acerca de la expresión en el PVH de NADPH y NOS.

En este sentido, la tendencia hacia el aumento que se observa en los valores de densidad óptica para los grupos tratados con ovoalbúmina, coincide con la mayor densidad de células positivas a NADPH y nNOS. Para el caso de las hembras lactantes no se distinguen cambios evidentes entre los valores de densidad óptica entre los grupos experimentales y sus respectivos controles, lo cual concuerda con la expresión que se observó en el PVH de NADPH y nNOS. Sin embargo, la relación entre los parámetros cualitativos de las enzimas y los valores de densidad óptica para NO, en el caso del tratamiento con KA, no son claros. Es probable que estos resultados estén influidos por el tiempo entre la inyección de KA y la determinación de NO, ya que dicho intervalo pudo ser demasiado prolongado para distinguir cambios con respecto a sus controles respectivos.

Esta misma influencia del tiempo en la toma de las muestras podría aplicar en el caso de las determinaciones de CORT plasmática. La respuesta al estrés se genera mediante la activación del eje HPA, lo que resulta en el aumento de niveles circulantes de las hormonas reactivas al estrés, como la CORT, en los minutos siguientes al estímulo. Por lo cuál, con el fin de determinar la intensidad y las diferencias en la respuesta al estrés inducida por la inyección de un agente excitotóxico, como el ácido kaínico, o de un antígeno, como la ovoalbúmina, se cuantificó la concentración de CORT.



Se sabe que durante la lactancia prevalece un nivel relativamente alto y estable de secreción de glucocorticoides (Jonhstone y col., 2000), lo cuál se refleja en los presentes resultados donde se aprecia una concentración más elevada para los controles de las ratas lactantes que para los controles de las hembras en diestro u OVX. Sin embargo, se observan diferencias en este grupo en función del tiempo que transcurrió entre la inyección de solución salina y la toma de la muestra.

Además, puede observarse una tendencia hacia el aumento de concentración de CORT en los grupos experimentales, tanto en las hembras lactantes como en las OVX. De hecho, el nivel basal de las ratas lactantes está elevado en las controles de 3 h y 24 h, en comparación con las controles de las otras condiciones. La concentración de CORT que se observa después de los retos en las diferentes condiciones utilizadas en este trabajo, sugiere que la inyección de ovoalbúmina es el tratamiento que genera una respuesta al estrés estereotipada, no así la inyección de ácido kaínico, aún cuando ambos tratamientos inducen la activación celular en las mismas regiones del PVH.

Sin embargo, la relación entre la respuesta neuroendocrina al estrés y la CORT, va más allá de una relación directa entre activación de las neuronas del PVH y la concentración de esta hormona en plasma. Así como la CORT afecta los niveles de síntesis de CRH y ACTH, también puede estar afectando los niveles de NO en ambos retos, ya que como previamente se ha descrito, la CORT puede modular la síntesis de NO a través de AMPc (Duma y col., 2004). Esta modulación por CORT se logra porque el promotor de nNOS contiene un sitio regulado por AMPc, aunque no tiene un sitio responsivo a glucocorticoides. En este sentido, uno de los pasos críticos en la activación de las NOS, es precisamente su unión a este nucleótido y su síntesis es regulada por glucocorticoides, lo que sugiere que los glucocorticoides pueden suprimir o exacerbar la expresión NOS en el PVH (Jahng y col., 2005). Durante el proceso inflamatorio la producción inicial se regula rápidamente a la alza de las formas constitutivas de NOS, lo que resulta en el incremento del nivel de NO. Esto podría tener

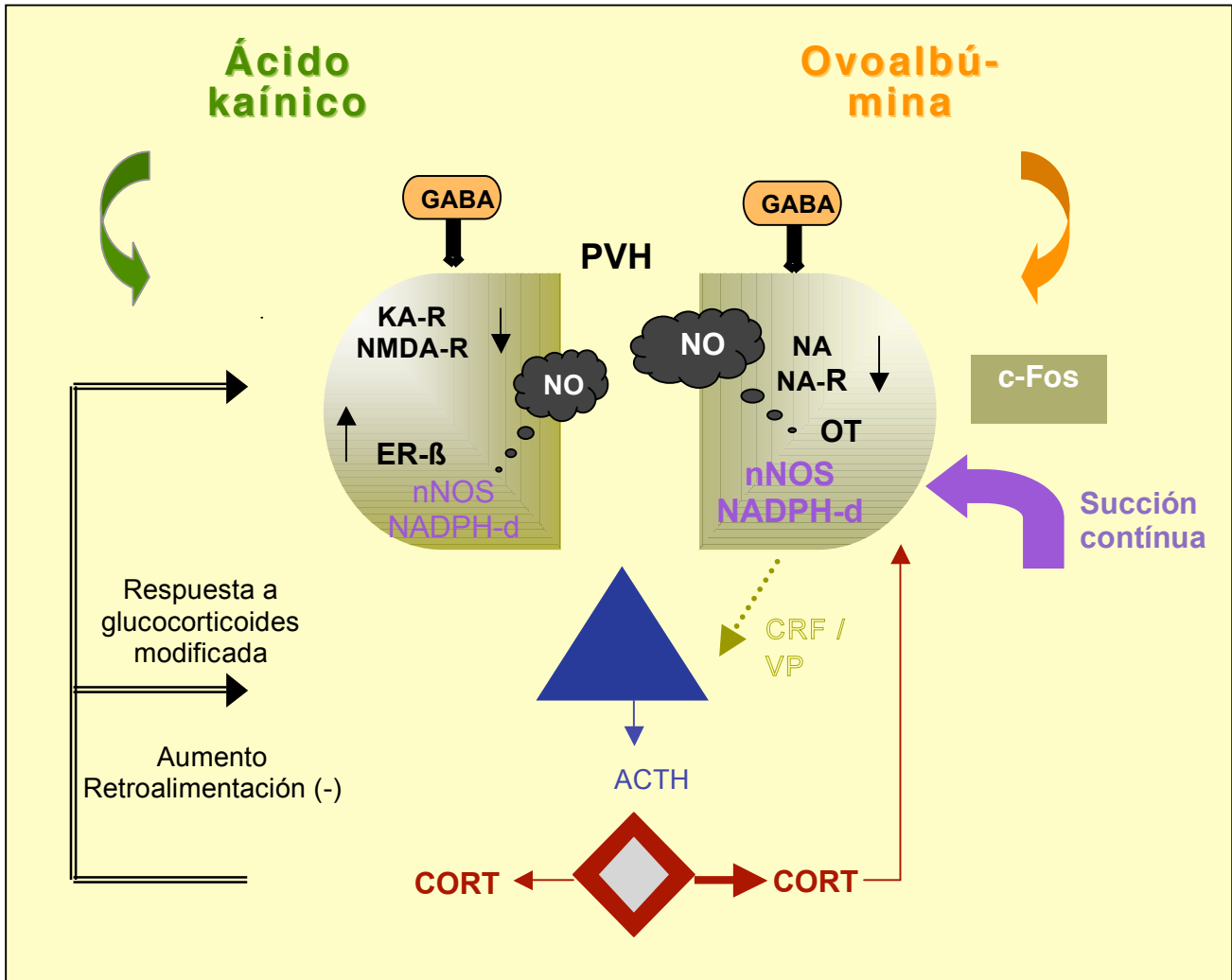
sentido en la etapa inicial de la infección con el fin de generar las respuestas necesarias para eliminar al agente que está causando el daño. Después de la etapa inicial, permanece un nivel bajo de NO, que garantiza la existencia de un proceso antiinflamatorio como tal, se inicia la activación de genes para promover la respuesta inflamatoria, incluyendo los que codifican para iNOS. A pesar de que los glucocorticoides son conocidos como potentes supresores de la respuesta inmunológica, específicamente de iNOS, esta acción disminuye una vez que se ha iniciado la síntesis de NO por esta enzima (Duma y col., 2004).

A la fecha, se tiene evidencia de que durante la lactancia se atenúa la respuesta al estrés y al daño excitotóxico por aminoácidos excitadores. No obstante estas observaciones, no se ha logrado explicar de manera clara cuáles son los mecanismos que subyacen a la hiporesponsividad. En este sentido, se ha propuesto una variedad de factores importantes que participan en la atenuación de la respuesta al estrés o al daño excitotóxico durante esta fase del ciclo reproductivo que incluyen el estímulo de la succión, el ambiente hormonal de la lactancia, caracterizado por altos niveles de progesterona y bajos niveles de estrógenos, la disminución de la expresión de receptores glutamatérgicos, la reducción de la inervación noradrenérgica que llega al PVH, así como al nivel de CORT, que se mantiene constante y en una concentración elevada durante la lactancia.

En síntesis, estudios recientes muestran que una de las moléculas que clásicamente se ha relacionado con el daño que puede producir la respuesta al estrés y/o que lleva a la muerte neuronal por excitotoxicidad es el NO (Milatovic y col., 2002). También en el PVH de madres lactantes se encontró mayor expresión de sus enzimas de síntesis, lo cual se correlaciona con su concentración. Dado que durante la lactancia de la rata, el NO está elevado en el PVH y en este núcleo se localizan las neuronas que responden al estrés, en este trabajo se decidió explorar la contribución del NO ante un estímulo estresante y, directamente ante el daño excitotóxico en el PVH de madres lactantes.

Los resultados presentados mostraron que hay una relación directa entre la expresión de los marcadores de NO y la atenuación de la respuesta al estrés, con lo que puede pensarse que el NO participa en este proceso. Este trabajo plantea varias perspectivas de análisis sobre la función y los mecanismos por los que actúa este gas.

La Figura 22 muestra un esquema donde se integra información que antecede a este trabajo con los resultados aquí presentados. El esquema representa el PVH de una madre lactante y los efectos observados ante los tratamientos utilizados.



**Figura 22. Diagrama integrativo de la regulación del PVH en la respuesta neuroendocrina al estrés durante la lactancia los resultados obtenidos.** El esquema incorpora los resultados obtenidos en el PVH de madres lactantes ante los tratamientos utilizados en este trabajo. A la izquierda están los efectos provocados por KA, como fueron la expresión de nNOS y NADPH-d en la región parvocelular del PVH y la producción de NO. A la derecha, se observan los resultados inducidos por OVO, en los que la expresión de nNOS y NADPH-d fueron más intensos y con mayor producción de NO, con respecto al tratamiento de KA. La intensidad de color ambos paneles representa las diferencias en el número de células positivas a c-Fos ante los tratamientos. Se ilustran los factores descritos en la literatura que pudieran estar influyendo en los resultados obtenidos, como son; la activación de las neuronas que producen OT por el estímulo de la succión; la disminución de receptores glutamatérgicos a kainato (KA-R) y a NMDA (NMDA-R); aumento de receptores a estrógenos beta (ER-β) por la ausencia de E; la disminución en la liberación y expresión de los receptores de NA y (NA-R), así como un mayor número de neuronas GABAérgicas que llegan al PVH. Concentración elevada y sostenida de CORT; que pudiera estar modulando a la nNOS, misma que coincidió parcialmente con la localización de la NADPH-d y el nivel elevado de NO durante la lactancia

dependiente de la succión y que podría contribuir a la reducción de la síntesis de VP y/o de CRF que se reflejaría en la liberación de ACTH por la hipófisis.

## 10 Conclusiones

Los resultados del presente trabajo confirman que, la lactancia es una condición fisiológica especial en la cual la respuesta hipotalámica, y de secreción de corticosterona, ante un estrés inmunológico o el daño excitotóxico está atenuada.

- ◆ En la respuesta activacional inducida por el estrés inmunológico y por ácido kaínico, existe una influencia de las hormonas ováricas.
- ◆ La activación de las células del PVH durante la lactancia presentan un patrón de localización similar, que es independiente del tipo y tiempo post-tratamiento.
- ◆ En la lactancia, la distribución de las neuronas que expresan las enzimas que sintetizan de NO, se modifica después de un insulto a su homeostasis.
- ◆ En el PVH de la rata lactante está aumentado el tono nitrérgico y puede incrementarse por un estímulo estresante o excitotóxico.

Estos estudios, han planteado la necesidad de estudiar con mayor detalle los mecanismos que existen en el cerebro de la madre lactante para contender con el aumento del tono nitrérgico, así como su probable contribución en la atenuación de la respuesta al estrés.

## 11 Referencias

Abbud R, Lee WS, Hoffman GE, Smith MS. Lactation inhibits hippocampal and cortical activation of c-Fos expression by NMDA but not kainate receptor agonist. *Mol. Cell Neurosci.* (1992) 3:244-250.

Abbud R, Smith MS. Altered luteinizing hormone and prolactin responses to excitatory amino acids during lactation. *Neuroendocrinology.* (1993) 58:454-464.

Abbud R, Hoffman GE, Smith MS. Lactation-induced deficits in NMDA receptor-mediated cortical and hippocampal activation: changes in NMDA receptor gene expression and brainstem activation. *Mol. Brain Res.* (1994) 25:323-332.

Alonso JR, Sanchez F, Arevalo R, Carretero J, Vazquez R, Aijon J. Partial coexistence of NADPH-diaphorase and somatostatin in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci. Lett.* (1992) 14:101-104.

Armstrong WE, Hatton GI. The puzzle of pulsatile oxytocin secretion during lactation: some new pieces. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* (2006) 291:R26-28.

Banky Z, Nagy GM, Halasz B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology.* (1994) 59:63-71.

Besedovsky HO, del Rey A. Introduction: immune-neuroendocrine network. *Front Horm Res.* (2002) 29:1-14.

Blanco E, Jirikowski GF, Riesco JM, Juanes JA, Vazquez R. Coexistence of NADPH-diaphorase with tyrosine hydroxylase in hypothalamic magnocellular neurons of the rat. *Neuropeptides* (1997) 31:227-230.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* (1994) 63:175-195.

Brunton PJ, Sabatier N, Leng G, Russell JA. Suppressed oxytocin neuron responses to immune challenge in late pregnant rats: a role for endogenous opioids. *Eur. J. Neurosc.* (2006) 23:1241-1247.

Buller KM. Neuroimmune Stress Responses: Reciprocal connections between the hypothalamus and the brainstem. *Stress* (2003) 6:11-17.

Calka J, Block CH. Relationship of vasopressin with NADPH-diaphorase in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res. Bull.* (1993) 32:207-210.

Calka J, Block CH. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide synthase in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res. Bull.* (1993) 30:677-685.

Calka J, Wolf G, Brosz M. Ultrastructural demonstration of NADPH-diaphorase histochemical activity in the supraoptic nucleus of normal and dehydrated rats. *Brain Res. Bull.* (1994) 34:301-308.

Calza L, Giardino L, Cecatelli S. NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *NeuroReport* (1993) 4:627-630.

Carter DA, Lightman SL. Oxytocin responses to stress in lactating and hyperprolactinaemic rats. *Neuroendo.* (1987) 46:532-537.

Carter CS, Altemus M. Integrative functions of lactational hormones in social behavior and stress management. *Ann. NY. Acad. Sci.* (1997) 15:164-174.

Carter CS, Altemus M, Chrousos GP. Neuroendocrine and emotional changes in the post-partum period. *Prog Brain Res.* (2001) 133:241-249.

Cecatelli S, Eriksson M. The effect of lactation on nitric oxide synthase gene expression. *Brain Res.*(1993) 625:177-179.

Cecatelli S, Grandison L, Scott RE, Pfaff DW, Kow LM. Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* (1996) 64:357-363.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* (2005) 67:259-284.

Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev. Biol.* (2003) 258:319-333.

Crane JW, French KR, Buller KM. Patterns of neuronal activation in the rat brain and spinal cord in response to increasing durations of restraint stress, *Stress* (2005) 8:199-211.

Da Costa APC, Wood S, Ingram CD, Lightman SL. Region-specific reduction in stress-induced c-Fos mRNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Res.* (1996) 746:151-162.



Da Costa APC, Kampa RJ, Windle RJ, Ingram CD, Lightman SL. Region-specific immediate-early gene expression following the administration of corticotropin-releasing hormone in virgin and lactating rats. *Brain Res.* (1997) 770:177-184.

Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bretz DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1991) 88:6368-6371.

Deschamps S, Woodside B, Walter CD. Pups presence eliminates the stress hyporesponsiveness of early lactating females to a psychological stress representing a threat to the pups. *J. Neuroendocrinol.* (2003) 15:486-497.

Douglas AJ. Central noradrenergic mechanisms underlying acute stress responses of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: adaptation through pregnancy and lactation. *Stress* (2005) 8:5-18.

Duma D, Silva-Santos JE, Assreuy J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats. *Crit. Care Med.* (2004) 32:2304-2310.

Esplugues JV. NO as a signaling molecule in the nervous system. *British J. Pharm.* (2002) 135:1079-1095.

Ferrer I. Señalización celular en el hipocampo epiléptico. *Rev. Neurol.* (2002) 6: 544-550.

Földes A, Némethy Z, Szalay O, Kovács KJ. Anaphylactoid reaction activate hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: Comparisation with endotoxic reactions. *Brain Res. Bull.* (2000) 52:573-579.

Gingerich S, Krukoff TL. Estrogen in the paraventricular nucleus attenuates L-glutamate-induced increases in mean arterial pressure through estrogen receptor and NO. *Hypertension* (2006) 48:1130-1136.

Grange-Messent V, Raison D, Dugas B, Calas A. Noradrenaline Up-Regulates the Neuronal and the Inducible Nitric Oxide Synthase Isoforms in Magnocellular Neurons of Rat Brain Slices. *J. Neuro. Res.* (2004) 78:683-690.

Guix FX, Uribealago I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* (2005) 76:126-152.

Herman JP, Cullinan WE, Ziegler D, Tasker JG. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur. J. Neurosci.* (2002) 16:381-385.

Higuchi T, Negoro H, Arita J. Reduced responses of prolactin and catecholamine to stress in the lactating rat. *J. Endocrinology*. (1989) 122:495-498.

Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1991) 1;88:2811-2814.

Horn T, Smith PM, McLaughlin BE, Bauce L, Marks GS, Pittman QJ, Ferguson AV. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. *Am. J. Phys.* (1994) 266:R306-R313.

Jahng JW, Lee JY, Yoo SB, Kim YM, Ryu V, Kang DW, Lee JH. Refeeding-induced expression of neuronal nitric oxide synthase in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res.* (2005) 1048:185-192.

Johnstone HA, Wigger A, Douglas AJ, Neumann ID, Landgraf R, Seckl JR, Russell JA. Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: changes in feedforward and feedback mechanisms. *J. of Neuroendo.* (2000) 12:811-822.

Kadowaki K, Kishimoto J, Leng G, Emson PC. Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophysial system after chronic salt loading: evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology* (1994) 134:1011-1017.

Kinsley CH, Lambert KG. The maternal brain. *Sci Am.* (2006) 294:72-79.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* (1994) 298:240-255.

Kovács KJ, Sawchenko PE. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J. Neurosci.* (1996) 16:262-273.

Kovács KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem. Int.* (1998) 33:287-297.

Lasaga M, De Laurentiis A, Pampillo M, Pisera D, Díaz MC, Theas S, Duvilanski B, Seilicovich A. The effect of excitatory aminoacids on GABA release from mediobasal hypothalamus of female rats. *Neurosc. Lett.* (1998) 247:119-122.

Lee LR, Haisenleder DJ, Marshall JC, Smith MS. Effects of progesterone on pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion and LH subunit messenger ribonucleic acid during lactation in the rat. *Endocrinology* (1989) 124:2128-2134.

Lee WS, Abbud R, Hoffman GE, Smith MS. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor activation on cFos expression in luteinizing hormone-releasing hormone neurons in female rats. *Endocrinology* (1993)133:2248-2254.

Lightman SL, Windle RJ, Wood SA, Kershaw YM, Shanks N, Ingram CD. Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Progr. Brain Res.* (2001)133 Cap. 8.

McCann SM, Karanth S, Kimura M, Yu WH, Rettori V. The role of nitric oxide (NO) in control of hypothalamic-pituitary function. *Rev. Bras. Biol.* (1996) 56:105-112.

McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. NY. Acad.* (1998) 840:33-44.

Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV. Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am. J. Anat.* (1982) 165:385-396.

Mepham TB. Physiology of lactation. Mepham and Keynes Eds: Open University Press. U.S.A., Philadelphia (1987) 207 pp.

Miyagawa A, Okamura H, Iyata Y. Coexistence of oxytocin and NADPH-diaphorase in magnocellular neurons of the paraventricular and the supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* (1994) 171:13-16.

Milatovic D, Guptab RC, Dettbarn WD. Involvement of nitric oxide in kainic acid induced excitotoxicity in rat brain. *Brain Res.* (2002) 957:330-337.

McKenna MC, Bell SK. Classification of Mammals Above the Species Level. Columbia University Press, New York. (1997) 631pp.

Morales T, Sawchenko PE. Brainstem prolactin-releasing peptide neurons are sensitive to stress and lactation. *Neuroscience* (2003) 121:771-778.

Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernández AP, Bentura ML. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur. J. Neurosci.* (1998) 10:445-456.

Nagano T. Practical methods for detection of nitric oxide, *Luminescence* (1999) 14:283-290.

Neumann ID. Alterations in behavioral and neuroendocrine stress coping strategies in pregnant, parturient and lactating rats. *Progress in Brain Res.* (2001)133 Cap. 10.

Neumann ID. Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog. Brain Res.* (2002) 139:147-162.

Neumann ID, Krömer SA, Bosch OJ., Effects of psycho-social stress during pregnancy on neuroendocrine and behavioural parameters in lactation depend on the genetically determined stress vulnerability. *Psychoneuroendocrinology* (2005) 30:791-806.

Nishioka T, Anselmo-Franci JA, Li P, Callahan MF, Morris M. Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* (1998) 781:57-61.

Okamura H, Yokosuka M, Hayashi S. Estrogenic induction of NADPH-diaphorase activity in the preoptic neurons containing estrogen receptor immunoreactivity in the female rat. *J. Neuroendocrinol.* (1994) 6:597-601.

Okere CO, Kaba H, Seto K, Higuchi T. Intracerebroventricular injection of a nitric oxide donor attenuates Fos expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats. *Brain Res.* (1999) 828:104-114.

Olazabal DE, Ferreira A. Maternal behavior in rats with kainic acid-induced lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Physiol. Behav.* (1997) 61:779-784.

Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res.* (1974) 77:507-512.

Otukonyong EE, Okere CO, Johnstone LE, Murata T, Kaba H, Higuchi T. Effect of suckling on NADPH-diaphorase (Nitric oxide synthase, NOS) Reactivity and NOS gene expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats. *J. Neuroendo.* (2000) 12:1001-1008.

Pacák K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrinol. Revs.* (2001) 22:502-548.

Palkovits M. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. *Front. Neuroendocrinol.* (1999) 20:270-295.

Parker SL, Crowley WR. Stimulation of oxytocin release in the lactating rat by central excitatory amino acid mechanisms: evidence for specific involvement of R, S-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid-sensitive glutamate receptors. *Endocrinology* (1993) 133:2847-2854.

Pohl CR, Lee LR, Smith MS. Qualitative changes in luteinizing hormone and prolactin responses to N-methyl-aspartic acid during lactation in the rat. *Endocrinology*. (1989) 124:1905-1911.

Popeski N, Amir S, Woodside B. Changes in NADPH-d staining in the paraventricular and supraoptic nuclei during pregnancy and lactation in rats: Role of ovarian steroids and oxytocin. *J. Neuroendocrinol.* (1999) 11:53-61.

Popeski, N. Woodside, B. Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibition on Fos Expression in the Hypothalamus of Female Rats Following Central Oxytocin and Systemic Urethane Administration. *J. Neuroendocrinol.* (2001)13: 596-607

Popeski N, Amir S, Diorio J, Woodside B. Prolactin and oxytocin interaction in the paraventricular and supraoptic nuclei: effects on oxytocin mRNA and nitric oxide synthase. *J. Neuroendocrinol.* (2003)15:687-696.

Popeski N, Woodside B. Central nitric oxide synthase inhibition disrupts maternal behavior in the rat. *Behav. Neurosc.* (2004) 118:1305-1316.

Rabin BS. Stress immune function and health, the connection. Ed. Wiley and-liss NY (1999) 341pp.

Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb. Haemost.* (1993) 70:36-41.

Rivest S, How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinol.* (2001) 26(8):761-788.

Rivier C. Role of nitric oxide and carbon monoxide in modulating the activity of the rodent hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Front. Horm. Res.* (2002) 29:15-49.

Rivier C. Role of nitric oxide in regulating the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxemia. *Ann. NY. Acad. Sci.* (2003) 992:72-85.

Rodrigo J, Springall D, Uttenthal LO, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* (1994) 345:175-221.

Rodrigo J, Alonso D, Fernández AP, Serrano J, Richart A, López JC. Immunohistochemical study of the expression of N-methyl-D-aspartate receptor, neuronal and inducible nitric oxide synthase and the formation of nitrotyrosine in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation in the presence and absence of N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester. *Brain Res.* (2001) 909:20-45.

Russell JA, Douglas AJ, Ingram CD. Brain preparations for maternity-adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. *Prog Brain Res.* (2001) 133:1-38.

Sapolsky RM. *Why zebras don't get ulcers*, Ed. Owl Books New York (1994).

Sapolsky RM, Romero LM, Punk AU. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Revs.* (2000) 21:55-89.

Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* (1983) 218:121-142.

Sawchenko PE, Cunningham ET Jr, Mortrud MT, Pfeiffer SW, Gerfen CR. *Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin* (PHA-L) anterograde axonal transport technique. *Methods Neurosci.* (1990) 3:247-260.

Sawchenko PE, Imaki T, Vale W. Co-localization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus. *Ciba Found. Symp.* (1992)168:16-30.

Sawchenko PE, Brown ER, Chan RK, Ericsson A, Li HY, Roland BL, Kovacs KJ. The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res.* (1996) 107:201-222.

Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog. Brain Res.* (2000) 122:61-78.

Schedlowski M, Tewes U. *Psychoneuroimmunology; an interdisciplinary introduction*, Kluwer Academic/Plenum Publishers NY. (1999) 93-111pp.

Schiltz JC, Sawchenko PE. Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Front. Biosci.* (2003) 8:1321-1329.

Scott DE, Wu W, Slusser J, Depto A, Hansen S., Neural regeneration and neuronal migration following injury. I. The endocrine hypothalamus and neurohypophyseal system. *Exp. Neurol.* (1995) 131:23-38.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* (1936) 138:32.

Service G, Woodside B. Inhibition of nitric oxide synthase within the medial preoptic area impairs pup retrieval in lactating rats. *Behav. Neurosci.* (2007) 121:140-147.

Shanks N, Kusnecov A, Pezzone M, Berkum J, Rabin BS. Lactation alters the effects of conditioned stress on immune function. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* (1997) 272:16-25.

Shanks N, Windle RJ, Perks P, Wood S, Ingram CD, Lightman SL. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxin is attenuated during lactation. *J. Neuroendocrinol.* (1999) 11:857-865.

Smith MS. Effects of the intensity of the suckling stimulus and ovarian steroids on pituitary GnRH receptors during lactation. *Biol. Reprod.* 31 (1984) 548-555pp.

Smith MS. The effects of high levels of progesterone secretion during lactation on the control of gonadotropin secretion in the rat. *Endocrinology* (1981) 109:1509-1517.

Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* (1996) 87:1015-1023.

Standley CA. N-methyl-D-aspartate receptor binding is altered and seizure potential reduced in pregnant rats. *Brain Res.* (1999) 844:10-19.

Stern JM, Lonstein JS. Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. *Prog. Brain Res.* (2001) 133:263-278.

Stern JM, Levine S. Pituitary-adrenal activity in the postpartum rat in the absence of suckling stimulation. *Horm. Behav.* (1972) 3:237-246.

Stern JM, Voogt JL. Comparison of plasma corticosterone and prolactin levels in cycling and lactating rats. *Neuroendocrinology.* (1973-1974) 13:173-181.

Summy-Long JY, Gestl S, Terrell ML, Wolz G, Kadakaro M. Osmoregulation of the magnocellular neuroendocrine system during lactation. *Am. J. Physiol.* (1997) 272: R275-R288.

Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.* (1983) 6:269-234.

Swanson LW. *Brain maps: structure of the rat brain*: 2nd ed. Amsterdam: Elsevier (1998) 267pp.

Talavera E, Martínez-Lorenzana G, León-Olea M, Sánchez-Alvarez M, Sánchez-Islas E, Pellicer F. Histochemical distribution of NADPH-diaphorase in the cerebral ganglion of the crayfish *Cambarellus moctezumae*. *Neurosci. Lett.* (1995) 187:177-180

Theodosios DT, Poulain DA. Maternity leads to morphological synaptic plasticity in the oxytocin system. *Prog. Brain Res.* (2001) 133:49-58.

Tilbrook AJ, Turner AI, Ibbott MD, Clarke IJ. Activation of the hypothalamo-pituitary adrenal axis by isolation and restraint stress during lactation in ewes: effect of the presence of the lamb and suckling. *Endocrinology.* (2006) 147:3501-3509.

Tilbrook AJ, Clarke IJ. Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Front. Neuroendocrinol.* (2006) 27:285-307.

Torner L, Neumann ID. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* (2002) 5:249-257.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* (2002) 53:4865-4871.

Turnbull AV, Rivier C. Selective inhibitors of nitric oxide synthase (NOS) implicate a constitutive form of NOS in the regulation of interleukin-1-induced ACTH secretion in rats. *Endocrine* (1996) 5:135-140.

Uribe RM, Lee S, Rivier C. Endotoxin stimulates nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus through nitric oxide synthase I: correlation with hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *Endocrinology* (1999) 140:5971-5981.

Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* (1992) 46:755-784.



Viau V, Meaney MJ. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*. (1991) 129:2503-2511.

Wakerley JB, Jiang QB, Housham SJ, Terenzi MG, Ingram CD. Influence of reproductive state and ovarian steroids on facilitation of the milk-ejection reflex by central oxytocin. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1995) 395:117-132.

Walker CD, Tilders FJH, Bulet A. Increased colocalization of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in paraventricular neurones of the hypothalamus in lactating rats: evidence from immunotargeted lesions and immunohistochemistry. *J. Neuroendocrinol.* (2001)13:74-85.

Walker CD, Toufexis DJ, Bulet A. Hypothalamic and limbic expression of CRH and vasopressin during lactation: implications for the control of ACTH secretion during stress hyporesponsiveness. *Progr. Brain Research* (2001)133 Cap. 7.

Windle RJ, Gamble LE, Kershaw YM, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD. Gonadal steroid modulation of stress-induced hypothalamo-pituitary-adrenal activity and anxiety behavior: role of central oxytocin. *Endocrinology* (2006) 147: 2423-2431.

Windle RJ, Brady MM, Kunandam T, Da Costa APC, Wilson BC, Harbuz M, Lightman SL, Ingram CD. Reduced response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to  $\alpha$ 1-agonist stimulation during lactation. *Endocrinology* (1997) 138: 3741-3748.

Windle RJ, Wood S, Shanks N, Perks P, Conde GL, da Costa APC, Ingram CD, Lightman SL. Endocrine and behavioural responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity. *J. Neuroendocrinol.* (1997) 9:407-414.

Wintrip N, Nance DM, Wilkinson M. The effect of lactation on induced Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* (1997) 754:113-120.

Zelena D, Mergl Z, Makara GB. Glutamate agonists activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through hypothalamic paraventricular nucleus but not through vasopressinergic neurons. *Brain Res.* (2005) 1031:185-193.

Zhang W, Mayhan WG, Patel KP. Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity, *American J. Physiology.* (1997) 275:R728-R734.

## 12 Lista de abreviaturas

|                 |  |
|-----------------|--|
| HPA             | Hipotálamo Hipófisis Adrenal           |
| CRH             | Hormona liberadora de corticotropina   |
| CORT            | Corticosterona                         |
| ACTH            | Hormona adrenocorticotrópica           |
| OT              | Oxitocina                              |
| PRL             | Prolactina                             |
| VP              | Vasopresina                            |
| PVH             | Núcleo paraventricular del hipotálamo  |
| TNF- $\alpha$ , | Factor de necrosis tumoral alfa        |
| IL              | Interleucinas                          |
| TRH             | Hormona liberadora de tirotropina      |
| NPY             | Neuropéptido Y                         |
| ENK             | Encefalinas                            |
| BNST            | Núcleo del lecho de la estría Terminal |
| vSub            | Subiculum ventral                      |
| mPFC            | Corteza prefrontal medial              |
| MeA             | Amígdala medial                        |
| LS              | Septum lateral                         |
| ACh             | Acetilcolina                           |
| DLTg            | Núcleo tegmental dorsolateral          |
| 5HT             | Serotonina                             |
| GCs             | Glucocorticoides                       |
| PGE2            | Prostaglandinas                        |
| NO              | Óxido nítrico                          |
| CO              | Monóxido de carbono                    |
| E <sub>2</sub>  | Estrógenos                             |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| P                           | Progesterona                             |
| NOS                         | Sintetasa del óxido nítrico              |
| nNOS                        | Sintetasa del óxido nítrico neuronal     |
| eNOS                        | Sintetasa del óxido nítrico endotelial   |
| iNOS                        | Sintetasa del óxido nítrico inducible    |
| NADPH-d                     | Nicotiamida-Adenina Dinucleotido Fosfato |
| Ca <sup>2+</sup>            | Ión calcio                               |
| i.c.v                       | Intracerebroventricular                  |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Superóxido                               |
| ONOO <sup>-</sup>           | Peroxinitrito                            |
| KA                          | Ácido kaínico                            |

### 13 Lista de figuras

Figura 1. Diagrama de la microanatomía del núcleo paraventricular del hipotálamo.

Figura 2. El cerebro materno.

Figura 3. Síntesis de óxido nítrico.

Figura 4. Efecto de la administración de clara de huevo sobre la expresión de Fos en el PVH.

Figura 5. Efecto de la administración de ácido kaínico sobre la expresión de Fos en el PVH.

Figura 6. Número de células inmunoreactivas a Fos en respuesta al reto con clara de huevo.

Figura 7. Número de células inmunoreactivas a Fos en respuesta al reto con ácido kaínico.

Figura 8. Diagrama de la localización de Fos en el PVH después de los tratamientos experimentales.

Figura 9. Efecto de la administración de clara de huevo sobre la expresión de NADPH en el PVH.

Figura 10. Efecto de la administración de ácido kaínico sobre la expresión de NADPH en el PVH.

Figura 11. Diagrama de la localización de NADPH en el PVH después de los tratamientos experimentales.

Figura 12. Efecto de la administración de clara de huevo sobre la expresión de iNOS en el PVH.

Figura 13. Efecto de la administración de ácido kaínico sobre la expresión de iNOS en el PVH.

Figura 14. Efecto de la administración de clara de huevo sobre la expresión de nNOS en el PVH.

Figura 15. Efecto de la administración de clara de huevo sobre la expresión de nNOS en el PVH.

Figura 16. Densidad óptica obtenida del ensayo de nitratos y nitritos de homogenados de PVH del grupo diestro.

Figura 17. Densidad óptica obtenida del ensayo de nitratos y nitritos de homogenados de PVH del grupo lactantes.

Figura 18. Densidad óptica obtenida del ensayo de nitratos y nitritos de homogenados de PVH del grupo OVX.

Figura 19. Concentración de corticosterona plasmática en respuesta al reto inmune con clara de huevo.

Figura 20. Concentración de corticosterona plasmática en respuesta al reto excitotóxico con ácido kaínico.

### **13.1 Índice de tablas**

Tabla 1. Cuadro de las subdivisiones funcionales del PVH.

Tabla 2. Número de células positivas a Fos después de los tratamientos experimentales.