



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM JURIQUILLA, QRO.

“Análisis de las prolactinas como mediadores
centrales de la respuesta de ansiedad al estrés”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A
M. en C. Heidi Miriam Zamorano Rojas

Tutora

DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.
Instituto de Neurobiología

Comité tutorial

Ma. Isabel Miranda Saucedo
Instituto de Neurobiología
Dr. Miguel A. Morales Mendoza
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Juriquilla, Querétaro. Abril del 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios en el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas con sede en el Instituto de Neurobiología. Asimismo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; Beca **No. 181558**). También agradezco el apoyo proporcionado por los financiamientos del **CONACYT No. 127496 y 161594**

Agradezco a la Dra. Carmen Clapp por su tutoría a lo largo del proyecto y la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo.

Gracias al Dr. Gonzalo Martínez de la escalera por su apoyo en la revisión de este trabajo.

Extiendo mi gratitud al comité tutorial integrado por el Dr. Miguel Morales y Dra. María Isabel Miranda por su asesoría en el proyecto.

Agradezco a la Dra. Luz Torner por su apoyo en la realización de este trabajo y su amistad.

Gracias a la colaboración de la M. en C. María Guadalupe Ledesma Colunga
Agradezco el apoyo técnico al Nutr. Fernando López Barrera y al M.C Gabriel Nava, a los laboratoristas Antonio Prado Galán y Daniel Mondragón Huerta. Agradezco a los miembros del bioterio el MVZ. Martín García Servín y la Dra. Alejandra Castilla por su apoyo con los animales experimentales.

Agradezco la asistencia académica incondicional de la M. en C. Leonor Casanova Rico, Jefe de la unidad de enseñanza de Estudios de Posgrado del Instituto de Neurobiología.

**A mi madre por ser la base de mi camino y mi
apoyo siempre**

**A mis hijos Matías y Nina, por ser la energía para
el motor que mueve mi mundo, su sonrisa, su cariño,
su amor incondicional, las luces que iluminan cada día**

**Carmen y Gonzalo, gracias por su confianza,
apoyo y afecto incondicional**

Todo pasa y todo queda,
pero lo nuestro es pasar,
pasar haciendo caminos,
caminos sobre la mar.

Héctor Vargas

Miren Grovas

RESUMEN

La prolactina (PRL) es una hormona con funciones muy variadas, incluyendo la regulación de respuestas neuroendocrinas y emocionales al estrés. En el hipotálamo se ha descrito la presencia de la PRL, la cual además es parcialmente metabolizada en las llamadas vaso-inhibinas (Vi), que son una familia de fragmentos amino-terminales con masa de 14 a 18 kDa y actividad antiangiogénica, cuyos efectos sobre las respuestas al estrés son desconocidas. En este trabajo mostramos que la administración intracerebroventricular de una Vi recombinante de 14 kDa correspondiente a los primeros 123 aminoácidos de la PRL humana, posee efectos ansiogénicos y depresivos en las pruebas conductuales de la plataforma elevada, el campo abierto y el nado forzado. Para investigar si la exposición al estrés tiene efecto sobre la producción de Vi en el hipotálamo, evaluamos el curso temporal de los niveles del RNAm de la PRL, y de las proteínas de PRL y Vi en extractos de hipotálamo de ratas expuestas a estrés por inmovilización por 30 min. Tanto los niveles del RNAm como de la proteína correspondientes a la PRL se elevaron significativamente a los 60 minutos y disminuyeron a niveles basales a los 360 min de iniciado el estímulo estresor. La elevación de la PRL hipotalámica no se correlacionó temporalmente con el aumento en la PRL sistémica, y tampoco fue afectada por el tratamiento con bromocriptina, un agonista de los receptores D2 de la dopamina que inhibe la secreción de la PRL hipofisiaria. Si bien el estímulo estresor no modificó los niveles de una Vi endógena de 17 kDa en el hipotálamo, encontramos que la actividad enzimática capaz de convertir a la PRL hacia Vi disminuye de manera significativa en los animales estresados.

Estos resultados demuestran que las Vi ejercen un efecto promotor de estados de ansiedad y depresión. Dado que bajo condiciones de estrés, aumenta la expresión de la PRL y disminuye su conversión hacia vaso-inhibinas en el hipotálamo, es posible que las acciones recíprocas de la PRL y de las vaso-inhibinas representen un mecanismo efectivo para regular las respuestas conductuales de ansiedad y depresión ante estímulos estresores.

ABSTRACT

The hormone prolactin (PRL) regulates neuroendocrine and emotional stress responses. It is found in the hypothalamus, where the protein is partially cleaved to vaso-inhibins, a family of N-terminal antiangiogenic PRL fragments ranging from 14 to 18 kDa molecular masses, with unknown effects on the stress response. Here, we show that the intracerebroventricular administration of a recombinant vaso-inhibin, containing the first 123 amino acids of human PRL and a 14 kDa molecular mass, exerts anxiogenic and depressive-like effects detected in the elevated plus-maze, the open field, and the forced swimming tests. To investigate whether stressor exposure affects the generation of vaso-inhibins in the hypothalamus, the concentrations of PRL mRNA, PRL, and vaso-inhibins were evaluated in hypothalamic extracts of virgin female rats immobilized for 30 min at different time points after stress onset. The hypothalamic levels of PRL mRNA and protein were higher at 60 min but declined at 360 min to levels seen in non-stressed animals. The elevation of hypothalamic PRL did not correlate with the stress-induced increase in circulating PRL levels, nor was it modified by blocking adeno-hypophyseal PRL secretion with bromocriptine. A vaso-inhibin having an electrophoretic migration rate corresponding to 17kDa was detected in the hypothalamus. Despite the elevation in hypothalamic PRL, the levels of this hypothalamic vaso-inhibin were similar in stressed and non-stressed rats. Stress reduced the rate of cleavage of PRL to this vaso-inhibin as shown by the incubation of recombinant PRL with hypothalamic extracts from stressed rats. These results suggest that vaso-inhibins are potent anxiogenic and depressive factors and that stress increases PRL levels in the hypothalamus partly by reducing its conversion to vaso-inhibins. The reciprocal interplay between PRL and vaso-inhibins may represent an effective mechanism to regulate anxiety and depression.

ÍNDICE

Abstract	
Resumen	
1. Introducción	1
2. PRL y Vasoinhibinas	2
Estructura	2
Funciones	4
Sitios de producción de PRL y Vasoinhibinas	7
3. PRL, Vasoinhibinas y SNC	8
Funciones	8
4. Estrés	11
Definición	11
5. Respuesta al estrés	13
Activación del sistema nervioso autónomo	13
Activación del eje HHA	14
Conducta de ansiedad	15
6. PRL, Estrés y ansiedad	16
7. Origen sistémico y neural de la PRL	17
8. Planteamiento del problema	19
9. Hipótesis	20
10. Objetivos	20
11. Materiales y métodos	20
12. Resultados	27
I. Las Vi estimulan la conducta de ansiedad y depresión	
II. Efecto del estrés por inmovilización sobre la expresión del RNA mensajero de PRL en el hipotálamo y los niveles sistémicos e hipotalámicos de PRL y de Vasoinhibinas	
III. El estrés por inmovilización produce un descenso regulado en la actividad de las enzimas capaces de cortar PRL en el hipotálamo	

13. Discusión	34
14. Conclusiones	40
15. Referencias	41

1. INTRODUCCIÓN

La prolactina (PRL) pertenece a una familia hormonal derivada de un gen común donde su producto proteico puede ser sujeto a modificaciones postraduccionales, que incluyen la glicosilación, la fosforilación y la proteólisis, entre otras (Sinha, 1995). Estas proteínas se producen principalmente en la hipófisis anterior, pero también en tejidos extrahipofisarios como el inmune y el nervioso, así como en órganos periféricos, como la glándula mamaria y la placenta (Ben Jonathan et al., 1996). Aunado a sus diferentes sitios de producción y su diversidad estructural, las PRLs participan en una gran variedad de funciones que incluyen acciones sobre la reproducción, la osmoregulación y la regulación de la respuesta inmune, entre otras (Bole-Feysot et al., 1998, Clapp y Weiner, 1992).

El sistema nervioso central (SNC) es un sitio productor y blanco de las PRLs. El RNA mensajero (RNAm) de la PRL se expresa en el SNC, principalmente en el hipotálamo, donde se ha detectado a la PRL y también a algunas de sus variantes moleculares como fragmentos inmunoreactivos que varían entre los 14 y 18 kDa (Ben Jonathan et al., 1996). La PRL actúa en el SNC para regular conductas reproductivas (sexual y maternal), inhibir la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), alterar la secreción de oxitocina (OXT) y vasopresina (VP), estimular la ingesta de agua y de alimentos, y modular la respuesta al estrés (Grattan, 2002).

Diversos estímulos estresores estimulan la liberación adenohipofisaria de la PRL a la circulación (Nicoll et al., 1960, Neill et al., 1970). También se ha descrito que esta hormona puede actuar sobre el SNC modulando la conducta de ansiedad y la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en respuesta al estrés (Torner et al., 2001). Sin embargo, aún no es claro si el efecto de la PRL sobre las respuestas al estrés obedece a la acción de la PRL sistémica incorporada al SNC vía sus receptores presentes en los plexos coroideos, o si también participa la PRL de origen cerebral. Tampoco es claro si en la respuesta al estrés participan isoformas moleculares de esta hormona, regulando la fisiología de la respuesta al estrés o las conductas que se derivan de la exposición a estímulos estresores.

En el presente estudio se revisan aspectos generales de la biología de la PRL y de sus metabolitos, las vasoinhibinas, y de sus funciones en el SNC, particularmente la relación funcional con el estrés. La sección experimental aborda la posibilidad de que las vasoinhibinas tengan efectos sobre la conducta de ansiedad y depresión. Asimismo se investiga si el estrés regula la expresión de la PRL y su procesamiento a vasoinhibinas en el hipotálamo.

2. PRL y Vasoinhibinas

2.1 Estructura

La PRL se encuentra codificada por un gen único que, en el humano se localiza en el cromosoma 6 y cuenta con 5 exones y 4 intrones. En su forma nativa, la PRL tiene una masa molecular de 23 kDa y consta de 199 residuos de aminoácidos dispuestos en cuatro α -hélices antiparalelas estabilizadas por 3 puentes disulfuro. Se han descrito diferentes variantes moleculares de la PRL que son principalmente producto de modificaciones postraduccionales tales como la proteólisis, la desamidación, la glicosilación, la fosforilación, la sulfatación y la dimerización o polimerización (Sinha 1995).

Entre las variantes moleculares mejor caracterizadas de la PRL se encuentran las vasoinhibinas (Vi), una familia de fragmentos que contienen el extremo amino-terminal de la hormona. Las vasoinhibinas poseen masas moleculares que varían entre los 14 y los 18 kDa en función del sitio de corte de la PRL por distintas proteasas que incluyen a la catepsina D (Baldocchi et al., 1993), las metaloproteasas de matriz (MMP; Macotela et al., 2006), y la proteasa morfogenética de hueso-1 (BMP-1) (Fig. 1). La catepsina D es activa bajo pH ácido (pH 4-6) y puede generar vasoinhibinas en los gránulos de PRL durante su proceso de secreción hipofisiaria (Cruz-Soto et al., 2010), mientras que el procesamiento por MMP y BMP-1 ocurre bajo condiciones neutras probablemente en el ambiente extracelular en los órganos blanco (Macotela et al., 2006).

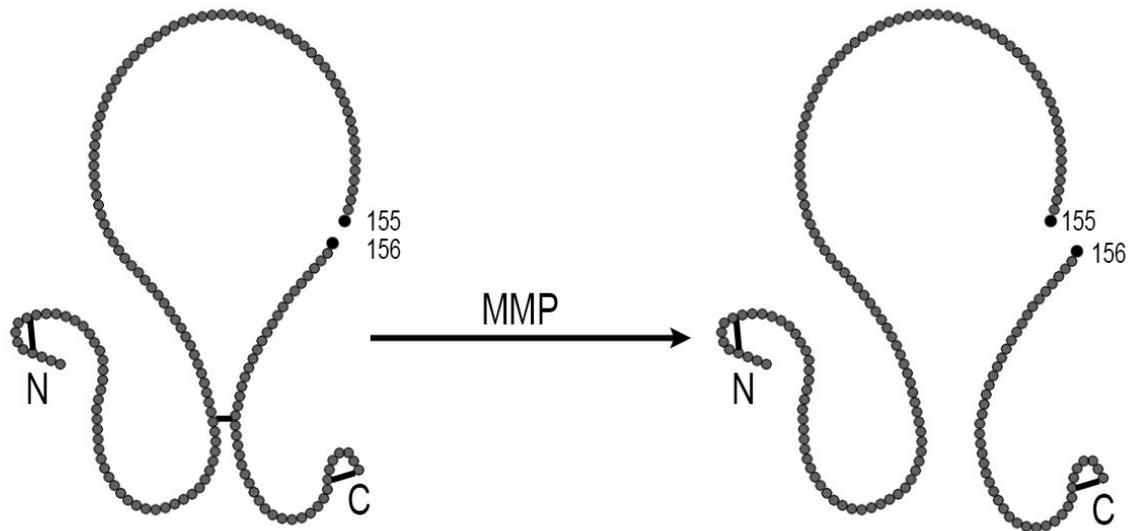


Figura 1. Representación linear de la estructura de la PRL y de la vasoinhibina que resulta del corte proteolítico por metaloproteasas de matriz entre los aminoácidos 155 y 156 de la PRL (Modificada de Macotela et al., 2006).

Se han identificado al menos tres isoformas del receptor de la PRL. Estas variantes moleculares son resultado del procesamiento alternativo del RNA mensajero. La región extracitoplasmática de unión a la PRL es idéntica en las tres isoformas, las cuales difieren en la extensión del dominio intracitoplasmático, por lo cual reciben las denominaciones de receptor corto (291 aminoácidos, 42kDa), intermedio (393 aminoácidos, 65kDa) y largo (591 aminoácidos, 80kDa) (Bole Feysot et al., 1998). Las tres isoformas son activas y tienen una distribución generalizada entre los diferentes tejidos si bien su proporción relativa y funcionalidad puede variar (Nagano et al., 1994, Devost et al., 1999). La forma corta del receptor ha sido descrita como predominante en hepatocitos, pero también está presente junto con la isoforma larga en el cerebro y en la glándula mamaria, y se ha propuesto que ambas isoformas pueden mediar el crecimiento hepático (Moreno-Carranza et al., 2013), la internalización de la PRL por el epitelio mamario y su transporte a la leche (BenJonathan et al., 1996), así como el transporte de la hormona hacia el líquido cefalorraquídeo (Walsh et al., 1987). La forma intermedia se ha reportado mayoritariamente en células del sistema inmune y de carcinoma

mamario, y se ha asociado a acciones proliferativas de la hormona (Kline et al., 1999), si bien puede señalar a la par de la forma larga en sistemas *in vitro* (Campbell et al., 1994). La vía de señalización clásica de los receptores a la PRL es la vía JAK (cinastas de tirosina “Janus”) / STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción). Intervienen las cinastas JAK 1, 2 y 3 y las STAT 1, 3 y 5, siendo las principales JAK 2 y STAT 5 (Bole-Feysot et al., 1998). La dimerización del receptor ocurre cuando una molécula de PRL se une a dos moléculas del receptor y es un requisito absoluto para que se inicie la transducción de la señal (Bole-Feysot et al., 1998).

La afinidad de los receptores es mayor por la forma nativa de la PRL ($K_d = 0.1 \text{ nM}$) con respecto a algunas de las isoformas de la hormona (Sinha, et al., 1995). Por ejemplo, la PRL en su forma glicosilada presenta una actividad de unión del 50% con respecto a la PRL no glicosilada (Pellegrini et al., 1988,) y la capacidad de unión de las vasoinhibinas es aún menor (5%) que la de la PRL (Clapp et al., 1992). Sin embargo, en el tejido nervioso se reportó una afinidad similar de las vasoinhibinas por el receptor de la PRL (Clapp et al., 1989). Es importante notar que las vasoinhibinas poseen efectos inhibitorios sobre los vasos sanguíneos que involucran receptores distintos a los receptores de la PRL. Las células endoteliales poseen sitios de unión saturables, de alta afinidad y específicos para vasoinhibinas que no interactúan con la PRL (Clapp y Weiner 1992) y no se han descrito efectos inhibitorios de la PRL sobre los vasos sanguíneos (Clapp et al., 2009).

2.2 Funciones

La PRL se describió originalmente por sus efectos sobre la producción de leche en la lactancia. Ahora se sabe que esta hormona ejerce una amplia gama de acciones biológicas que incluyen no sólo efectos dentro de la reproducción, sino también fuera de ella, como la osmoregulación, el crecimiento, la función inmune y la angiogénesis (Ben Jonathan et al., 1996, Clapp et al., 2009). La diversidad funcional de la PRL se debe a la presencia generalizada de sus receptores en una gran cantidad de células blanco pero también se ve influida por el polimorfismo estructural de la hormona.

Con respecto a los efectos sobre la lactancia, se conoce que la PRL estimula la proliferación, la diferenciación y la actividad secretora del epitelio mamario. Entre sus efectos lactogénicos se incluyen la estimulación de la síntesis y actividad de proteínas específicas de la leche (lactoalbúmina y la β -caseína) como de las responsables de la maquinaria biosintética conducente a la producción de componentes específicos de la leche tales como la lactosa, lípidos de cadena corta e intermedia, entre otros (Ben Jonathan et al., 1996, Freeman et al., 2000).

Otras acciones de la PRL sobre la reproducción incluyen la estimulación del mantenimiento del cuerpo lúteo y la producción de progesterona al principio del embarazo (Freeman, 2000; Ben Jonathan et al., 2008), si bien la PRL también ejerce acciones luteolíticas. En roedores, el aumento en los niveles circulantes de la PRL que ocurre en la tarde del proestro son determinantes de la regresión del cuerpo lúteo en ciclos reproductivos no fértiles (Ben Jonathan et al., 2008). Además, la PRL inhibe la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). Esta acción la ejerce directamente sobre las neuronas GnRHérgicas (Milenkovic et al., 1994), pero también indirectamente sobre neuronas kisspeptinérgicas reduciendo la secreción de la kisspeptina, el principal estimulador de la GnRH (Sonigo et al., 2012). Estos efectos permiten explicar la inhibición de la ovulación que tiene lugar durante la lactancia. En machos, la PRL estimula la diferenciación de la próstata y de la vesícula seminal (Bole-Feysot et al., 1998) y puede actuar sobre las células de Leydig incrementando los receptores a la hormona luteinizante (LH) y disminuyendo la actividad de la enzima aromatasa con lo cual incrementa la producción de andrógenos (Bole-Feysot et al., 1998).

Por otra parte, la PRL regula diversas conductas esenciales en eventos reproductivos, por ejemplo la conducta maternal. Animales heterocigotos para el receptor de PRL (Lucas et al., 1998) o tratados con un antagonista de dicho receptor (Bridges et al., 2001) muestran una disminución en el cuidado de sus crías, mientras que el tratamiento con PRL puede inducir la conducta maternal en hembras vírgenes (Bridges et al., 1990). Además, se ha demostrado que la conducta materna es regulada en el área preóptica media (APOM), donde consistentemente se ha descrito un incremento en la expresión del receptor de la PRL durante la gestación

y la lactancia (Pi et al., 1999, Bakowska et al., 1997). En relación con la conducta sexual, diferentes trabajos sustentan efectos inhibitorios de la PRL en hembras y machos. Por ejemplo, hembras tratadas con bromocriptina, un agonista dopaminérgico que inhibe la secreción hipofisiaria de la PRL, presentan una disminución en la frecuencia de lordosis (Dudley et al., 1982, Witcher et al., 1985), mientras que en ratas macho el tratamiento con PRL suprime la conducta de copulación (Doherty et al., 1985).

Otras conductas reguladas por la PRL pueden incidir o no sobre procesos reproductivos. Por ejemplo, la conducta de ingesta de agua y de alimento se incrementa durante la gestación y la lactancia en asociación con la hiperprolactinemia (Moore et al., 1987), y se ha mostrado que la administración intra-cerebro-ventricular de la PRL (Noel et al., 1993) o su infusión en el hipotálamo (Foreman et al., 1990) producen un aumento en la ingesta de alimento. De hecho, en los núcleos paraventricular y ventromedial del hipotálamo, donde se integra la regulación de la ingesta de agua y alimento, se ha detectado la sobre-expresión del receptor de la PRL en estados de hiperprolactinemia (Moore et al., 1989, Sauve et al., 2000). Además, durante la gestación y la lactancia se atenúa la conducta de ansiedad en respuesta al estrés (Hill et al., 2003) y la activación del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal (HPA) (Carter and Lightman, 1987). En apoyo a que esta atenuación de las respuestas al estrés pudieran involucrar a la PRL, se mostró que el bloqueo de la expresión del receptor de la PRL dentro del SNC aumenta los efectos del estrés sobre la generación de ansiedad y la activación del eje HPA (Torner et al., 2002).

Otras acciones de la PRL que pueden o no asociarse con eventos reproductivos incluyen la regulación de la concentración iónica y el volumen sanguíneo (Nicoll, 1980) y efectos inmunomoduladores e inmunoestimuladores. En relación a estas últimas acciones, se conoce que los receptores de la PRL están presentes en diversos tipos de células del sistema inmune donde la PRL regula su proliferación, supervivencia y secreción de mediadores de inflamación (Yu-Lee 2002). De hecho se ha propuesto que la PRL puede contribuir a la progresión de las enfermedades autoinmunes (McMurray, 2001) y ser uno de los factores que

determina la predominancia de algunos de estos padecimientos en las mujeres (Whitacre 2001).

La multiplicidad de funciones de la PRL pudiera también relacionarse a la capacidad que tiene esta hormona como molécula madre precursora de péptidos con actividades biológicas nuevas. El ejemplo mejor documentado de esta posibilidad es el de las vaso-inhibinas. Las vaso-inhibinas, mas no la PRL, inhiben la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis), la vasopermeabilidad, y la vasodilatación (Clapp et al., 2006). En contraste, la PRL estimula la angiogénesis (Clapp et al., 2009). El antagonismo funcional PRL/vaso-inhibinas también parece ocurrir sobre procesos inflamatorios. Las vaso-inhibinas promueven la producción de óxido nítrico, un importante mediador de inflamación, vía la estimulación de la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en células de las vías respiratorias y este efecto es comparable al que ocurre en respuesta a la combinación de tres importantes citocinas proinflamatorias ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $INF\gamma$) (Corbacho et al., 2000). En contraposición, la PRL inhibe la expresión de la iNOS que resulta del efecto conjunto de dichas citocinas (Corbacho et al., 2003). Estas acciones opuestas entre la PRL y las vaso-inhibinas sugieren que la resultante final de los efectos de la PRL depende de los niveles de la PRL y de la actividad de proteasas capaces de convertirla hacia vaso-inhibinas. Al respecto, es importante señalar que la PRL y las vaso-inhibinas se producen no solamente por la hipófisis anterior sino también por múltiples tejidos extrahipofisarios (Ben Jonathan 1996, Cruz-Soto et al., 2009)

2.3 Sitios de producción de PRL y vaso-inhibinas

La PRL se produce principalmente en células conocidas como lactotropos, ubicadas en la hipófisis anterior. Su síntesis también se ha podido confirmar en células del sistema nervioso, la decidua uterina, el epitelio de las glándulas mamaria, lacrimal y sudorípara, en diversos tipos celulares del sistema inmune, en el epitelio prostático y en células endoteliales vasculares (Ben Jonathan et al., 1996, Corbacho et al., 2002). En estos tejidos se ha evaluado la expresión del RNAm pero también de la PRL en función de su masa molecular, inmunoreactividad y

bioactividad en ensayos específicos. Además, la presencia de la PRL se ha detectado en diversos fluidos corporales que incluyen al suero, al líquido cefalorraquídeo, al líquido amniótico, a la leche, al líquido folicular, al humor acuoso y subretiniano, entre otros (Ben Jonathan et al., 1996, Clapp et al., 2009).

La regulación de la síntesis y secreción de la PRL involucra distintos mecanismos que actúan tanto al nivel de la transcripción y traducción, sobre su proceso de secreción. La mayor parte del conocimiento acerca de los mecanismos de regulación de la producción y liberación de esta hormona, derivan de estudios fisiológicos y farmacológicos, que han evaluado los efectos de distintos agentes sobre la función adenohipofisaria *in vivo* o bien sobre los lactotropos en cultivo. Estos estudios han permitido identificar factores externos y ambientales, hormonales hipotalámicos, ováricos y derivados de la glándula suprarrenal, así como factores parácrinos y autócrinos que actúan de manera orquestada para controlar la producción y secreción adenohipofisaria de la hormona (Bole Feysot et al., 1998). Sin embargo poco se sabe acerca de los mecanismos de regulación de la producción de la PRL en las fuentes de producción extrahipofisarias.

Con respecto a las vasoinhibinas, estas se han detectado en la hipófisis anterior (Cruz-Soto et al., 2009), hipotálamo (DeVito et al., 1992), neurohipofisis (Clapp et al., 1994), endotelio vascular (Corbacho et al., 2002), condrocitos (Macotela et al., 2006), retina (Aranda et al., 2005), líquido amniótico (González et al., 2009), líquido subretiniano y en la circulación (Torner et al., 1995, Triebel et al., 2009).

3. PRL, Vasoinhibinas y SNC

3.1 Funciones

Las diversas funciones de la PRL dentro del SNC se apoyan en la distribución generalizada de sus receptores, los cuales predominan en los plexos coroideos y en el hipotálamo (ver revisión Grattan & Kokay, 2008). Otras áreas del SNC donde se ha localizado el receptor de la PRL incluyen: el área periventricular de la región preóptica, el núcleo lecho de la estría terminal, la amígdala medial, el tálamo, la

zona incerta, la habénula lateral, el órgano subfornical, la sustancia gris periacueductal, la sustancia nigra, el cuerpo estriado, la corteza (cingulada, motora y sensorial), el bulbo olfatorio y el área postrema (Pi et al., 1998, Bakowska et al., 1997). Esta distribución amplia de los receptores de la PRL probablemente refleja la complejidad de las acciones de esta hormona, si bien el nivel de expresión es bajo en muchas de estas regiones y podría no tener una relevancia funcional significativa.

Las acciones de la PRL sobre el SNC incluyen: la regulación de la secreción de neurotransmisores y neuropéptidos, la estimulación de la proliferación de neuronas y astrocitos, la regulación del ciclo sueño y vigilia, y la regulación de la expresión de diversas conductas (Grattan & Kokay, 2008). Un ejemplo del efecto de la PRL sobre la secreción de neurotransmisores es su acción sobre las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) en el núcleo arcuato del hipotálamo. La PRL estimula la secreción de dopamina por estas neuronas dando lugar a un mecanismo de retroalimentación negativa sobre su propia secreción. Este mecanismo se apoya también en el efecto inhibitorio de la PRL sobre la secreción del péptido intestinal vasoactivo (VIP), que al producirse por el hipotálamo y ser secretado al sistema portal hipotálamo-neurohipofisario funciona como secretagogo de la PRL hipofisiaria (Ben-Jonathan, 1996). También se han descrito efectos inhibitorios de la PRL sobre la secreción de la GnRH y de las kisspeptinas por las neuronas que las producen (Milenkovic et al., 1994; Sonigo et al., 2012), como parte del mecanismo que media la infertilidad de la lactancia. La PRL también estimula la liberación de las neurohormonas oxitocina y vasopresina por explantes hipotálamo-neurohipofisarios (Mejía et al., 2003). Consistentemente con todas estas acciones, se ha descrito la presencia del receptor de la PRL en las neuronas TIDA (Arbogast et al., 1997, Lerant A et al., 1998), en el núcleo arcuato (NARC) del hipotálamo y en los núcleos paraventricular y supraóptico (NSO) del hipotálamo donde también se encuentran neuronas que producen VIP, el cual ha sido descrito como otro neurotransmisor secretagogo de la PRL (Ben-Jonathan et al., 1996, Roky et al., 1996, Mejía et al., 1997). Asimismo se ha reportado la presencia del receptor corto de la PRL principalmente en las neuronas GnRHérgicas donde se ha

investigado el efecto en la expresión y liberación de la GnRH en respuesta a la PRL (Milenkovic et al., 1994; Ben-Jonathan et al., 1996)

El efecto que la PRL ejerce sobre la oxitocina se ha asociado al aumento de esta hormona durante la lactancia (Grattan, 2001), pero las implicaciones funcionales del efecto de la PRL sobre la secreción de vasopresina son menos claras. Al respecto, recientemente se ha tenido evidencia de que las vaso-inhibinas tienen propiedades vasoconstrictoras, a través de inhibir la producción de óxido nítrico endotelial, un importante relajador del músculo liso vascular (González et al., 2004). Dado que la PRL, pero también las vaso-inhibinas, estimulan la secreción de la vasopresina por el sistema hipotálamo-neurohipofisario, este sería un mecanismo adicional para promover la vasoconstricción sistémica en respuesta a la PRL.

Los efectos neurogénicos y de supervivencia de la PRL en el SNC han despertado un gran interés. Se demostró que esta hormona promueve la neurogénesis en la zona subventricular del hipocampo y la aportación de nuevas neuronas al bulbo olfatorio durante la gestación (Shingo et al., 2003), la proliferación de astrocitos en cultivo (De Vito et al., 1992) y la supervivencia de los fotorreceptores retinianos (Arnold et al., 2014). También se ha propuesto la posible participación de la PRL en la regulación del ciclo sueño-vigilia. La administración icv de PRL promueve la fase de movimientos oculares rápidos del sueño (MOR), mientras que la inmunoneutralización de las PRLs centrales con anticuerpos anti-PRL bloquea dicha fase del sueño (Ben-Jonathan, 1996). Consistentemente se reportó que la hipofisectomía suprime la fase MOR del sueño (Bodosi et al., 2000).

Finalmente y como ya se mencionó, la PRL estimula la conducta maternal (Bridges et al., 1990; Lucas et al., 1998, Grattan & Kokay 2008), disminuye la conducta sexual (Dudley et al., 1982, Witcher et al., 1985, Doherty et al., 1985, Grattan & Kokay 2008), promueve la conducta de ingesta de agua y alimento (Moore et al., 1989, Sauve et al., 2000; Grattan & Kokay 2008) y disminuye la conducta de ansiedad bajo condiciones de estrés (Torner et al., 2001, 2002, 2004).

Dado que el propósito de esta tesis es analizar la posible influencia de la conversión de PRL a vaso-inhibinas sobre la conducta de ansiedad bajo condiciones

de estrés, a continuación se revisan: el concepto de estrés, los antecedentes que ligan a la PRL con la conducta de ansiedad, y si los efectos centrales de esta hormona pudieran derivar de la PRL secretada por la hipófisis (sistémica) o por el SNC (local).

4. ESTRÉS

4.1 Definición

Hans Selye introdujo el concepto de estrés como la respuesta a cualquier estímulo o agente que atenta contra la estabilidad del organismo (estresor), ya sea de carácter interno o externo o de naturaleza física o química, y que se manifiesta en un síndrome de adaptación general, que involucra tres fases:

- a) Fase de alarma: En donde el organismo se percata del agente nocivo, activa su sistema nervioso simpático y la corteza de las glándulas suprarrenales.
- b) Fase de resistencia o adaptación: En la que el organismo hace frente al estresor utilizando los recursos energéticos disponibles para sobrevivir la emergencia.
- c) Fase de desgaste: donde ante la imposibilidad del organismo para hacer frente al agente estresor se desarrollan múltiples patologías que incluso puede derivar en la muerte.

Selye propuso al eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA) como el efector clave de la respuesta al estrés dada la aparente homogeneidad de su respuesta ante su activación por distintos estresores. Además, propuso que las distintas formas de estrés inducen dos tipos de respuesta, una general que implica la liberación de la ACTH y la corticosterona, y la individual mediada por factores tales como predisposición determinada genéticamente (Selye, 1950).

Existe cierta tendencia en algunas especies o animales a tener altos niveles de reactividad a la exposición al estrés o a mostrar conductas de tipo ansiedad, así como cepas de animales criadas con una alta o baja reactividad al estrés, como ocurre con las ratas HAB (high anxiety related behaviors) o LAB (low anxiety related behaviors) (Landgraf, 2003). Además, entre el 30% y el 67% de las enfermedades psiquiátricas se han asociado con tendencia o vulnerabilidad en la regulación de genes como el subtipo 5HT1A del receptor a serotonina, el transportador de

serotonina 5HTT, la enzima monoamino oxidasa-1 (MAO-1), la catecol-O-metiltransferasa (COMT), y la colecistoquinina B (CCK-B), entre otros (Domschke K., et al., 2013).

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

En la actualidad el estrés es un concepto multidimensional, en el cual se considera como “un complejo repertorio de respuestas fisiológicas, tales como la activación del eje HHA y del eje simpático-adrenal, además de respuestas conductuales como la ansiedad, el miedo, la ira, etc., que se generan para restaurar la homeostasis amenazada” (Tsigos et al., 2002).

Los denominados estresores se definen como aquellos estímulos que interrumpen la homeostasis del organismo (causan estrés). Sin embargo la clasificación de estos estímulos es compleja y dependiendo de dónde se originan se les denomina internos (hemorragia, hipoglucemia, etc) o externos (capaces de activar receptores sensoriales, visuales, olfatorios, mecánicos, etc). De acuerdo a su duración se clasifican como estresores agudos (exposición única y de tiempo corto) o crónicos (exposición prolongada, intermitente o continua). También se les clasifica de acuerdo a sus propiedades físicas (frío, calor, vibración) y psicológicas (sociales, emocionales) (Pacak et al., 2001).

La activación del sistema nervioso simpático-adrenal, con la subsecuente liberación de noradrenalina y adrenalina, y la activación del eje HHA, cuyo producto final son los glucocorticoides circulantes, son consideradas como las principales respuestas a estímulos estresores. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que estas respuestas neuroendocrinas varían entre diferentes tipos de estresores y que las diferencias se pueden reflejar en una activación diferencial de centros

integradores hipotalámicos. Por ejemplo, usando como marcador de actividad neuronal al gen c-fos, se ha descrito que estresores como la inmovilización y los choques eléctricos, pero no el estrés por frío o por insulina, activan la subdivisión parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) directamente relacionada con la activación del eje HHA (Pacak et al., 1995).

5. RESPUESTA AL ESTRÉS

5.1 Activación del sistema nervioso autónomo

El sistema nervioso autónomo gobierna principalmente el control de las funciones viscerales no conscientes del organismo, se encuentra compuesto por dos divisiones: la simpática y la parasimpática. El hipotálamo es el sitio integrador de las principales aferentes al sistema autónomo, recibe información procedente de vías sensoriales y viscerales y desencadena la activación del sistema nervioso simpático. Esta regulación comienza cuando las neuronas preganglionares simpáticas de la médula espinal, reciben la información procedente del hipotálamo a través de vías autónomas descendentes que provienen del NPV (o del núcleo del tracto solitario (NTS) localizado en el bulbo raquídeo), de ahí la información es transmitida hasta la cadena ganglionar simpática paravertebral, mediante sinapsis con las neuronas postganglionares, que liberan noradrenalina en los distintos órganos blanco. Por otra parte, las neuronas preganglionares simpáticas estimulan a la médula adrenal para la liberación de adrenalina a la circulación, la cual ejerce sus efectos sobre el corazón y el músculo esquelético.

Como resultado de la liberación de adrenalina se puede obtener energía rápidamente. La adrenalina ejerce efectos metabólicos en el hígado donde estimula la glucogenólisis, lo cual conduce a un aumento de la glucosa en sangre, que puede ser utilizada en los tejidos que más la demanden. Además, la adrenalina y la noradrenalina aumentan la frecuencia cardíaca y respiratoria, la presión sanguínea, y la generación de sudor. Estos cambios facilitan la rápida circulación de la sangre y con ella el aporte de glucosa y oxígeno tanto a los músculos con funciones motoras, como al cerebro, y reducen la circulación en otras partes del organismo menos relevantes para la respuesta al estrés, como el sistema digestivo. Así, en

condiciones de amenaza hacia el organismo, los músculos de las extremidades disponen de la energía necesaria para realizar algún esfuerzo, así como la irrigación facilita al cerebro algunas funciones como la percepción o la atención que pueden facilitar una reacción rápida y eficaz (Sandi, 2002).

5.2 Activación del eje HHA

En la subdivisión media dorsal parvocelular del NPV del hipotálamo se encuentran neuronas que sintetizan a la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y que representan la vía final común para la activación del eje HHA. También se han descrito neuropéptidos secretados por la división parvocelular del NPV tales como la oxitocina y la VP que regulan la producción de la CRH (Aguilera et al., 1993, Herman 1995, Wotjak et al., 1996), y pueden, en el caso de la VP secretada por estas neuronas al sistema portal hipotálamo-hipofisiario, estimular la secreción de la corticotropina (también llamada hormona adrenocorticotrópica o ACTH (Aguilera et al., 1992,1993).

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

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

5.3 Conducta de ansiedad

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

En humanos la ansiedad se delimita a través de las pautas establecidas por el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-IV), donde se define ansiedad como una sensación de apremio, de intranquilidad o desasosiego psicológico derivado de la anticipación del peligro (DSM-IV referencia). Estas sensaciones se han asociado con manifestaciones fisiológicas relevantes tales como un incremento en la presión arterial, la taquicardia, la hipertermia, y la liberación elevada de glucocorticoides, así

como con la expresión de patrones conductuales estereotipados en animales como conductas de defensa que incluyen la respuesta de parálisis, evitación, escape, acicalamiento, defecación y pilo-erección.

Dentro de las estructuras centrales que se ha propuesto que regulan la conducta de ansiedad se encuentra el septum y el circuito de Papez (circuito formado por el hipocampo, cuerpos mamilares, tálamo anterior y corteza del cíngulo). El núcleo amigdalino juega un papel fundamental en conductas emocionales (Steimer, 2002). Se ha descrito como un núcleo de asociación y relevo de diversas emociones, además de que esta región recibe diferentes conexiones recíprocas con estructuras corticales y con el sistema ascendente noradrenérgico que responde a diversos estresores. En general estas estructuras están íntimamente relacionadas con respuestas emocionales, cognitivas, autonómicas y endócrinas (Millan, 2003). Notablemente, el NPV que constituye la vía final común para la secreción de la CRH, responsable de promover la secreción de la ACTH por la hipófisis (Aguilera, 1994), y donde se localizan neuronas responsables de la activación del sistema nervioso simpático, también participa en la integración de la respuesta de ansiedad al estrés (Millan, 2003).

6. PRL, ESTRÉS Y ANSIEDAD

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

Por otra parte, Torner y colaboradores propusieron que la PRL puede modular las respuestas conductuales y neuroendocrinas del estrés y que esta acción la ejerce directamente sobre el SNC. Así, este grupo de investigadores

demonstró que la administración intracerebroventricular (icv) de oligonucleótidos antisentido capaces de bloquear la expresión del receptor de la PRL incrementa la potencia de estresores emocionales (“plataforma elevada” o inmovilización) para producir ansiedad y para estimular la secreción de la ACTH a la circulación (Torner et al., 2001). Consistentemente, mostraron que la administración icv de la PRL reduce la conducta de ansiedad y los niveles circulantes de la ACTH en respuesta a dichos estresores (Torner et al., 2001).

En base a las observaciones anteriores, se sugirió que los altos niveles circulantes de la PRL que tienen lugar durante la lactancia podrían contribuir a explicar la reducida reactividad del eje HHA en esta fase del ciclo reproductor (Torner et al., 2004). Así, en animales experimentales y en humanos en estados hiperprolactinémicos fisiológicos (gestación y lactancia) diversos estímulos estresantes (inmovilización, nado forzado, plataforma elevada, inyecciones hipertónicas, éter, estrés psico-social, choques eléctricos, ruido, cirugías, etc.) ejercen un efecto menor sobre la expresión del RNAm de la CRH y la concentración circulante de glucocorticoides que en individuos con niveles sistémicos basales de PRL (Thoman et al., 1970, Lightman et al., 1989, da Costa et al., 1996, Windle et al., 1997, Neumann et al., 1998, 2000, Altemus et al., 2001). Además, en el NPV se expresa tanto el receptor de la PRL como la propia PRL y las vasoinhíbinas (Clapp et al., 1994). Por lo tanto, la PRL y las vasoinhíbinas de origen sistémico, pero también neuronal, pudieran influir sobre la respuesta central a estímulos estresores.

7. Origen sistémico y neural de la PRL

Se desconoce si la PRL, la cual como hemos dicho es capaz de modular las acciones del estrés, es de origen sistémico o bien de origen neural. Se ha observado que el estrés incrementa los receptores a la PRL en los plexos coroideos (Fujikawa et al., 1995), y que estos receptores son capaces de internalizar a la PRL sistémica al líquido cefalorraquídeo (Grattan y Kokay, 2008). Además, se ha observado que la concentración de la PRL en el líquido cefalorraquídeo se correlaciona con el aumento de la PRL circulante, ya sea en respuesta al estrés (Walsh et al., 1987), o

subsecuente al tratamiento con un antagonista dopaminérgico (Felicio y Bridges, 1992).

Por otra parte, recientemente se reportó que la hiperprolactinemia o el tratamiento icv con PRL aumentan los niveles sistémicos de OT y VP vía la activación de la producción de óxido nítrico en neuronas del SON y del NPV (Vega et al., 2010). Estas acciones podrían repercutir sobre la activación del eje HHA. La VP y la OT regulan la secreción de la CRH por neuronas parvicelulares del NPV (Sawchenko et al., 1992), pero también pueden actuar sobre sus receptores en la hipófisis anterior estimulando a los corticotropos a sintetizar y liberar ACTH (Herman et al., 1989).

Si bien parece no haber duda de que la PRL sistémica puede ser transportada al cerebro, múltiples evidencias apoyan la producción de la PRL en el cerebro, particularmente en el hipotálamo, donde la inmunoreactividad a la PRL no desaparece en respuesta a la hipofisectomía (Torner et al., 1995; Grattan y Kokay, 2008). Por otra parte, estudios de perfusión (push-pull) mostraron la liberación de la PRL en el PVN y en el área media preóptica en respuesta a un período de estrés por inmovilización (Torner et al., 2004). Estos hallazgos son consistentes con el reporte que muestra la presencia de la PRL inmunoreactiva dentro de vesículas de secreción en neuronas hipotalámicas (Mejia et al., 1997), y con la secreción de PRL-dependiente de calcio por fragmentos de hipotálamo incubados *in vitro* o por explantes del sistema hipotálamo-neurohipofisario (Torner et al., 1995). Más directamente, se demostró la expresión del RNA mensajero de la PRL por la reacción en cadena de la polimerasa y por hibridación *in situ* en el hipotálamo y en otras regiones del cerebro (DeVito et al., 1992, Clapp et al., 1994; Roselli et al., 2008). De hecho, también se demostró que el RNA mensajero de la PRL aumenta en el hipotálamo de ratas lactantes bajo condiciones de estrés (Torner et al., 2002; Torner et al., 2004). Finalmente, se reportó que el sistema hipotálamo-neurohipofisario produce y secreta vasoinhibinas (Clapp et al., 1994), que las vasoinhibinas son secretadas por fragmentos de hipotálamo en cultivo (De Vito, et al., 1987; Torner et al., 1995), y que el tratamiento con estrógenos puede reducir la

conversión de la PRL hacia vasoinhibinas en extractos neurohipofisarios de animales ovariectomizados (Torner et al., 1999).

El hecho de que el hipotálamo y, en particular el NPV, produzca y secrete a la PRL y a las vasoinhibinas, y que dicha producción puede incrementarse bajo condiciones de estrés, sugiere que estas hormonas también podrían actuar localmente a manera de neuropéptidos sobre la integración de las respuestas al estrés que se llevan a cabo en este núcleo hipotalámico.

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La PRL actúa en el SNC reduciendo las respuestas neuroendócrinas y conductuales del estrés. Estos efectos pueden resultar tanto de la PRL sistémica una vez que se incorpora al cerebro vía sus receptores en los cuerpos coroideos, como de la PRL que es sintetizada en el cerebro y puede actuar como un neuropéptido modulando las respuestas al estrés. Sin embargo, estas acciones de la PRL podrían involucrar mecanismos adicionales. Se conoce que la PRL es convertida proteolíticamente hacia vasoinhibinas en el hipotálamo, y que estos péptidos frecuentemente ejercen efectos opuestos a los de la PRL. La PRL estimula la angiogénesis mientras que las vasoinhibinas son antiangiogénicas. La PRL tiene efectos anti-inflamatorios sobre tipos celulares donde las vasoinhibinas son proinflamatorias. Sin embargo, tanto la PRL como las vasoinhibinas estimulan la secreción de VP por el sistema hipotálamo-hipofisario.

Dado que las vasoinhibinas están presentes en el hipotálamo y tienen efectos que pueden diferir o no de los ejercidos por la PRL, en esta tesis investigamos si las vasoinhibinas afectan la conducta de ansiedad y si su generación se modifica bajo condiciones de estrés.

9. HIPÓTESIS

Las vasoinhibinas modifican la conducta de ansiedad y su generación hipotalámica se altera bajo condiciones de estrés.

10. OBJETIVOS

OBJETIVO 1

Determinar si la administración icv de vasoinhibinas tiene efecto sobre conductas de tipo ansiedad (en la plataforma elevada en cruz y el campo abierto) o de depresión (en el nado forzado)

OBJETIVO 2

Determinar si el estrés por inmovilización modifica la expresión de la PRL en el hipotálamo y los niveles sistémicos e hipotalámicos de la PRL y de las vasoinhibinas.

OBJETIVO 3

Determinar si el estrés por inmovilización modifica la actividad de las proteasas hipotalámicas capaces de generar vasoinhibinas a partir de la PRL.

11. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

En las pruebas conductuales se utilizó Vasoinhibina recombinante de 14 kDa, con los primeros 123 aminoácidos de la secuencia de la PRL humana y un extremo de 7 histidinas, generadas como se describe en Galfione et al., 2003.

En los ensayos de corte, y como estándar en los ensayos de Western blot, se utilizó PRL de rata, la cual fue obtenida del National Hormone and Pituitary Program (NHPP) y donada por el Dr. A.F. Parlow (Universidad de Harbor California, Centro Médico los Ángeles, Los Ángeles, CA)

La PRL cortada en el extremo carboxilo-terminal y una vasoinhibina de 16kDa conteniendo los 145 aminoácidos de la PRL de rata fueron usadas como estándar en los Western blots, y estas proteínas fueron generadas por proteólisis enzimática

de la PRL antes referida con extractos de glándula mamaria enriquecidos en Catepsina D, como se ha reportado previamente (Clapp et al., 1987)

Animales

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

La justificación de usar ratas hembras en los experimentos se basa en la gran influencia que tiene la PRL sobre conductas reproductivas en las hembras (Grattan & Kokay, 2008). Para su sacrificio fueron anestesiadas mediante su exposición a un ambiente saturado de CO₂ y decapitadas posteriormente.

El comité de Bioética del instituto de Neurobiología de la UNAM aprobó el manejo experimental de los animales.

Introducción de las cánulas guía y microinyección

Se implantaron bilateralmente cánulas guía estereotáxicamente bajo anestesia (70% ketamina y 30% xilacina 1.0 µl/gr, i.p). Las cánulas se prepararon con agujas de acero romas (0.7 x 30 mm), las cuales se colocaron en las coordenadas que corresponden a los ventrículos laterales [antero-posterior 0.5mm, medio lateral 1mm, dorsoventral 3.2mm] (Paxinos, 1986) de manera bilateral y se aseguraron con cemento acrílico mediante dos tornillos insertados en el hueso del cráneo. Los experimentos se realizaron 5 días después de la cirugía, tiempo en que los animales fueron manipulados diariamente simulando el proceso de inyección.

Se inyectaron 4 μl de vehículo (25nM Hepes, 0.01% Triton, 0.1% glicerol, pH 7.4) o 250 ng/ μl de la Vi recombinante. La vasoinhibina recombinante corresponde a los primeros 123 aminoácidos de la PRL humana que definen una masa molecular de 14 kDa y fue generada en células de insecto de acuerdo al método previamente descrito por nuestro laboratorio (Galfione et al., 2003). Las ratas se colocaron en el cuarto de evaluación 24 horas antes del experimento para todas las pruebas conductuales. Todos los experimentos se realizaron entre las 12 y las 14 hrs. Además, el día anterior al experimento se colocó un inyector dentro de la cánula guía, de tal forma que el posible rompimiento celular que conlleva la introducción de este no afectara las infusiones experimentales. En todos los casos la inyección fue con un flujo de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una vez finalizada la infusión se esperaron 30 segundos para retirar el microinyector con el objeto de facilitar la difusión de la hormona.

Plataforma elevada

La plataforma elevada o laberinto en cruz es una prueba validada para evaluar la conducta de ansiedad y se llevó a cabo de acuerdo al método descrito (Torner et al., 2001). Brevemente, la plataforma elevada está compuesta de dos brazos abiertos (50 cm largo X 15 cm ancho) y dos brazos cerrados (50 cm largo X 10 cm ancho X 40 cm de alto), que se cruzan en el medio y que se elevan 75 cm del suelo (Pellow et al., 1985). Los animales son colocados individualmente en la intersección de los brazos con la cara dirigida hacia los brazos cerrados y la prueba tiene una duración de 5 minutos. La conducta fue videograbada y un observador ciego al tratamiento registró tanto el número de entradas como el tiempo de permanencia en cada brazo. Una entrada se consideró "completa" si y solo si la rata colocaba las cuatro extremidades fuera de la intersección y dentro del brazo. Después de la prueba los animales fueron regresados a su jaula individual. La plataforma elevada se limpió con jabón inodoro entre cada animal.

Los animales tienden a tener una conducta exploratoria y si se encuentran bajo condiciones de estrés o muy ansiosos, esta conducta se ve abatida y permanecen más tiempo en donde se consideran seguros, que en este caso corresponde a los brazos cerrados. De acuerdo a estos criterios se estima que un

mayor tiempo en los brazos cerrados corresponde a un aumento en la conducta de ansiedad (Pellow et al., 1985)

Campo abierto

La prueba del campo abierto se llevó a cabo en una caja poligonal (90cm X 90cm X 40cm) delineada con 3 X 3 cuadrantes en el suelo cada uno de 30 cm X 30 cm. Una luz colocada por encima de la caja ilumina el cuadrante medio de la caja. La duración de la prueba fue de 5 min cuantificándose el número de entradas al cuadrante central y el número de bolos fecales como índice de ansiedad. Las entradas a los cuadros periféricos no iluminados se utilizaron como índice de locomoción y exploración. Las evaluaciones se tomaron por un observador ciego al tratamiento de acuerdo al método reportado (Carola et al 2002).

Nado forzado

Esta prueba evalúa estrategias activas o pasivas que la rata utiliza para contender con situaciones de estrés y el efecto de drogas anti-depresivas (Marti & Armario, 1993). Cada rata es colocada en un cilindro de acrílico (50 cm de profundidad X 30 cm de diámetro) que contiene agua hasta una altura de 35 cm y a una temperatura de 21 °C. El nado forzado se grabó por 10 min y un observador ciego al tratamiento cuantificó: 1) el tiempo de nado activo, definido como el movimiento intenso de las cuatro extremidades, donde el tren anterior rompe la superficie del agua o araña la pared del cilindro; 2) tiempo de nado, definido como el desplazamiento exploratorio a través de la superficie o el fondo del cilindro moviendo las cuatro extremidades; 3) tiempo de flotación, definido como una conducta esencialmente inmóvil con movimientos ocasionales para mantenerse a flote con la nariz fuera del agua; y 4) la latencia en comenzar a flotar. La menor latencia y el mayor tiempo de flotación se consideran parámetros que indican mayor conducta depresiva.

Inmovilización

El estrés por inmovilización se considera una combinación de estrés físico y psicológico. Dos de dichos componentes estresores son la disminución de la temperatura del cuerpo y la molestia/ansiedad asociada con la incapacidad del movimiento. Las respuestas máximas se aprecian en los primeros 30 minutos de la inmovilización y la magnitud de la respuesta disminuye después de una exposición crónica a dicha maniobra experimental que refleja habituación y fatiga de los sistemas efectores de los estresores (Pacak et al., 1995, 1997, 2001).

En el presente trabajo se utilizó el estrés por inmovilización dado que en estudios previos se había observado que este procedimiento estimula la expresión de la PRL en el hipotálamo (Torner et al., 2004). Los animales se inmovilizaron por 30 min a través de introducirlos en unos embudos de plástico suave (DecapiCones, Braintree Scientific Inc., Braintree, MA) con un orificio frontal para respirar. Un grupo de ratas se sacrificó (decapitación posterior a sedación por exposición a una atmósfera saturada de CO₂) inmediatamente después de terminar el período de inmovilización, mientras que otros grupos fueron devueltos a sus jaulas para posteriormente ser sacrificados mediante el mismo procedimiento a los 60 o a los 360 minutos después de iniciar el estrés por inmovilización. Otros animales se inyectaron intraperitonealmente con 5 mg/Kg de bromocriptina (Parlodel, Novartis Pharmaceuticals Inc., Basel, Switzerland) 24 horas antes y una hora antes de iniciar o no el período de estrés por inmovilización. La sangre se obtuvo por decapitación y el suero se congeló inmediatamente a -70 °C. Los hipotálamos se aislaron a través de un corte rostral al quiasma óptico, dos cortes a los márgenes laterales de la eminencia media, un corte caudal a los cuerpos mamilares y un corte bajo toda la zona a una profundidad de 2 mm. Los hipotálamos se congelaron inmediatamente y se mantuvieron a -70 °C por no más de dos días al cabo de los cuales el tejido congelado se pulverizó en nitrógeno líquido y se dividió en dos alícuotas: una para ser evaluada inmediatamente por qPCR y la otra se mantuvo congelada hasta ser evaluada por Western blot.

Western Blot

Los hipotálamos fueron extraídos y homogenizados en buffer de lisis (0.5% Igepal, 0.1% SDS, 50mM Tris, 150 mM NaCl, 1µg/ml aprotinina, y 100 µg/ml PMSF, pH 7.4) y analizados para PRL por RIA y para PRL y Vi por Western blot.

Sesenta µg de proteína total fueron procesados por electroforesis en geles de 15% SDS-PAGE, transferidos y revelados mediante incubación con un antisuero anti-PRL (α -PRL, C-1, 1:250) o con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo N-terminal de la PRL (N-Term, INN-1; 1:100) (Dueñas et al., 1999; Aranda et al., 2005). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA) y las densidades ópticas de las bandas inmunorreactivas se analizaron mediante el programa Quantity One (Bio-Rad).

Radioinmunoensayo (RIA) para PRL

El RIA se llevó a cabo mediante el método convencional utilizando reactivos provistos por el Programa Nacional de Hormonas y Pituitaria (NHPP) de los EUA y el Dr. A.F.Parlow (Harbor-University of California, Los Angeles Medical Center, Los Angeles, CA), utilizando la preparaciones rPRL-I-6 y rPRL-RP-3 de la PRL de rata.

qPCR

El RNA total fue extraído de los hipotálamos pulverizados en TRIZOLI (Invitrogen, Carlsbad, CA) por 10 seg. La retrotranscripción se realizó con 1 µg de RNA total y el estuche High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, Foster City, CA). Los productos de la PCR se detectaron y cuantificaron mediante el método de SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA) en 10 µl de reacción final conteniendo templado y 0.5 µM de cada par de oligonucleótidos para *Prl*: sentido 5' TTATTGCCAAGGCCATCAAT-3' y antisentido 5'-TGAAACAGAGGGTCATTCCA-3'; y para el gen casero *Gapdh*: sentido 5' GTCCACTGGCGTCTTCACCA-3' y antisentido 5'GTGGCAGTCATGGCATGGAC-3'. Los parámetros fueron 10 min a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de amplificación (10 seg a 95°C 30 seg a la temperatura específica de hibridación de los oligos y 30

seg a 72°C). Los resultados se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y los ciclos de amplificación se normalizaron contra los del gen casero *Gapdh*.

Ensayo de Corte de la PRL

La actividad de las enzimas capaces de cortar a la PRL en vasoinhibinas se analizó a través de incubar 200 ng de PRL recombinante de rata (adquirida del NHPP y del Dr. A.F. Parlow) en 5 μ l de buffer de incubación (0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl, y 0.01M CaCl₂. pH 7.0) con diferentes cantidades de proteína de lisados de hipotálamo de animales estresados o no estresados en un volumen final de 20 μ l por 24h a 37°C.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Sigma STat 7.0 (Systat Software Inc., San José, CA). Los datos se presentan como promedios \pm error estándar de la media. Las diferencias entre dos o más grupos se analizaron mediante la prueba de la t de Student no pareada o por análisis de varianza (ANOVA) de una cola, seguido por la prueba post hoc, respectivamente. La pruebas de Newman–Keuls o Fisher para el análisis conductual y las pruebas de Tukey o de Holm-Sidak para los análisis de proteínas y RNA. La significancia se estableció para valores de $p \leq 0.05$.

12. RESULTADOS

I. *Las Vi estimulan la conducta de ansiedad y depresión*

La administración *icv* de una vasoinhibina recombinante aumentó la conducta tipo ansiedad en la plataforma elevada, tal como lo indica la disminución en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (Fig. 2). Esta disminución no se debe a una reducción en la locomoción de los animales dado que el número de entradas a los brazos cerrados, considerada como índice de locomoción (Pellow et al., 1985) fue similar entre los animales tratados o no con vasoinhibinas (Fig. 2).

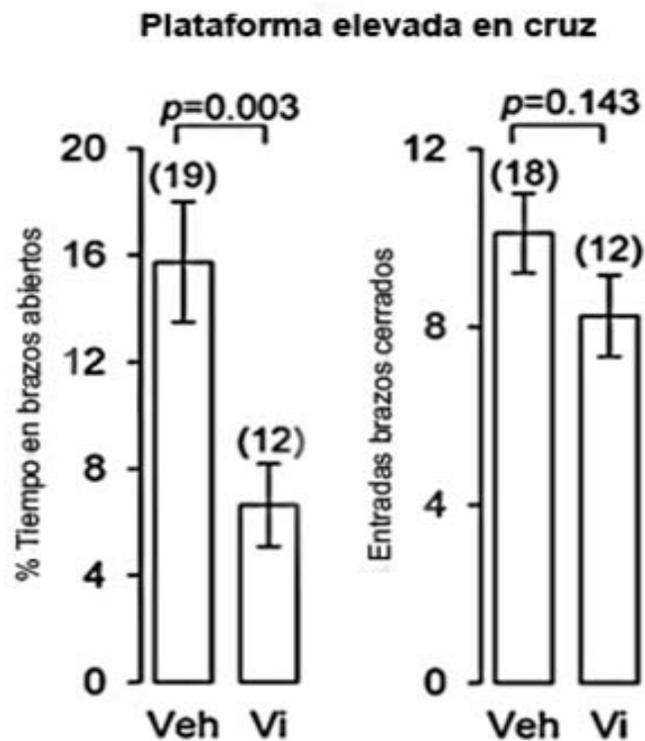


Figura 2. Las Vi estimulan la conducta de ansiedad. La Vi recombinante o el vehículo (Veh) se administraron *icv* 10 min antes de la exposición a la plataforma elevada, una prueba convencional para evaluar la conducta de ansiedad. Las barras representan promedios \pm errores estándar. El número de animales se indica en el paréntesis. Se muestran las significancias estadísticas

El tratamiento con Vi también resultó en una mayor conducta de ansiedad en la prueba conductual de campo abierto. En los animales que recibieron Vi *icv*, se observó una disminución significativa del número de cruces en el cuadrante medio iluminado y un mayor número de bolos fecales en comparación con los animales tratados sólo con el vehículo (Fig. 3). De manera consistente con la falta de efectos de las Vi sobre la locomoción, no se observaron diferencias en la entrada a los cuadros periféricos entre los grupos (Fig. 3).

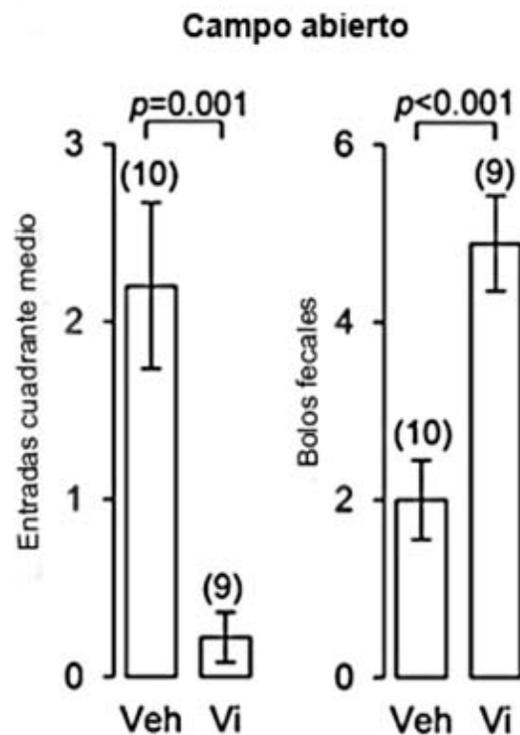


Figura 3. Las Vi estimulan la conducta de ansiedad. La Vi recombinante o el vehículo (Veh) se administraron *icv* 10 min antes de la exposición al campo abierto, una prueba convencional para evaluar la conducta de ansiedad y la locomoción. Las barras representan promedios \pm errores estándar. El número de animales se indica en el paréntesis.

Finalmente, se analizó el efecto de administrar Vi *icv* en la prueba de nado forzado, la cual ha sido descrita para evaluar estados conductuales de depresión. En esta prueba se observó que las Vi estimulan la expresión de la conducta de tipo

depresiva, ya que disminuyó la latencia y el tiempo de flotación comparada con ratas control (Fig. 4). No hubo efectos en el tiempo de nado activo (107 ± 19 vs. 111 ± 9 seg para los grupos tratados con vasoinhibina y el vehículo, respectivamente; $p=0.836$) ni en el de nado de desplazamiento o exploratorio (477 ± 19 vs. 480 ± 10 seg, para los grupos tratados con la vasoinhibina y el vehículo, respectivamente; $p=0.202$).

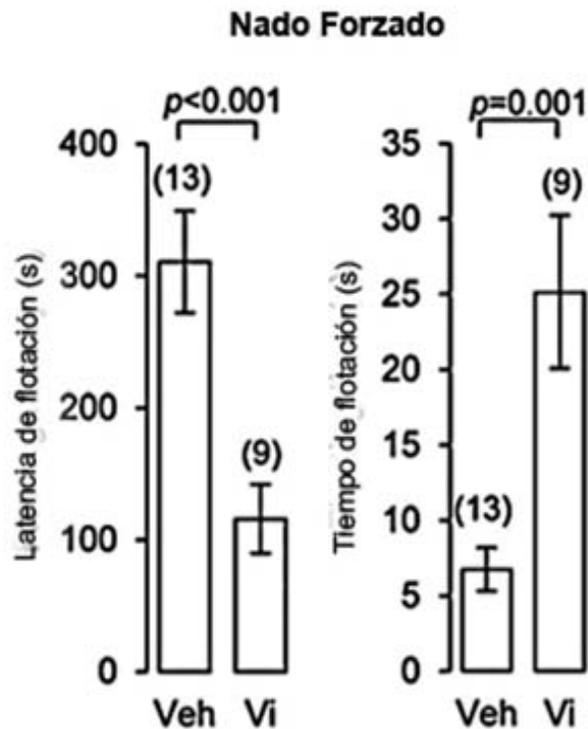


Figura 4. Parámetros conductuales de la prueba de nado forzado. Se observa la latencia de flotación y el tiempo. La Vi recombinante o el vehículo (Veh) se administraron *icv* 10 min antes de colocarlas en el cilindro de nado. Las barras representan promedios \pm errores estándar. El número de animales se indica en el paréntesis.

II. Efecto del estrés por inmovilización sobre la expresión del RNA mensajero de PRL en el hipotálamo y los niveles sistémicos e hipotalámicos de PRL y de Vasoinhibinas

Para investigar si el estrés induce un aumento en los niveles de la PRL y de las vasoinhibinas en el hipotálamo, sometimos a ratas hembras a un periodo de 30 minutos de estrés por inmovilización y realizamos mediciones de los niveles de la PRL circulante (Fig. 5A). De manera consistente con lo ya reportado, después de los 30 minutos de inmovilización, los niveles circulantes de la PRL se elevaron hasta 6 veces con respecto al control ($p < 0.001$) y regresaron a su estado basal a los 60 minutos del inicio de la exposición al estrés. El tratamiento con bromocriptina, un agonista dopaminérgico de los receptores D2 de la dopamina, previno ese incremento (Fig. 5).

Dado que se ha descrito que la PRL es capaz de entrar al cerebro a través de sus receptores presentes en los plexos coroideos (Walsh et al. 1987), analizamos por RIA los niveles de la PRL hipotalámica y su relación con los niveles de la PRL sistémica. En contraste con el aumento en los niveles circulantes de la PRL, en el hipotálamo no encontramos cambios al finalizar los 30 minutos de exposición al estrés, sin embargo la PRL hipotalámica aumentó a los 60 min ($p < 0.001$) y a los 360 min ($p < 0.02$) post-estrés. El incremento en los niveles de la PRL hipotalámica no fue bloqueado por la administración de bromocriptina. (Fig. 5B).

Más aún, analizamos la síntesis del RNA mensajero de la PRL en extractos hipotalámicos de animales controles y animales estresados (Fig. 5C). Encontramos que a los 60 min post-estrés se observa un aumento significativo ($p < 0.021$), el cual se abate a los 360 min post-estrés, lo cual es consistente con los datos reportados previamente (Torner et al., 2004) y apoya la posible síntesis central de la hormona por efecto del estrés.

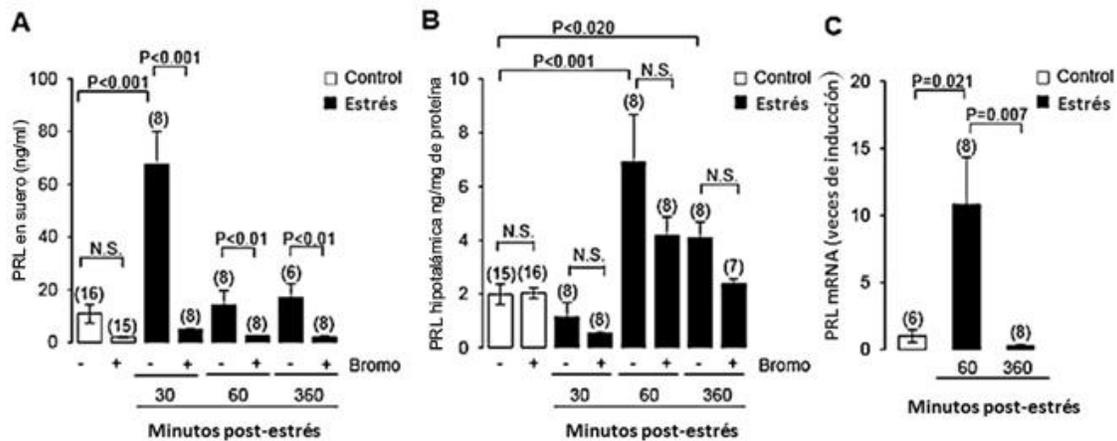


Figura 5. El estrés aumenta los niveles de la PRL hipotalámica a través de estimular su síntesis local pero no su incorporación a partir de la circulación. Los niveles de la PRL fueron evaluados mediante RIA en el suero (A) y en extractos hipotalámicos (B) antes (Control) o después (Estrés) de 30, 60 y 360 min de exposición a 30 minutos de estrés por inmovilización, en ausencia (-) o en presencia (+) de bromocriptina (Bromo), un inhibidor de la secreción hipofisiaria de PRL. Evaluación por PCR cuantitativo del RNA mensajero de la PRL en el hipotálamo de ratas control y estresadas (C). Las barras indican los promedios \pm errores estándar. Los números dentro de los paréntesis indican el número de muestras analizadas en cada grupo. **N.S.**, no significativo.

Para poder discriminar entre la PRL y las vasoinhibinas, los niveles hipotalámicos de ambas proteínas se evaluaron mediante la técnica de Western Blot, usando anticuerpos policlonales que reconocen a la molécula completa de la PRL (α -PRL) y el anticuerpo monoclonal INN-1 (N-Term) que reacciona con el extremo N-terminal de la PRL, que es la parte de la molécula de PRL presente en las vasoinhibinas (Fig. 6). Los lisados hipotalámicos contienen proteínas inmunorreactivas de 23 y de 17 kDa que muy probablemente corresponden a la PRL y a una vasoinhibina, respectivamente, ya que las dos son detectadas por los anticuerpos α -PRL (Fig. 6A) y el anticuerpo N-Term (Fig. 6B). La PRL y la vasoinhibina se cuantificaron en blots revelados con el anticuerpo α -PRL después de normalizar los valores contra la cantidad del control de carga, la β -tubulina (Fig. 6C). De manera consistente con los datos obtenidos en el RIA se observó un aumento en los niveles de la PRL hipotalámica a los 60 min de iniciado el estímulo estresor que disminuyó posteriormente (Fig. 6C). En contraste, los niveles de vasoinhibinas fueron similares en los hipotálamos de ratas estresadas y control.

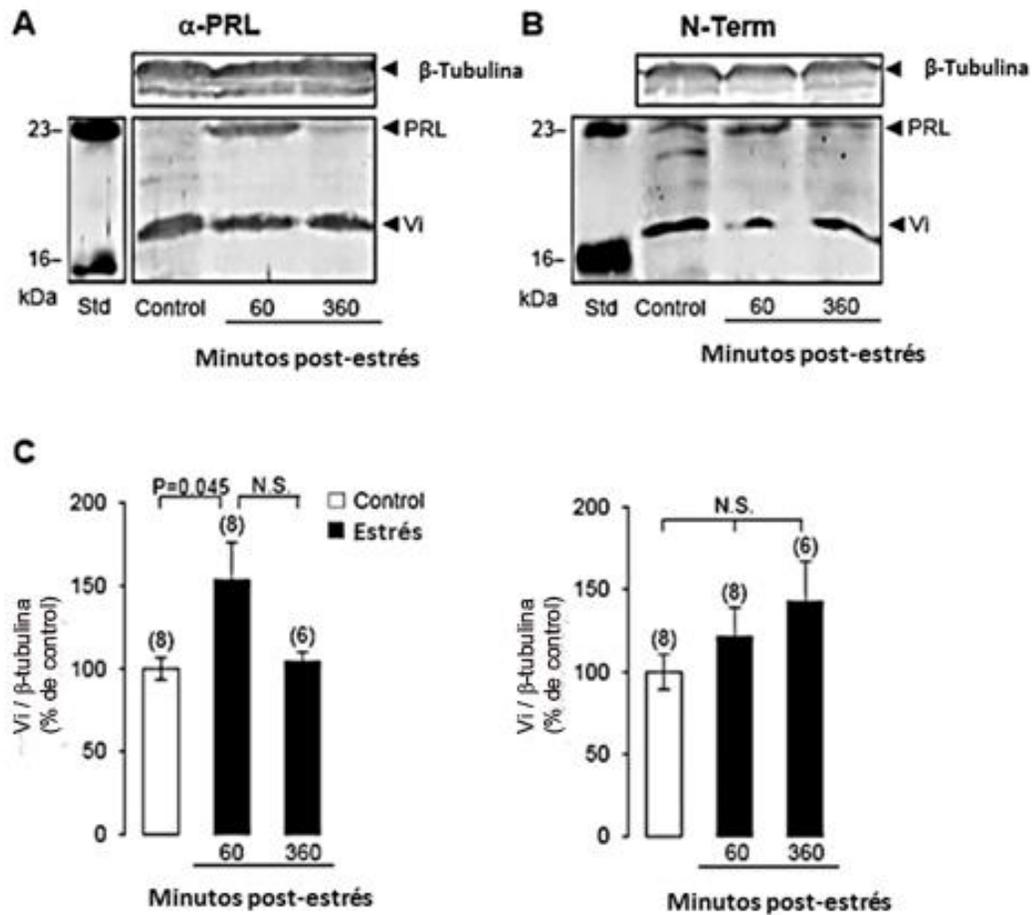


Figura 6. La exposición al estrés incrementa los niveles hipotalámicos de la PRL pero no de las vasoinhibinas (Vi). Los animales fueron expuestos (Estrés) o no (Control) a un periodo de 30 min de estrés por inmovilización y sacrificadas 60 o 360 min después del inicio del estrés. Western blots representativos de los extractos hipotalámicos revelados con el anticuerpo policlonal α -PRL (**A**) o con el anticuerpo monoclonal N-Term (**B**). Los números a la izquierda denotan las posiciones de marcadores de peso molecular. (**C**) Cuantificación por densitometría de las bandas de PRL y Vi en extractos de hipotálamo procesados por Western blots revelados con el α -PRL. Los valores densitométricos fueron normalizados por el control de carga, la β -tubulina. Las barras son promedios \pm errores estándar. Los números dentro del paréntesis indican el número de ratas de cada grupo. N.S., no significativo.

III. *El estrés por inmovilización disminuye la actividad de las proteasas que cortan PRL hacia vasoinhibinas en el hipotálamo*

Para entender cómo es que el estímulo estresor genera un aumento en la PRL hipotalámica que no se traduce en más vasoinhibinas, analizamos si la actividad de las enzimas capaces de generar vasoinhibinas a partir de la PRL disminuye bajo condiciones de estrés. Para esto una preparación de PRL recombinante se incubó con tres concentraciones diferentes de proteína de extractos hipotalámicos obtenidos de animales no estresados o bien de ratas sometidas a un período de estrés por inmovilización y sacrificadas 60 o 360 minutos después de haber iniciado dicho estrés (Fig. 7). El análisis por Western blot reveló que la incubación de la PRL con los extractos hipotalámicos resulta en la conversión parcial de la hormona a una vasoinhibina de 17 kDa y dicha conversión fue dependiente de la concentración de proteína en los extractos. La incubación de la PRL con extractos hipotalámicos provenientes de animales estresados y sacrificados 60 minutos post-inicio del estrés redujo la cantidad de vasoinhibinas generadas ($p = 0.25$), y este efecto se revirtió al cabo de los 360 minutos post-estrés (Fig. 7B).

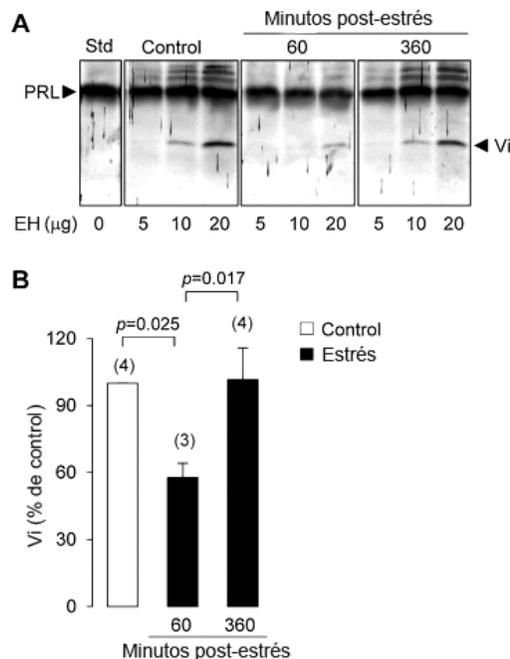


Figura 7. La exposición al estrés disminuye la actividad de proteasas capaces de cortar PRL hacia vasoinhibinas (Vi) en el hipotálamo. (A) Análisis por Western blot de Vi generadas cuando 200 ng de PRL recombinante es incubada a pH 7.0 con las cantidades indicadas de proteína de extracto hipotalámico (EH) obtenido de ratas expuestas o no (Control) a un periodo de 30 min de estrés por inmovilización y sacrificadas 60 o 360 min después de iniciado el estrés. (B) Las bandas de Vi generadas cuando 200 ng de la PRL recombinante fue incubada a pH 7 con 20 μg de proteína de los EH se evaluaron mediante densitometría y los resultados se expresaron como un porcentaje de las bandas evaluadas después de la incubación con la misma cantidad de proteína de los EH de las ratas control. Las barras son promedios ± errores estándar. Los números dentro del paréntesis indican los el número de muestras analizadas en cada grupo. N.S, no significativo.

13. DISCUSIÓN

Cada vez es más claro que las acciones de la PRL sobre los vasos sanguíneos dependen de su procesamiento proteolítico hacia vasoinhibinas, una familia de péptidos con efectos opuestos a los de la PRL sobre la angiogénesis y la inflamación (Clapp et al., 2009). En el presente estudio extendemos los efectos contrarios de las vasoinhibinas a la promoción de respuestas conductuales al estrés. Mostramos por primera vez que la administración icv de vasoinhibinas incrementa

conductas tipo ansiedad y depresión y que la exposición a un período agudo de estrés disminuye la conversión de PRL a vasoinhibinas en el hipotálamo.

La administración icv de una vasoinhibina recombinante incrementó las respuestas de ansiedad y depresión en la plataforma elevada, el campo abierto y el nado forzado, pruebas convencionales para la evaluación de los efectos de agentes ansiolíticos y anti-depresivos (Marti & Armario, 1993; Carola et al 2002). Como se espera para una sustancia ansiogénica, la vasoinhibina disminuyó el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y el número de entradas al cuadrante medio iluminado en la plataforma elevada y en el campo abierto, respectivamente. Estos parámetros conductuales indican una mayor aversión a áreas expuestas, no-protegidas. Estas alteraciones conductuales no se deben a una posible interferencia con la movilidad del animal por el tratamiento con la vasoinhibina, ya que no se observaron cambios en parámetros convencionales de locomoción (número de entradas a los brazos cerrados de la plataforma elevada o a los cuadrantes periféricos del campo abierto). Más aún, en la prueba del nado forzado, las ratas tratadas con la vasoinhibina mostraron una menor latencia de flotación y un mayor período de inmovilidad. Estos parámetros reflejan una conducta depresiva que ha sido validada con sustancias tales como las benzodiazepinas, el alcohol y los barbitúricos, conocidos depresores del SNC (Kitada et al., 1981).

La dosis empleada de la vasoinhibina (1 μ g) fue similar a la que se ha utilizado para evaluar los efectos ansiolíticos de la PRL (Torner et al 2001) y se seleccionó para poder comparar las potencias relativas de ambos péptidos. Sin embargo, muy probablemente se trata de una dosis farmacológica y pudiera implicar el que las vasoinhibinas actúen como antagonistas del receptor de la PRL. Las vasoinhibinas carecen de la hélice 4, que comprende varios de los residuos que conforman el sitio 1 de unión de la PRL a su receptor y que es requerido para su dimerización y activación (Bole-Feysot et al., 1998). Al respecto, existen evidencias de que las vasoinhibinas se unen débilmente a los receptores de la PRL (Clapp et al., 1989) y de que pueden funcionar como agonistas parciales de la hormona en bioensayos específicos (Clapp et al., 1988). Sin embargo, el efecto de las

vasoinhibinas también puede ser independiente de su unión a los receptores de la PRL. Se han reportado sitios de unión saturables y de alta afinidad ($K_d = 1-10$ nM) para las vasoinhibinas, que son diferentes a los receptores de la PRL, en membranas de células endoteliales (Clapp & Weiner, 1992) y del cerebro (Clapp et al., 1989). No obstante, estos posibles receptores de las vasoinhibinas no han sido identificados químicamente y se desconoce si son los responsables de mediar sus acciones vasculares, inflamatorias, ansiogénicas y depresivas. De hecho, es posible que los efectos de las vasoinhibinas en el SNC involucren sus acciones vasculares. Las vasoinhibinas actúan sobre las células endoteliales inhibiendo su vasodilatación (Gonzalez et al., 2004), y varios estudios han correlacionado las conductas de ansiedad y depresión con la atenuación del flujo sanguíneo cerebral (Rauch et al., 2006; Giardino et al., 2007) debida a la disfunción endotelial (Park and Pepine, 2010).

El hecho de que las vasoinhibinas ejerzan efectos opuestos a los efectos ansiolíticos y antidepresivos de la PRL (Torner et al., 2001) indica que la PRL contiene en su molécula la capacidad tanto de inhibir como de estimular las respuestas emocionales del estrés y, por ende, que su procesamiento proteolítico influye sobre la resultante final de sus acciones. Por lo tanto, la conversión de la PRL a vasoinhibinas permitiría explicar resultados controversiales que asocian niveles elevados de PRL con altos niveles de ansiedad en la rata (Torner & Neumann, 2002) o con la mayor ansiedad que se ha reportado en pacientes con prolactinomas (Reavley et al., 1997).

Para investigar la posible relación entre la PRL y las vasoinhibinas y las respuestas emocionales al estrés analizamos el efecto del estrés por inmovilización sobre los niveles hipotalámicos de estas moléculas. Encontramos que la inmovilización eleva los niveles de la PRL circulante y de la PRL hipotalámica medidas por el RIA, si bien con una dinámica diferente. La diferencia temporal entre la elevación temprana y tardía de la PRL circulante e hipotalámica, respectivamente, bien pudiera reflejar el tiempo requerido para el transporte de la PRL circulante al cerebro. En apoyo a esta posibilidad, se reportó que la administración del antagonista dopaminérgico, domperidona, induce un aumento inmediato de la PRL

circulante que es seguido 30 a 40 minutos después por la elevación de la hormona en el líquido cefalorraquídeo (Felicio & Bridges, 1992). Sin embargo, los niveles de la PRL hipotalámica no necesariamente dependen de su concentración en la circulación. Nuestro trabajo mostró que el tratamiento con bromocriptina, un agonista dopaminérgico, inhibe la elevación en los niveles circulantes de la PRL inducidos por la inmovilización pero no modifica el efecto de dicho estrés sobre la concentración hipotalámica de la hormona. Además, se ha reportado que el estrés por exposición a éter, si bien produce un patrón de PRL en la circulación similar al inducido por la inmovilización (Reichlin, 1988), no modifica los niveles de PRL en el líquido cefalorraquídeo (Barbanel et al., 1986). A este respecto, nuestro trabajo confirmó un reporte previo (Torner et al., 2004) que muestra que el estrés por inmovilización estimula la expresión del RNA mensajero de la PRL en el hipotálamo, por lo que también es posible que la síntesis local contribuya al aumento retardado de la PRL hipotalámica en respuesta al estrés.

Sin embargo, cabe mencionar que la síntesis neuronal de la PRL es aún controversial. No se ha demostrado la expresión del RNA mensajero de la PRL por hibridación in situ en neuronas de roedores. Empero, con el uso de esta técnica se reportó la síntesis local de PRL en el núcleo paraventricular y en otras áreas del hipotálamo del cerebro adulto y fetal de la oveja (Roselli et al., 2008), si bien no se demostró la identidad neuronal de las células positivas. Desconocemos si en nuestro estudio, las células que expresan PRL en el hipotálamo corresponden a neuronas o a otro tipo celular (glía, endotelio, células inmunes circulantes).

El RIA esencialmente cuantifica a la PRL íntegra, ya que las vasoinhibinas tienen una baja inmunorreactividad (2%) en este ensayo (Clapp et al., 1988). En ausencia de un análisis cuantitativo, el único método para evaluar los niveles de vasoinhibinas es por Western blot y densitometría óptica, un método semicuantitativo. Esto es una limitante importante del estudio ya que este método difícilmente valora diferencias pequeñas (pero importantes) en los niveles de estos péptidos. Sin embargo usando Western blots pudimos confirmar que el estrés aumenta los niveles de la PRL en el hipotálamo, como lo determinó el RIA, y esto

apoya su uso para evaluar cambios de la hormona y de sus isoformas moleculares por efecto del estrés.

En contraste a la PRL, los niveles de las vasoinhibinas en el hipotálamo no se modificaron por efecto del estrés. La elevación de los niveles sistémicos de PRL resulta en la acumulación de vasoinhibinas en la retina (Arnold et al., 2010), el hecho de que esto no ocurra en el hipotálamo pudiera deberse a que por efecto del estrés se inhibe la actividad de las proteasas generadoras de vasoinhibinas a partir de PRL en esta estructura. Al respecto, encontramos que la actividad de dichas proteasas que se reduce a los 60 minutos y se restablece a los 360 minutos después de iniciada la inmovilización. Si bien, ya se reportó la presencia en el hipotálamo de proteasas dependientes de un pH ácido capaces de generar vasoinhibinas se reportó previamente (DeVito et al., 1992), pero esta es la primera demostración de que la actividad de las enzimas convertidoras puede llevarse a cabo a pH neutro en el hipotálamo. Desconocemos la naturaleza de estas proteasas neutras, pero es posible que incluyan a las metaloproteasas de matriz (MMP), dado que las MMP son capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL (Macotella et al., 2006), y se ha demostrado que el estrés por inmovilización inhibe su expresión en el cerebro (Lee et al., 2009). En resumen, nuestros hallazgos son consistentes con que el estrés incrementa los niveles de PRL en el hipotálamo, tanto a través de promover la expresión local de la PRL como de reducir su conversión hacia vasoinhibinas.

Dentro del hipotálamo, se ha reportado la presencia de PRL y de vasoinhibinas en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario, el área preóptica media, el área periventricular, y el núcleo arcuato (Clapp et al., 1994, Ben-Jonathan et al., 1996, Grattan & Kokay, 2008). Subcelularmente, las vasoinhibinas se encuentran localizadas en gránulos de secreción en dendritas, en el citoplasma alrededor del núcleo y en las terminales axónicas, desde donde la despolarización con alto potasio (56 mM) estimula su liberación por exocitosis (Torner et al., 1995, 2004; Mejía et al., 1997). Más aún, el estrés por inmovilización promueve la liberación de PRL en el núcleo paraventricular y el área preóptica media (Torner et al., 2004), estructuras importantes para la activación del eje HHA vía la inhibición de las neuronas liberadoras de la CRH (Torner et al., 2001, 2002). No obstante, aún se

desconoce cuál podría ser la participación de la PRL y de las vasoinhibinas hipotalámicas en la regulación de las respuestas emocionales inducidas por el estrés.

El núcleo central de la amígdala (CeA) juega un papel preponderante en la generación de conductas de ansiedad, depresión y temor vía sus proyecciones al tallo cerebral y estructuras hipotalámicas (Debiec 2005, Schulkin, 2006; Walker and Davis, 2008). Terminales axónicas que se originan de los núcleos magnocelulares del paraventricular (NPV) y supraóptico (NSO), liberan oxitocina (OXT) en el CeA para suprimir el miedo (Knobloch et al., 2012). Es posible que una conexión similar permita la liberación de PRL y vasoinhibinas en el CeA. La PRL y las vasoinhibinas se han reportado en el NPV y NSO (Clapp et al., 1994); además fibras inmunoreactivas para PRL se han descrito en CeA y el tratamiento con colchicina indica que estas fibras se originan en el hipotálamo (Siaud et al., 1989). Sin embargo, adicionalmente a los cuerpos coroideos, la mayor concentración de receptores a PRL se localiza en el hipotálamo incluyendo las neuronas magnocelulares del NPV y el NSO (Ben Jonathan et al., 1996, Mejía et al., 2003, Grattan & Kokay, 2008). Por lo tanto, también es posible que la PRL y las vasoinhibinas actúen sobre dichos sistemas magnocelulares estimulando la secreción de OXT y VP en el CeA y el NPV, donde se conoce que ambos neuropéptidos pueden regular la conducta de ansiedad de forma opuesta (Debiec, 2005, Blume et al., 2008, Viviani & Stoop, 2008). En apoyo a esta idea, la PRL estimula la liberación de la OXT y de la VP a la circulación a través de estimular la actividad de la óxido nítrico sintetasa neuronal en las neuronas magnocelulares del NPV y NSO (Vega et al., 2010), y las vasoinhibinas promueven la liberación de VP por explantes hipotálamo-neurohipofisarios (Mejía et al., 2003).

Los efectos del sistema PRL-vasoinhibinas en las respuestas al estrés pudieran ser particularmente relevantes durante la gestación y la lactancia, cuando se conoce que las respuestas fisiológicas y emocionales al estrés se encuentran atenuadas (Torner & Neumann, 2002). De hecho, dicha atenuación se ha atribuido a las acciones anti-estrés de la PRL y de la OXT (Neumann et al., 2000) y estos efectos se consideran adaptaciones del cerebro materno que benefician el

desarrollo y cuidado de las crías bajo situaciones adversas (Torner & Neumann, 2002, Schulkin, 2006, Grattan & Kokay, 2008). No obstante, también es posible que la disminución de la reacción al estrés resulte peligrosa para la supervivencia de los progenitores. Al respecto, la capacidad dual del sistema PRL/vasoinhibinas para inhibir y estimular la ansiedad y la depresión representaría un mecanismo eficiente para ajustar las respuestas al estrés y maximizar la reproducción y la supervivencia. Más aún, la PRL también atenúa los efectos del estrés en el macho (Torner et al., 2001), de manera que el sistema PRL/vasoinhibinas también podría operar para ajustar las respuestas al estrés fuera de los eventos ligados a la reproducción en las hembras.

14. CONCLUSIONES

En el presente estudio demostramos que la PRL, una hormona con acciones ansiolíticas y antidepresivas, puede tener efectos ansiogénicos y depresivos cuando es procesada proteolíticamente hacia vasoinhibinas en el hipotálamo y que dicho procesamiento puede disminuir bajo condiciones de estrés. Estos hallazgos muestran un mecanismo eficiente para el ajuste fino de las respuestas emocionales bajo condiciones de estrés. Se requiere de más investigación para poder entender los mecanismos que regulan la conversión de la PRL a vasoinhibinas y la influencia de ambas proteínas sobre los componentes específicos que median las respuestas conductuales y fisiológicas debidas al estrés.

15. REFERENCIAS

- Aguilera G. 1994. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol.* 15: 321-350
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, Lopez-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(8):2947-53.
- Arbogast L, Voogt J. 1997. Prolactin receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology* 138:3016-23
- Arnold E, Thebault S, Baeza-Cruz G, Arredondo Zamarripa D, Adán N, Quintanar-Stéphano A, Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Binart N, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2014 The hormone prolactin is a novel, endogenous trophic factor able to regulate reactive glia and to limit retinal degeneration. *J Neurosci.* 29;34(5):1868-78.
- Bakowska JC, Morrell JI. 1997. Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *J Comp Neurol.* 22;386(2):161-77.
- Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS. 1993. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology.* 133(2):935-8.
- Barbanel G, Ixart G, Arancibia S, Assenmacher I. 1986. Probable extrapituitary source of the immunoreactive prolactin measured in the cerebrospinal fluid of unanesthetized rats by push-pull cannulation of the 3rd ventricle. *Neuroendocrinology.* 43(4):476-82.
- Ben_Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17(6): 639-69
- Bellussi G, Muccioli G, Ghe C, Di Carlo R. 1987, Prolactin binding sites in human erythrocytes and lymphocytes. *Life Sci.* 24;41(8):951-9.

- Bodosi B, Obal F Jr, Gardi J, Komlodi J, Fang J, Krueger JM. 2000. An ether stressor increases REM sleep in rats: possible role of prolactin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279(5):1590-8.
- Bole_Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19:3 225-68
- Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. 1988. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell.* 8;53(1):69-77.
- Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE. 1990. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(20):8003-7.
- Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE. 1997 Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology.* 138(2):756-63.
- Bridges R, Rigero B, Byrnes E, Yang L, Walker A. 2001. Central infusions of the recombinant human prolactin receptor antagonist, S179D-PRL, delay the onset of maternal behavior in steroid-primed, nulliparous female rats. *Endocrinology.* 2001 142(2):730-9.
- Bridges RS, Grattan DR. 2003 Prolactin-induced neurogenesis in the maternal brain. *Trends Endocrinol Metab.* 14(5):199-201.
- Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. 2008 What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev.* 29(1):1-41
- Campbell GS, Argetsinger LS, Ihle JN, Kelly PA, Rillema JA, Carter-Su C. 1994. Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;91(12):5232-6.
- Chiu S, Koos RD, Wise PM. 1992 Detection of prolactin receptor (PRL-R) mRNA in the rat hypothalamus and pituitary gland. *Endocrinology* 130(3):1747-9.

- Chiu S, Wise PM. 1994 Prolactin receptor mRNA localization in the hypothalamus by in situ hybridization. *J Neuroendocrinol.* 6(2):191-9.
- Chomczynski P, Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *N. Anal Biochem.* 162(1):156-9.
- Clapp C. 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology.* 121(6):2055-64.
- Clapp C, Sears PS, Nicoll CS. 1989 Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. *Endocrinology.* 125(2):1054-9.
- Clapp C, Weiner RI. 1992, A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology.* 130(3):1380-6.
- Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. 1993. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology.* 133(3):1292-9.
- Clapp C, Torner L, Gutierrez_Ospina G, Alcantara E, López_Gomez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejía S, Morales MA, Martínez de la Escalera G. 1994. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:22 10384-8
- Clapp C. 2004. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology.* 145(12):5714-22
- Clapp C, Aranda J, González C, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G. 2006 Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab.* 17(8):301-7.
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G. 2009 Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev.* 89(4):1177-215.

- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Duenas Z, Noris G, Morales MA, Martinez De La Escalera G, Clapp C. 2000. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol.* 166 (1):53-62.
- Corbacho A, Macotela Y, Nava G, Jason P. Eiserich, Carroll E. Cross, Gonzalo Martínez de la Escalera, Clapp C 2003. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett.* 5;544(1-3):171-5.
- Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Jammes H, Djiane J, Kelly PA, Reymond MJ, Haour F. 1993 Prolactin receptors in the rat hypothalamus: autoradiographic localization and characterization. *Neuroendocrinology.* 57(3):457-66.
- Cruz-Soto ME, Cosío G, Jeziorski MC, Vargas-Barroso V, Aguilar MB, Cárabez A, Berger P, Saftig P, Arnold E, Thebault S, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2009 Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipophyseal vaso-inhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology* 150(12):5446-54
- Da Costa A, Ingram C, Lightman S. 1996. Region-specific reduction in stress-induced c-fos mRNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Res.* 742:177-84
- DeVito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C. 1992. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 130(5):2549-56.
- DeVito WJ, Avakian C, Stone S. 1992 Proteolytic modification of prolactin by the female rat brain. *Neuroendocrinology.* 56(4):597-603.
- Devost D, Boutin JM. 1999. Autoregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol.* 20;158(1-2):99-109.
- Doherty PC, Bartke A, Smith MS. 1985 Hyperprolactinemia and male sexual behavior: effects of steroid replacement with estrogen plus dihydrotestosterone. *Physiol Behav.* 35(1):99-104.
- Dorshkind K, Horseman N. 2002. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessay* (23): 288-94

- Dudley CA, Jamison TS, Moss RL. 1982 Inhibition of lordosis behavior in the female rat by intraventricular infusion of prolactin and by chronic hyperprolactinemia. : *Endocrinology* 110(2):677-9.
- Dunn AJ, Swiergiel AH, Palamarchouk V. 2004. Brain circuits involved in corticotropin-releasing factor-norepinephrine interactions during stress. *Ann N Y Acad Sci.* (1018):25-34.
- Emanuele NV, Metcalfe L, Wallock L, Tentler J, Hagen TC, Beer CT, Martinson D, Gout PW, Kirsteins L, Lawrence AM. 1987. Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from pituitary prolactin. *Brain Res.* 22;421(1-2):255-62.
- Felicio LF & Bridges RS.1992 Domperidone induces a probenecid-sensitive rise in immunoreactive prolactin in cerebroventricular perfusates in female rats. *Brain Res.* 21;573(1):133-8.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80(4):1523-631.
- Fujikawa T, Soya H, Yoshizato H, Sakaguchi K, Doh-Ura K, Tanaka M, Nakashima K. 1995. Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus. *Endocrinology* . (12):5608 –13
- Gagnerault MC, Touraine P, Savino W, Kelly PA, Dardenne M. 1993 Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J Immunol;* (150):5673-81.
- Gao J, Horseman ND. 1999. Prolactin-independent modulation of the beta-casein response element by Erk2 MAP kinase. *Cell Signal.* 11(3):205-10.
- Garcia A, Herbon L, Barkan A, Papavasiliou S, Marshall JC. 1985 Hyperprolactinemia inhibits gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulation of the number of pituitary GnRH receptors. *Endocrinology.* 117(3):954-9.
- Goffin V, Nadine B, Touraine P, Kelly P. 2002 Prolactin: The new biology of an old hormone.*Annu. Rev. Physiol.* (64):47-67
- González C, Corbacho AM, Eiserich JP, García C, López-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Díaz-Muñoz M, Rubio R, Lin SH, De La Escalera GM, 2004 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide

synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*. 145(12):5714-22.

- González C, Parra A, Ramírez-Peredo J, García C, Rivera JC, Macotela Y, Aranda J, Lemini M, Arias J, Ibarguengoitia F, de la Escalera GM, Clapp C. 2007 Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest*. 87(10):1009-17

- Grattan DR, Pi XJ, Andrews ZB, Augustine RA, Kokay IC, Summerfield MR, Todd B, Bunn SJ. 2001. Prolactin receptors in the brain during pregnancy and lactation: implications for behavior. *Horm Behav* 40:2 115-24

- Grattan DR. 2001. The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog Brain Res*. 133:153-71.

- Grattan DR. 2002. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction* (123): 497 - 506

- Grattan DR, Kokay IC. 2008 Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol*. 20(6):752-63.

- Hashimoto K, Ohno N, Aoki Y, Kageyama J, Takahara J, Ofuji T. 1982. Distribution and characterization of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in rat hypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology*. 34(1):32-7.

- Harlan RE, Shivers BD, Fox SR, Kaplove KA, Schachter BS, Pfaff DW. 1989 Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Neuroendocrinology*. 49(1):7-22.

- Herman JP, Schafer KH, Sladek CD, Day R, Young EA, Akil H, Watson SJ. 1989. Chronic electroconvulsive shock treatment elicits up-regulation of CRF and AVP mRNA in select populations of neuroendocrine neurons. *Brain Res*. 6;501(2):235-46.

- Herman J, Cullinan W, Ziegler D, Tasker J. 2002. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur J Neurosci* 16:3 381-385

- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE 2003 Central mechanisms of stress integration: hierarchical

circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 24(3):151-80.

- Hill PD1, Chatterton RT Jr, Aldag JC. 2003 Neuroendocrine responses to stressors in lactating and nonlactating mammals: a literature review. *Biol Res Nurs.* 5(2):79-86.

- Horseman ND. 2002. Prolactin receptor diversity in humans: novel isoforms suggest general principles. *Trends Endocrinol Metab.* 13(2):47-8.

- Hunt SP, Pini A, Evan G 1987 Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* (328): 632–634

- Imaki S, Shibasaki, Wang X, Demura H. 1995. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor antagonist attenuates c-fos mRNA expression in the paraventricular nucleus after stress. *Neuroendocrinology*, (61): 450-2

- Jabbour HN, Kelly PA. 1997. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Rev Reprod.* 2(1):14-8.

- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edey M. 1991, The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev.*12(3):235-51.

- **Kitada Y, Miyauchi T, Satoh A, Satoh S. 1981 Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. *Eur J Pharmacol.* Jun 19;72(2-3):145-52.**

- Kiss J. 1998. Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res Bull.* 20 (6):699-708

- Kline JB, Roehrs H, Clevenger CV. 1999. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J Biol Chem.* 10;274(50):35461-8.

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

- Landgraf R. 2003 Animal models of anxiety. *Stress.* 6(2):73-5.

- Landgraf R, Wigger A. 2003 Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. *Stress.* 6(2):111-9

- Lerant A, Freeman M. 1998. Ovarian steroids differentially regulates the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations. *Brain res.* 802:141-154.
- Lesueur L, Edery M, Ali S, Paly J, Kelly PA, Djiane J. 1991. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(3):824-8.
- Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA. 1998 Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology.* 139(10):4102-7.
- Lister. 1990. Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmac. Ther.* 46:321-340
- Lucas BK, Ormandy C, Binart N, Bridges RS, Kelly PA, 1998. Null mutation of prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* 139:4102-7
- Macotela Y, Mendoza C, Corbacho AM, Cosio G, Eiserich JP, Zentella A, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 2002. 16K prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts. *J Endocrinol.* 175(3):13-8.
- Macotela Y, Aguilar MB, Guzmán-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, López-Barrera F, Nava G, Lavallo C, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci.* □ *J Cell Sci.* 2006 May
- Makara GB, Stark E, Karteszi M, Palkovits M, Rappay G. 1981. Effects of paraventricular lesions on stimulated ACTH release and CRF in stalk-median eminence of the rat. *Am J Physiol.* 240(4):441-6.
- Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW. 1995. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* 136(10):4517-25
- Makino S, Hashimoto K, Gold P. 2002. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol Biochem Behav.* (73): 147-158

- Mangurian LP, Walsh RJ, Posner BI. 1992 Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology*. 131(2):698-702.
- Márquez C, Nadal R, Armario A. 2004. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilization stress in rats: individual differences. *Neuroscience* (123): 601-12
- Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. 2000. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol*. 14(10):1536-49.
- Ma XM, Lightman SL, Aguilera G. 1999. Vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene responses to novel stress in rats adapted to repeated restraint. *Endocrinology* 140, (8) :3623 –3632
- McMurray R. 2001. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *Int Immunopharmacology* 1(6):995-1008.
- Mejía S, Torner LM, Jeziorski MC, González C, Morales MA, de la Escalera GM, Clapp C. 2003. Prolactin and 16K prolactin stimulate release of vasopressin by a direct effect on hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrine* (2):155-62
- Mejía S, Morales MA, Zetina ME, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 1997. Immunoreactive prolactin forms colocalize with vasopressin in neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology* (3):151-9
- Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV. 1982. Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat*. 165(4):385-96.
- Mezey E, Kiss JZ. 1991. Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. *Endocrinology*. 129(4):1814-20.
- Milenkovic L, D'Angelo G, Kelly PA, Weiner RI. 1994. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;91(4):1244-7.
- Millan MJ. 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*. 70(2):83-244.

- Moberg G, Mench J. (2001) The biology of animal stress. CABI Publishing. New York.
- Moreno-Carranza B, Goya-Arce M, Vega C, Adán N, Triebel J, López-Barrera F, Quintanar-Stéphano A, Binart N, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2013 Prolactin promotes normal liver growth, survival, and regeneration in rodents: effects on hepatic IL-6, suppressor of cytokine signaling-3, and angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1;305(7)
- Morehead M, Gala R. 1987. Restraint stress depresses prolactin surges in pseudopregnant rats and adrenalectomy does not alter the response. *Life Science* 23;41 (21):2355-62
- Moore BJ, Gerardo-Gettens T, Horwitz BA, Stern JS. 1986 Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res Bull.* 17(4):563-9.
- Nagano M, Kelly PA. 1994 Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem.* 6;269 (18):13337-45.
- Nakamura K, Kurasawa M. 2001. Anxiolytic effects of aniracetam in three different mouse models of anxiety and the underlying mechanism. *Eur J Pharmacol.* 420: 33-43
- Neill JD. 1970. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* (6):1192-7
- Neumann ID, Wigger A, Liebsch G, Holsboer F, Landgraf R. 1998 Increased basal activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. *Psychoneuroendocrinology.* 23(5):449-63.
- Neumann ID. 2000 Antisense oligodeoxynucleotide effects on the hypothalamic-neurohypophysial system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Methods.* 22(3):227-37.
- Neumann ID, Torner L, Toschi N, Veenema AH. 2006 Oxytocin actions within the supraoptic and paraventricular nuclei: differential effects on peripheral and intranuclear vasopressin release. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291(1):

- Neumann ID, Krömer SA, Toschi N, Ebner K. 2000 Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions. *Regul Pept.* 2;96(1-2):31-8.
-
- Nicoll CS, Talwalker PK, Meites J. 1960. Initiation of lactation in rats by nonspecific stresses. *Am J Physiol.* (198):1103-6.
- Nicoll CS. 1980. Ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Fed Proc.* 39(8):2563-6.
- Noel M, Woodside B. 1993 Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats. *Physiol Behav.* 54(1):151-4.
- Pacak K, Armando I, Fukuhara K, Kvetnansky R, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS 1992 Noradrenergic activation in the para-ventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* (589):91–96
- Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Yadid G, Kopin IJ, Goldstein DS. 1995. Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci.* 29,(771):115-30.
- Pacak K, Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22(4): 502-548
- Palkovits M 1983 Punch sampling biopsy technique. *Methods Enzymol* (103):369-76.
- Palkovits M, Baffi JS, Dvori S 1995 Neuronal organization of stress response. Pain-induced c-fos expression in brain stem catecholaminergic cell groups. *Ann NY Acad Sci* (771):313–326
- Palkovits M, Baffi JS, Pacak K 1997 Stress-induced Fos-like immunoreactivity in the pons and the medulla oblongata of rats. *Stress* (1):155-168

- Palkovits M. 1999, Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol.* 20(4):270-95.
- Paxinos, G & Watson, C. (1997) *The rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* Aug;14(3):149-67.
- Pellegrini I, Gunz G, Ronin C, Fenouillet E, Peyrat JP, Delori P, Jaquet P. 1988 Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells: immunological, receptor binding, and biological properties of the glycosylated and nonglycosylated forms. *Endocrinology.* 122(6):2667-74.
- Pi XJ, Grattan DR. 1998 Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 15;59(1):1-12.
- Pi XJ, Grattan DR. 1998 Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J Comp Neurol.* 18;394(4):462-74.
- Pi X, Grattan DR. 1999. Expression of prolactin receptor mRNA is increased in the preoptic area of lactating rats. *Endocrine.* 11(1):91-8.
- Popeski N, Amir S, Diorio J, Woodside B. 2003. Prolactin and oxytocin interaction in the paraventricular and supraoptic nuclei: effects on oxytocin mRNA and nitric oxide synthase. *J Neuroendocrinol* (15):687-696
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 15;47(4):379-91.
- Powers CA, Hatala MA. 1990 Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: in vitro reaction requirements and cleavage sites, and detection of processed prolactin in vivo. *Endocrinology* 127(4):1916-27.

- Roky R, Paut-Pagano L, Goffin V, Kitahama K, Valatx JL, Kelly PA, Jouvét M. 1996 Distribution of prolactin receptors in the rat forebrain. Immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. 63(5):422-9.
- Sandi C, Venero C, Cordero M. 2001. Estrés, memoria y trastornos asociados. 1ª edición, edit. Ariel. Madrid, España
- Sauve D, Woodside B. 2000 Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res*.23;868(2):306-14.
- Sawchenko PE, Swanson LW. 1983. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol*. 1;218(2):121-44
- Sawchenko PE, Imaki T, Vale W. 1992. Co-localization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus. *Ciba Found Symp*. (168):16-30.
- Schachter BS, Durgerian S, Harlan RE, Pfaff DW, Shivers BD.1984, Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. *Endocrinology*. 114(5):1947-9.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*. 299(5603):117-20.
- Shiu RP, Elsholtz HP, Tanaka T, Friesen HG, Gout PW, Beer CT, Noble RL. 1983. Receptor-mediated mitogenic action of prolactin in a rat lymphoma cell line. *Endocrinology*. 113(1):159-65.
- Siaud P, Manzoni O, Balmefrezol M, Barbanel G, Assenmacher I, Alonso G. 1989. The organization of prolactin-like-immunoreactive neurons in the rat central nervous system. Light- and electron-microscopic immunocytochemical studies. *Cell Tissue Res*. 255(1):107-15.
- Sinha YN. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*. 16(3):354-69.
- Sonigo C, Binart N. 2012 Overview of the impact of kisspeptin on reproductive function. *Ann Endocrinol (Paris)*.73(5):448-58.
- Swanson LW, Sawchenko PE. 1983. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neuroscience* (6):269-324.

- Steimer T. 2002 The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci.* 4(3):231-49.
- Thoman EB, Conner RL, Levine S. 1970. Lactation suppresses adrenal corticosteroid activity and aggressiveness in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 70(3):364-9.
- Torner L, Nava G, Duenas Z, Corbacho A, Mejia S, Lopez F, Cajero M, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 1999. Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J Endocrinol.* 161(3):423-32.
- Torner L, Toschi N, Nava G, Clapp C, Neumann ID. 2002. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neuroscience* 15,(8) :1381-9
- Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID. 2001. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neuroscience* 21, (9): 3207-14
- Torner L, Neumann ID. 2002. The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress.* (4):249-57.
- Torner L, Maloumby R, Nava G, Aranda J, Clapp C, Neumann ID. 2004. In vivo release and gene upregulation of brain prolactin in response to physiological stimuli. *Eur J Neurosci.* 19(6):1601-8.
- Toubau G, Desclin J, Parmentier M, Pasteels JL. 1979. Cellular localization of a prolactin-like antigen in the rat brain. *J Endocrinol.* 83(2):261-6.
- Tsigos C, Chrousos GP. 2002 Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 53(4):865-71.
- Triebel J, Huefner M, Ramadori G. 2009 Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol.* 161(2):345-53.
- Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI. 1987. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* (5):1846-50

- Witcher JA, Freeman ME.1985 The proestrous surge of prolactin enhances sexual receptivity in the rat. *Biol Reprod.* 32(4):834-9.
- Whitacre C. 2001. Sex differences in autoimmune disease. *Nature* 2,(9): 777-80
- Wilson DM 3rd, Emanuele NV, Jurgens JK, Kelley MR.1992. Prolactin message in brain and pituitary of adult male rats is identical: PCR cloning and sequencing of hypothalamic prolactin cDNA from intact and hypophysectomized adult male rats. *Endocrinology.* 131(5):2488-90.
- Windle R, Brady M, Kunanandam , Da Costa A, Wilson B, Harbuz M, Lightman S, Ingram C. 1997. Reduced response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to alpha1-agonist stimulation during lactation. *Endocrinology* 138, (9) : 3741-3748
- Wotjak C, Kubota M, Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Neumann I, Landgraf R. 1996. Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating. *J Neurosci* 16:23 7725-7732
- Wotjak C, Naruo T, Muraoka S, Simchen R, Landgraf R, Engelmann M. 2001. Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* (13): 2273-2281
- Yu-Lee LY, Luo G, Book ML, Morris SM. 1998. Lactogenic hormone signal transduction. *Biol Reprod.* 58(2):295-301.
- Yu_Lee LY. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* (57): 435-55
- Zamorano Rojas Heidi M. 2003. Expresión de factores transcripcionales en estructuras subcorticales durante la adquisición y evocación de condicionamientos aversivos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. pp. 35- 37
- Zhice X. Calvario G, Day L, Jiaming Y, Ross M. 2000. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (279): 1207-1215