



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**“LA PROLACTINA PROMUEVE LA SECRECIÓN DE OXITOCINA Y
VASOPRESINA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO
SINTETASA NEURONAL EN EL NÚCLEO SUPRAÓPTICO Y
PARAVENTRICULAR”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

M. EN C. CLAUDIA LETICIA VEGA CÁZARES

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARIA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.

JURIQUILLA, QUERETARO. 2014



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.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

I. LA PRL Y SUS RECEPTORES

II. PRL Y SNC

III. PRL, OXT Y AVP

a. SHN, OXT y AVP

OXT

AVP

b. Efecto de la PRL sobre la expresión de OXT y AVP

IV. NO Y SNC

a. Generalidades del NO

nNOS

b. Funciones de las NOS

NO, OXT, AVP, PRL

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO

MATERIALES Y MÉTODOS

a. Animales

b. Administración intracerebroventricular (icv) de PRL

c. Inducción de hiperprolactinemia

d. Cuantificación de hormonas circulantes

e. Tinción de NADPH-diaforasa

Análisis estadístico

RESULTADOS

a. La administración icv de PRL incrementa los niveles circulantes de OXT y AVP a través de la activación de nNOS en el NPV y NSO.

b. La hiperprolactinemia aumenta los niveles de OXT y AVP en la circulación vía la activación de la nNOS en el NPV y NSO.

c. La hiperprolactinemia reduce la inactivación/ fosforilación en Ser847 de la nNOS en extractos hipotalámicos.

DISCUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

La prolactina promueve la liberación de oxitocina y vasopresina a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa neuronal en los núcleos supraóptico y paraventricular. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1701–R1708, 2010. Publicado en Octubre 13, 2010; doi:10.1152/ajpregu.00575.2010.— La prolactina (PRL) estimula la secreción de oxitocina (OXT) y de arginina vasopresina (AVP) como parte de las adaptaciones maternas que operan durante el parto y la lactancia. Ambas neurohormonas son reguladas por el óxido nítrico. En este estudio, investigamos si la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS) en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario media el efecto de la PRL sobre la liberación de OXT y AVP y si este efecto ocurre en machos. Las concentraciones circulantes de OXT y AVP se evaluaron en ratas macho después de la administración intacerebroventricular de PRL o posterior a la inducción de hiperprolactinemia mediante implantes de dos hipófisis anteriores bajo la cápsula renal. La actividad de las NOS se analizó en los núcleos hipotálamicos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) por inmunohistoquímica para NADPH-diaforasa y en extractos hipotálamicos mediante la fosforilación/inactivación de nNOS en la Ser⁸⁴⁷. La elevación central y sistémica de PRL se asoció con un incremento en la actividad de las NOS en el PVN y SON y con el aumento en los niveles circulantes de OXT y AVP. Interesantemente, el tratamiento con 7-nitroindazol, un inhibidor selectivo de nNOS, previno el efecto estimulador de la PRL sobre la liberación de ambas neurohormonas. Más aún, la fosforilación de nNOS disminuyó en ratas hiperprolactinémicas, y el tratamiento con bromocriptina, un inhibidor de la secreción hipofisiaria de PRL, bloqueó dicho efecto. Estos resultados sugieren que la PRL aumenta la actividad de la nNOS en el PVN y SON, y de esta manera promueve la liberación de OXT y AVP a la circulación. Este mecanismo podría participar en la regulación de procesos reproductivos en las hembras y no reproductivos en las hembras y los machos.

Palabras clave: sistema hipotálamo-neurohipofisiario, prolactina central, hiperprolactinemia, óxido nítrico.

ABSTRACT

Prolactin promotes oxytocin and vasopressin release by activating neuronal nitric oxide synthase in the supraoptic and paraventricular nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1701–R1708, 2010. First published October 13, 2010; doi:10.1152/ajpregu.00575.2010.— Prolactin (PRL) stimulates the secretion of oxytocin (OXT) and arginine AVP as part of the maternal adaptations facilitating parturition and lactation. Both neurohormones are under the regulation of nitric oxide. Here, we investigate whether the activation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the hypothalamo-neurohypophyseal system mediates the effect of PRL on OXT and AVP release and whether these effects operate in males. Plasma levels of OXT and AVP were measured in male rats after the intracerebroventricular injection of PRL or after inducing hyperprolactinemia by placing two anterior pituitary glands under the kidney capsule. NOS activity was evaluated in the paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) hypothalamic nuclei by NADPH-diaphorase histochemistry and in hypothalamic extracts by the phosphorylation/inactivation of nNOS at Ser847. Elevated central and systemic PRL correlated with increased NOS activity in the PVN and SON and with higher OXT and AVP circulating levels. Notably, treatment with 7-nitroindazole, a selective inhibitor of nNOS, prevented PRL-induced stimulation of the release of both neurohormones. Also, phosphorylation of nNOS was reduced in hyperprolactinemic rats, and treatment with bromocriptine, an inhibitor of anterior pituitary PRL secretion, suppressed this effect. These findings suggest that PRL enhances nNOS activity in the PVN and SON, thereby contributing to the regulation of OXT and AVP release. This mechanism likely contributes to the regulation of processes beyond those of female reproduction.

Key words: Hypothalamo-neurohypophyseal system; central prolactin; hyperprolactinemia; nitric oxide.

INTRODUCCIÓN

El sistema hipotálamo-neurohipofisario (SHN) está conformado por los núcleos hipotálamicos paraventricular (NPV) y supraóptico (NSO) y sus proyecciones neurohipofisarias, desde donde se secretan las neurohormonas oxitocina (OXT) y arginina vasopresina (AVP) a la circulación. La OXT y la AVP regulan diversos procesos en el organismo, entre los que sobresalen: la presión sanguínea, la homeostasis de los fluidos corporales, las contracciones uterinas, la conducta reproductiva y social, la evacuación de la leche durante la lactancia y las respuestas neuroendócrinas y conductuales al estrés. El óxido nítrico (NO) parece participar en la regulación de la liberación de OXT y AVP durante estos procesos.

El NO es un radical libre con una vida media de segundos y con múltiples funciones dentro y fuera del sistema nervioso central (SNC). La expresión y actividad de la sintetasa neuronal de NO (nNOS) aumenta en el NPV y el NSO en respuesta a estímulos que conducen a la liberación de OXT y AVP, como son aquellos asociados al reto osmótico, la nocicepción, el estrés, el parto y la succión de las crías durante la lactancia. El NO puede tanto estimular como inhibir la secreción de ambas neurohormonas. Por ejemplo, bajo condiciones de estrés, el NO estimula la liberación de OXT y AVP hacia la circulación; pero bajo retos osmóticos, el NO estimula la secreción de AVP e inhibe la liberación de OXT. Interesantemente, el efecto inhibitorio del NO sobre la OXT desaparece en la última etapa del embarazo posiblemente preparando al sistema oxitocinérgico para contender con los altos niveles de OXT requeridos durante el trabajo de parto y la evacuación de la leche durante la lactancia. La hormona prolactina (PRL) estimula la secreción de OXT y AVP y podría ser parte de los mecanismos que regulan los efectos del NO sobre ambas neurohormonas durante estas fases del ciclo reproductor.

La PRL, descubierta por sus efectos sobre la producción de leche en los mamíferos, posee acciones diversas sobre la reproducción, la osmorregulación, la respuesta al estrés, la actividad inmune y el comportamiento. La PRL se produce principalmente en la hipófisis anterior, pero también en diversos sitios extrahipofisarios, incluido el

SNC. En particular, el SHN expresa a la PRL y a su receptor. Además, la PRL está presente en el líquido cefalorraquídeo y ésta puede originarse de la PRL sistémica internalizada vía su receptor presente en los cuerpos coroideos. En el SNC, la PRL regula conductas reproductivas (sexual y maternal), modula respuestas neuroendócrinas y conductuales al estrés, estimula la ingesta de agua y alimentos y regula la secreción de neurohormonas, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la OXT y la AVP.

Los efectos de la PRL estimulando la liberación de OXT y AVP se han observado en ratas lactantes y en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos. Además, en estas últimas, se ha ligado el efecto de la PRL sobre la liberación de OXT a la activación de la nNOS hipotalámica. No se han realizado estudios en machos, pero es probable que interacciones neuroendocrinas similares regulen la secreción de las hormonas neurohipofisarias en forma independiente del sexo. En la rata macho, tanto la PRL como la OXT y la AVP son liberadas en respuesta a estímulos osmóticos, estresantes y conductuales que conllevan a la regulación de la actividad de la nNOS hipotalámica. Además, las tres hormonas tienen efectos regulatorios del equilibrio osmótico y de las respuestas neuroendócrinas y conductuales inducidas por distintos estresores y estímulos reproductivos en machos y hembras.

En el presente trabajo, investigamos si la elevación de los niveles de PRL en el SNC o en la circulación producen una activación de la nNOS en el NPV y NSO de ratas macho, y si este efecto resulta en un incremento en las concentraciones plasmáticas de OXT y AVP. A continuación se revisan brevemente los antecedentes que sustentan esta tesis.

ANTECEDENTES

I. LA PRL Y SUS RECEPTORES

La PRL es una hormona proteica constituida por una sola cadena polipeptídica de 199 aminoácidos, 3 puentes disulfuro y una masa molecular de 23 kDa (Sinha et. al., 1995). La PRL originalmente se asoció a la inducción y el mantenimiento de la lactancia en mamíferos pero actualmente se le atribuyen más de 300 funciones biológicas distintas (Bole_Feysot et. al., 1998). Además de su participación en la lactancia, la PRL interviene en otros procesos reproductivos y no reproductivos. Entre estos últimos se incluyen la osmorregulación, la regulación de la actividad inmune, del metabolismo, de la angiogénesis y de diferentes comportamientos (Bole_Feysot et. al., 1998; Freeman et. al., 2000; Ben-Jonathan et. al., 2006; Grattan & Kokay, 2008; Clapp et. al., 2009). La PRL es producida principalmente por hipófisis anterior, pero también por múltiples sitios extra-hipofisarios que incluyen al SNC, la decidua uterina, las glándulas lagrimal y sudorípara, el timo, el sistema inmune, las células del epitelio mamario, los fibroblastos de la piel y las células endoteliales (Ben-Jonathan et. al., 1996; Esquifino et. al., 2004; Clapp et. al., 2009). Además del suero, se ha demostrado la presencia de PRL en varios fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo, el líquido amniótico, las lágrimas, la leche, el líquido folicular, el sudor, el humor acuoso, etc (Ben-Jonathan et. al., 1996; Clapp et. al., 2009). Por lo tanto, la PRL juega un papel fisiológico dual como hormona, a través de la vía endócrina, y como citocina o factor de crecimiento, por la vía autocrina o parácrina (Ben-Jonathan et. al., 1996).

Los receptores de PRL son glicoproteínas con un solo dominio transmembranal y presentan el extremo N-terminal orientado hacia el exterior de las células. La porción citoplasmática de estos receptores carece de secuencias consenso relacionadas con la actividad de cinasa o alguna otra actividad enzimática. La vía de señalización intracelular utilizada es la vía JAK/STAT. Intervienen las proteínas JAK 1, 2 y 3 (cinasas Janus) y las STAT 1, 3 y 5 (transductores de señal y activadores de la transcripción), siendo las principales JAK 2 y STAT 5 (Bole_Feysot et. al., 1998). En estos receptores, la dimerización del receptor es un requisito absoluto para que

se inicie la transducción de la señal. La dimerización ocurre cuando una molécula de la hormona unida a un receptor se une a una segunda molécula de receptor a través de un segundo sitio de unión.

Hasta el momento se han clonado tres receptores de PRL, el “largo” (80 kDa), el “intermedio” (65 kDa) y el “corto” (42 kDa). Todos tienen el mismo dominio extracelular de unión al ligando y difieren en la longitud y secuencia del dominio intracelular. La información respecto a la función específica de los distintos receptores es aún fragmentaria y hacer generalizaciones resulta muy difícil considerando la diversidad de los efectos de PRL. En general, se considera que las isoformas larga e intermedia son funcionalmente equivalentes mientras que el receptor “corto” es inactivo. En el epitelio mamario el receptor “largo” estimula al promotor de la β -caseína, sin embargo, el receptor “corto” es incapaz de hacerlo y además, cuando se dimeriza con el receptor “largo”, funciona como una isoforma negativa dominante inactivándolo. En relación con los efectos de PRL sobre la proliferación celular, se ha demostrado que la heterodimerización de cualquiera de las isoformas (corto/largo, corto/intermedio e intermedio/largo) da como resultado un receptor inactivo (Bole_Feysot et. al., 1998).

Consistentemente con la gran diversidad funcional de la PRL, sus receptores se han localizado en prácticamente todos los tipos celulares analizados (Bole_Feysot et. al., 1998; Ben-Jonathan et. al., 1996), incluidas las neuronas que, particularmente en el hipotálamo, son células blanco de esta hormona (Grattan & Kokay, 2008).

II. PRL Y SNC

La PRL ejerce diversas acciones en el SNC, principalmente en el hipotálamo, que incluyen: la supresión de la fertilidad en la lactancia (Sonigo et. al., 2012), la estimulación de la neurogenesis y la supervivencia neuronal (Shingo et. al., 2003), la regulación del ciclo sueño-vigilia (Ben-Jonathan et. al., 1996), la estimulación de las conductas maternal y de ingesta de alimento (Grattan & Kokay, 2008), la atenuación de las respuestas neuroendócrinas y conductuales inducidas por el estrés (Torner & Neumann, 2002) y la regulación de la secreción de neurotransmisores y neuropéptidos (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 opera también promoviendo 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 hipofisaria (Ben-Jonathan et. al., 1996). También se han descrito efectos inhibitorios de la PRL sobre la secreción de la GnRH por las neuronas que la producen en el hipotálamo (Milenkovic et. al., 1994) y sobre la secreción de kipeptina, el principal estimulador de la secreción de la GnRH (Sonigo et. al., 2012). Se propone que estos mecanismos median el cese de ovulación durante la lactancia. El efecto de la PRL sobre la expresión y secreción de las hormonas neurohipofisarias se discute más adelante.

Por otra parte, se ha demostrado que la PRL puede estimular la proliferación de astrocitos en cultivo (De Vito et. al., 1992) y la neurogénesis en ratas lactantes adultas (Bridges & Grattan, 2003; Shingo et. al., 2003). También, se ha observado que la administración intracerebroventricular de PRL promueve la fase de movimientos oculares rápidos del sueño (MOR), mientras que la inmunoneutralización de la PRL central con anticuerpos anti-PRL bloquea dicha

fase del sueño (Ben-Jonathan et. al., 1996). Del mismo modo, estudios posteriores han mostrado que la hipofisectomía suprime la fase MOR del sueño (Bodosi et. al., 2000).

Por otra parte, la PRL estimula en forma dosis-dependiente la expresión de 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 se ha descrito un incremento en la expresión de la PRL y de su receptor durante la gestación y la lactancia (Bakowska et. al., 1997; Pi XJ & Grattan, 1999). Asimismo, la inactivación genética del receptor de PRL resulta en animales deficientes en la conducta de cuidado parental (Lucas et. al., 1998).

Los efectos de la PRL capaces de promover la ingestión de agua y de alimento parecen integrarse en los núcleos NPV y ventromedial (NVM) del hipotálamo. En estos núcleos se ha detectado el receptor de PRL y su aumento en estados de hiperprolactinemia (Moore et. al., 1989; Sauve et. al., 1996). Otro de los efectos conductuales de la PRL que podría integrarse en el NPV es la modulación de la conducta de ansiedad bajo condiciones de estrés. El NPV participa en la integración de las respuestas neuroendocrinas al estrés (Steimer, 2002; Millan, 2003) y constituye la vía final común para la secreción de la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) responsable de promover la secreción de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) por la hipófisis (Aguilera, 1994). Estudios de Torner y colaboradores (Torner et. al., 2001, 2004) mostraron que la PRL administrada intracerebroventricularmente reduce la ansiedad y la secreción de ACTH en respuesta al estrés y que estos efectos se eliminan mediante el bloqueo de la expresión del receptor de PRL en el SNC. Además, el NPV expresa a la PRL y a un fragmento de 14 kDa de la hormona (Clapp et. al., 1994).

Consistentemente con todas estas acciones, los receptores de PRL se han identificado en el hipotálamo y en los cuerpos coroideos mediante inmunohistoquímica (95-97) e hibridación in situ (98-100). La forma larga es la isoforma más abundante y su concentración es susceptible de incrementarse en

función de la acción de diversos agentes tanto externos como internos. Entre los factores capaces de estimular la expresión del receptor de PRL en el SNC se incluyen factores hormonales como los estrógenos y la propia PRL sistémica, así como la edad, el estímulo de la succión y diversos agentes estresores (Nagano et. al., 1994; Bakowska et. al., 1997; Pi XJ & Grattan, 1998; Torner et. al., 2004).

En los plexos coroideos se concentra la mayor expresión del receptor de PRL y se ha propuesto que la función primordial de esta localización es la de permitir la internalización de la PRL sistémica al líquido cefalorraquídeo, desde donde la hormona puede acceder al hipotálamo y a otras regiones del SNC (Roky et. al., 1996; Grattan et. al., 2001). Así, se ha mostrado que: (1) la concentración de la PRL en el líquido cefalorraquídeo se correlaciona con sus niveles en la circulación (Mangurian et. al., 1992; Fujikawa et. al., 1995); (2) la PRL marcada radioactivamente e inyectada a la circulación sistémica es incorporada por los plexos coroideos y está presente en el líquido cefalorraquídeo (Mangurian et. al., 1992). Finalmente, (3) que agentes capaces de estimular la secreción adenohipofisaria de PRL a la circulación sistémica, también estimulan la expresión del receptor de PRL en los plexos coroideos (Fujikawa et. al., 1995; Pi XJ & Grattan, 1999; Grattan et. al., 2001).

En el hipotálamo el receptor de PRL se localiza en las neuronas dopaminérgicas tubero-infundibulares (TIDA) del núcleo arcuato (Lerant & Freeman, 1998; Kokay & Grattan, 2005), en neuronas OXT (Kokay et. al., 2006) y AVP (Mejia et. al., 2003) de los NPV y NSO, en el NVM y en el APOM (Pi XJ & Grattan, 1999). También se ha descrito la presencia del RNA mensajero del receptor de PRL y de la proteína en áreas extrahipotalámicas, como son el área periventricular (en la división preóptica), el núcleo del lecho de la *stria terminalis*, 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 XJ & Grattan, 1998; Bakowska et. al., 1997). Esta distribución amplia del receptor de PRL probablemente refleja la complejidad

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

III. PRL, OXT Y AVP

a. SHN, OXT y AVP

El SHN está conformado por neuronas magnocelulares ubicadas en dos núcleos anteriores del hipotálamo, el NPV y el NSO, cuyas proyecciones axonales constituyen a la neurohipófisis. Este es un sistema neurohumoral complejo que desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis de los fluidos corporales y el trabajo de parto, via la producción de la AVP y de la OXT, respectivamente. Ambas neurohormonas están conformadas por 9 aminoácidos que se escinden de proteínas transportadoras, las neurofisinas, durante el proceso de secreción axonal. Su similitud estructural determina que algunos de los efectos biológicos de la OXT y AVP sean compartidos.

OXT. Los efectos de la OXT sobre las contracciones uterinas y la evacuación láctea se descubrieron hace más de 100 años (Dale, 1906), 50 años antes de haber dilucidado su estructura (Du Vigneaud & Ward, 1956). Hoy en día se reconoce que la OXT se encuentra involucrada en muchas otras funciones entre las que destacan efectos cardiovasculares (Gutkowska et. al., 2000), osmoregulatorios (Verbalis et. al., 1991; Kadekaro et. al., 1997) y conductuales.

Entre estos últimos, la OXT ejerce un papel sustantivo en conductas sociales (reconocimiento, tolerancia, adaptación) (Donaldson & Young, 2008; Neumann, 2008), asociadas al estrés (Neumann et. al., 2000; Engelmann et. al., 2004) y reproductivas (sexual y maternal) (Pedersen & Prange, 1979; Stoneham et. al., 1985; Thackare et. al., 2006).

AVP. Fue uno de los primeros neuropéptidos identificados que se secuenció en la década de los 50 del siglo pasado (Acher Chauvet, 1953). La AVP u hormona antidiurética, es principalmente conocida por sus acciones en la regulación de la homeostasis de los fluidos corporales y la regulación de la presión sanguínea (McEwen, 2004; McCormick & Bradshaw, 2006). Sin embargo, ahora se sabe que participa en muchas otras funciones principalmente asociadas con la regulación del metabolismo (McCormick Bradshaw, 2006), de la temperatura corporal (Logros, 2001), del ritmo circadiano (Ingram et. al., 1998), de la función cardiovascular (RMcCormick Bradshaw, 2006), del aprendizaje y memoria (Stop, 2012; de Wied et. al., 1993) y de distintas conductas. Entre estas últimas, la AVP es particularmente importante en la regulación de conductas sociales (memoria social, cuidado parental, vinculación y preferencia de pareja) (McCall Singer, 2012), en respuestas fisiológicas al estrés y de la conducta de ansiedad (Stop, 2012) y conductas reproductivas (Garrison et. al., 2012).

b. Efecto de la PRL sobre la expresión y secreción de OXT y AVP

La primera evidencia de que la PRL estimula la secreción de las hormonas neurohipofisarias se obtuvo hace más de 20 años, cuando se mostró que la inyección sistémica de PRL en ratas lactantes eleva los niveles circulantes de OXT y que este efecto se bloquea mediante la inmunodepleción de la PRL secretada por la succión de las crías (Parker et. al., 1991). Se propuso entonces que la PRL potencia la secreción de OXT para mantener la evacuación de leche durante la lactancia. Esta propuesta se apoyó también en las demostraciones de que los receptores de PRL están presentes en neuronas oxitocinérgicas (Kokay et. al., 2006) y vasopresinérgicas (Mejía et. al., 2003) del sistema hipotálamo-neurohipofisario; que la PRL estimula la tasa de descarga de neuronas oxitocinérgicas del SON (Kokay et. al., 2006) y que la PRL estimula la secreción de OXT y VP por explantes hipotálamo-neurohipofisarios (Kokay et. al., 2006; Mejía et. al., 2003). Además, se ha mostrado que la administración intracerebroventricular

de PRL estimula la expresión de OXT y la secreción de OXT y AVP en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Donner & Neumann, 2009), así como los niveles del RNA mensajero de OXT en el NPV y el NSO de ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos y con progesterona (Popeski et. al., 2003). También, se conoce que el SHN produce y secreta a la PRL y a un fragmento de 14 kDa de esta hormona (Clapp et. al., 1994; Torner et. al., 1995; Mejia et. al., 1997). Estos hallazgos sugieren que la PRL proveniente de la circulación, pero también la producida localmente, puede promover la síntesis y secreción de las neurohormonas hipofisarias.

De hecho, estímulos que inducen la secreción de OXT y AVP también promueven la expresión y secreción de PRL por el SHN. Por ejemplo, la succión durante la lactancia y el estrés por inmovilización aumentan los niveles del RNA mensajero de PRL en el NPV y la liberación de PRL en el perfusado de dicho núcleo (Torner et. al., 2004). Asimismo, los estrógenos estimulan la expresión y secreción de OXT, AVP y PRL por el SHN (Ghosh & Sladek, 1995; Wang et. al. 1995; Torner et. al., 1999; Mejia et. al., 2003; Sladek & Somponpun, 2008).

Dado que los estudios realizados utilizaron animales lactantes o ratas ovariectomizadas tratadas con esteroides gonadales para mimetizar las condiciones del embarazo, es posible proponer que el efecto de la PRL sobre la OXT y la AVP tendría la función de favorecer el aporte de estas hormonas necesario para promover el trabajo de parto, el balance de agua y electrolitos y la evacuación láctea en estas fases del ciclo reproductor. Además, tanto la PRL como la OXT y/o la AVP estimulan la conducta maternal y de ingesta de alimento (Bridges et. al., 1990; Grattan & Kokay, 2008), atenúan la conducta de ansiedad debida al estrés (Torner et. al., 2001), aminoran la fertilidad (Grattan & Kokay, 2008) y promueven la neurogenesis (Shingo et. al., 2003) durante el embarazo y la lactancia.

Por otra parte, también es posible que estas interacciones endócrinas operen en el macho para regular funciones de las tres hormonas comunes a ambos sexos. Al

respecto, recientemente se ha tenido evidencia de que fragmentos de la PRL de 14 y 16 kDa, conocidos como vasoinhibinas (Clapp et. al., 2006), tienen propiedades vasoconstrictoras (González et. al., 2004). Dado que la PRL, pero también las vasoinhibinas, estimulan la secreción de AVP por el SHN (Mejia et. al., 2003), este podría ser un mecanismo para potenciar sistémicamente la vasoconstricción, y por ende la regulación de la presión arterial. Alternativamente, la acción sobre la AVP, dadas sus propiedades antidiuréticas, podría representar un mecanismo indirecto capaz de influir sobre los efectos osmorregulatorios de la PRL. Por ejemplo, se sabe que la PRL puede estimular la retención de agua y sodio en el riñón (Bussieres et. al., 1987). También son factibles interacciones regulando las respuestas neuroendócrinas y conductuales al estrés, entre otras. Estas posibilidades deberán ser abordadas experimentalmente, inicialmente demostrando que el efecto de la PRL sobre la secreción de la OXT y la AVP también opera en machos.

IV. NO Y SNC

a. Generalidades del NO

El óxido nítrico (NO) es un radical libre con funciones de mensajero químico. Se produce por acción de tres enzimas llamadas en conjunto sintetasas de óxido nítrico (NOS), que aunque son codificadas por genes diferentes, comparten entre sí un 50-60% de similitud en su secuencia nucleotídica y aminoacídica (Galler & Billiar, 1998).

Hasta el momento, se han descrito tres isoformas de las NOS: la neuronal (nNOS), la inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS). Las isoenzimas neuronal y endotelial están continuamente presentes y por lo tanto son llamadas constitutivas, mientras que la iNOS contrasta con éstas dos, ya que normalmente no se expresa en condiciones basales y es inducida por ciertas citocinas y por lipopolisacáridos (LPS) de origen bacteriano, por lo que es conocida como inducible (Galler & Billiar, 1998). Mientras que las isoformas constitutivamente activas requieren para su actividad de

un incremento de calcio intracelular y de su unión a calmodulina, la isoforma inducible es poco sensible a calcio y su actividad sólo depende de que se exprese la proteína.

Las NOS catalizan la transferencia de cinco electrones de uno de los nitrógenos del grupo guanidino de la L-arginina, formando NO y L-citrulina como subproducto en una relación estequiométrica equimolar (Galler & Billiar, 1998). El mecanismo general de acción del NO implica su unión al grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa soluble, que promueve un cambio conformacional en la enzima y da como resultado su activación con la consiguiente producción de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). La producción de GMPc conduce a diferentes efectos. En la neurotransmisión se ha propuesto que el GMPc generado en la neurona pre-sináptica activa proteínas cinasas que llevan a la activación de canales que facilitan la liberación de neurotransmisores (Ignarro, 1992).

nNOS. La nNOS contiene alrededor 1434 aminoácidos y una masa molecular de 160.8 kDa. El monómero de nNOS es inactivo, ya que la forma activa de esta enzima es dimérica. La dimerización requiere la unión de tetrabiopterina (BH4) y de L-arginina en el grupo hemo de la enzima. El monómero de nNOS contiene dos dominios, un dominio oxigenasa N-terminal y un dominio reductasa C-terminal que se encuentran separados por un sitio de unión a calmodulina. La nNOS está fundamentalmente confinada al tejido neural, se expresa tanto en neuronas inmaduras como maduras, en astrocitos y en la capa adventicia de vasos sanguíneos cerebrales.

El inhibidor selectivo de la nNOS el 7-nitroindazol (7-NI) reduce la afinidad a BH4 y L-arginina los cuales son necesarios para estabilizar al dimero de la nNOS. La inestabilidad del dimero de la nNOS aumenta su susceptibilidad para ser fosforilada por la enzima protein-cinasa-C, lo que a su vez conduce a su hidrólisis por tripsina y por ende a su destrucción. Por el contrario, la dimerización protege a esta enzima contra su hidrólisis (Hayashi et. al., 1999; Zhou & Zhu, 2009).

La fosforilación de la nNOS es regulada por cinasas y fosfatasa como PKA, cinasa dependiente de calmodulina, PKC, fosfolipasa C, fosfatasa 1. Sin embargo, la fosforilación de la nNOS en diferentes sitios afecta la actividad de esta enzima de forma diferencial. En particular, la protein cinasa CAMK-IIA fosforila a nNOS en sitios de Ser⁸⁴⁷, reduciendo la actividad de nNOS al inhibir la unión Ca²⁺-CAM (Ozuka et al., 2002; Zhou & Zhu, 2009).

b. Funciones de las NOS

Se piensa que la diversidad de efectos del NO puede ser atribuida tanto al sitio de producción, como a las isoformas que lo producen, y de forma importante a la cantidad de NO que generan. Cuando el NO se produce en cantidades picomolares o nanomolares por la actividad de eNOS o de la nNOS, el NO regula procesos fisiológicos como la permeabilidad, el tono vascular, la adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio y la neurotransmisión. Sin embargo, cuando se produce en concentraciones micromolares generalmente debido a la actividad de la iNOS ejerce efectos antimicrobianos que pueden conducir a eventos inflamatorios crónicos. Los efectos inflamatorios del NO se asocian con la formación de radicales libres que llevan a la oxidación e inactivación de macromoléculas (proteínas y DNA), con la consecuente pérdida de funciones enzimáticas y la desintegración de la membrana plasmática así como la producción de mutaciones en el DNA (Eiserich et. al., 1998).

La importancia del NO en el cerebro está dada por sus efectos fisiológicos en las neuronas, en la glía y a nivel vascular. Entre estos efectos, se sabe que el NO juega un importante papel en la morfogénesis, la plasticidad sináptica, en la apoptosis y en el establecimiento de la organización neuronal durante el desarrollo (Dawson, 1996). El NO puede inhibir reversiblemente el crecimiento de neuritas en las fases tempranas de diferenciación celular (Bátor et. al., 2012). Además, se ha demostrado que el NO es un mediador del dolor ya que inhibidores de NOS disminuyen la termohiperalgia (Makuch et. al., 2013). Las acciones del NO sobre la regulación de la actividad de la microglia, se apoya en experimentos donde el uso de un

inhibidor de NO (L-NAME) estimula el número de astrocitos en cultivos de tejido nervioso (Stefano et. al., 2004).

Estudios diversos muestran que el NO regula funciones neuroendocrinas. Por ejemplo, la administración in vivo de inhibidores de las NOS aumentan la liberación de CRH, de la ACTH, de la hormona luteinizante y de la hormona de crecimiento (Garthwaite & Boulton, 1995), indicando que el NO inhibe la secreción de estas hormonas. Sin embargo, en experimentos *in vitro*, el NO estimula la liberación de la hormona liberadora de corticotropina y de la hormona liberadora de hormona luteinizante (Dawson et al., 1996).

NO, OXT, AVP, PRL. Se ha demostrado que el NO puede regular la activación del SHN. La expresión y actividad de la nNOS se eleva en el NPV y el NSO en respuesta a la estimulación osmótica (Villar et. al., 1994; Srisawat et. al., 2004), al parto (Popeski et. al., 1999; Srisawat et. al., 2000), al estímulo de la succión (Otukonyong et. al., 2000), a la estimulación nociceptiva (Kurose et. al., 2001), y al estrés (Hatakeyama et. al., 1996; Orlando et. al., 2007). La manipulación de la producción de NO mediante donadores, precursores e inhibidores de NO, o mediante la eliminación genética de nNOS en el ratón, denota efectos contrastantes sobre la secreción de las hormonas neurohipofisarias. Por ejemplo, bajo condiciones de estrés el NO aumenta los niveles circulantes de OXT y AVP (Orlando et. al., 2007). Sin embargo, el NO liberado en respuesta a estímulos osmóticos conduce a la secreción de AVP pero inhibe la de la OXT (Kadekaro, 2004; Ventura et. al., 2004). De interés, el efecto inhibitorio del NO sobre OXT cesa en el embarazo tardío, en preparación para los altos niveles de OXT requeridos para el trabajo de parto y la evacuación láctea (Kadekaro, 2004; Srisawat et. al., 2000).

La PRL podría ser parte de los mecanismos que regulan los efectos del NO sobre la secreción de OXT y AVP durante el ciclo reproductivo. En el modelo de ratas tratadas con estrógenos, la reducción farmacológica de los niveles circulantes de PRL mediante el uso de bromocriptina, un agonista de los receptores D2 de la

dopamina, reduce la actividad de las NOS y la expresión de OXT en el NPV y en el NSO, y estos efectos se revierten mediante el tratamiento con PRL (Popeski et. al., 2003). Se tienen evidencias de que la PRL regula la expresión de las NOS en diversos tipos celulares, a saber: fibroblastos (Corbacho et. al., 2003), leucocitos (Dogusan et. al., 2001), y células de gliomas (Raso et. al., 1999), pero se desconoce si la PRL regula específicamente a la nNOS y si dicha regulación pudiera ocurrir en los NPV y NSO de ratas macho.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien se tienen evidencias de que la PRL puede estimular la secreción de AVP y de OXT a la circulación de ratas hembra, se desconocen los mecanismos de esta acción y si estos efectos ocurren también en ratas machos. Dado que el NO producido por la nNOS participa en la regulación de la secreción de ambas neurohormonas y que la PRL estimula la producción de NO en distintos tipos celulares, en este proyecto investigamos si la PRL puede regular la producción de NO en el SHN y si dicha regulación media posibles efectos estimuladores de la secreción de AVP y OXT en la rata macho.

HIPÓTESIS

La PRL estimula la secreción de OXT y AVP a través de inducir la actividad de la óxido nítrico sintentasa neuronal en el NPV y el NSO del hipotálamo de ratas macho.

OBJETIVOS

1. Determinar si la administración intracerebroventricular de PRL aumenta los niveles circulantes OXT y AVP en la rata macho.

2. Analizar si la hiperprolactinemia incrementa las concentraciones plasmáticas de OXT y AVP.
3. Evaluar si el aumento de la PRL intracerebroventricular o circulante aumenta la expresión de NADPH-diaforasa, un marcador de las NOS en el PVN y el SON.
4. Determinar si la PRL estimula la actividad de la nNOS en extractos hipotalámicos.
5. Analizar si el efecto de la PRL sobre la secreción de AVP y OXT se bloquea en presencia de inhibidores de la nNOS.

RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO

El cumplimiento exitoso de estos objetivos en conjunto con los resultados de observaciones previas, ayudará a comprender mejor el papel funcional de la PRL en la regulación del SHN en eventos dentro y fuera de la reproducción, a saber: la evacuación láctea, la conducta maternal y sexual, las respuestas neuroendócrinas y conductuales al estrés y la osmorregulación, entre otras.

MATERIALES Y MÉTODOS

a. Animales. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas de 200-250 g de peso corporal (p.c.). Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz oscuridad 12-12 h (luz encendida a las 7: 00 AM), de temperatura (22 °C) y libre acceso al agua y alimento. Los animales fueron manipulados durante 7 días con el objeto de mimetizar la maniobra experimental a la que fueron sometidos el día del experimento. Todos los experimentos se llevaron a cabo entre las 9:00 y 12:00 AM conforme a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto

Nacional de la Salud (Bethesda, MD, EUA), y del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología (UNAM).

b. Administración intracerebroventricular (icv) de PRL. Una cánula guía de acero inoxidable (calibre 21) se implantó estereotáxicamente en el ventrículo lateral derecho (coordenadas: 0.4 mm antero posterior a bregma, 1.4 mm lateral y 3.4 mm por debajo del cráneo; con un ángulo de inclinación de 1°) (Paxinos, 1986) y bajo anestesia (1µl/g p.c. de 70% de ketamina y 30% de xilazina inyectada intraperitonealmente). Posteriormente, los animales fueron colocados en cajas individuales y manipulados diariamente durante 7 días mimetizando el proceso de inyección al que fueron sometidos el día experimental. Este consistió en la inserción de una cánula de infusión (calibre 25) dentro de la cánula guía, a través de la cual se administró PRL recombinante de rata (obtenida del Programa Nacional de Hormonas y Péptidos (NHPP) y del Dr. A. F. Parlow, Torrance. CA) en animales conscientes y en libre movimiento. La correcta implantación estereotáxica en el ventrículo lateral se validó en cortes de cerebro de animales donde se inyectó azul de pontamina a través de la cánula implantada, observándose la coloración azul correspondiente en los ventrículos laterales (Fig. 1).



Figura 1. Sección representativa de un cerebro donde se validó la implantación estereotáxica de la cánula guía en el ventrículo lateral a través de la inyección de azul de pontamina a través de dicha cánula. Se observa la coloración azul correspondiente en los ventrículos laterales (VL). La flecha indica la huella de la cánula.

Para el primer experimento, se inyectaron 4 μ l de vehículo (solución Ringer, pH 7.4) que contenía 0 μ g (control), 0.06 μ g, 0.125 μ g, 0.25 μ g, 0.5 μ g, o 1 μ g de PRL, infundida icv por un intervalo de 2 minutos. El sistema de infusión se mantuvo dentro de la cánula guía por 2 minutos más con el fin de prevenir algún tipo de reflujo y 10 minutos después, los animales fueron sacrificados bajo anestesia por exposición a una atmosfera saturada de CO₂.

En el segundo experimento, 50 mg/kg de peso corporal de 7-nitroindazole (7-NI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disueltos en 0.2 ml de 5% de DMSO-en aceite de cacahuate (Sigma) o vehículo (5% de DMSO-en aceite de cacahuate) fueron inyectados intraperitonealmente 20 minutos antes de la infusión intracerebroventricular de PRL (1 μ g) o de solución Ringer.

Al cabo de ambos experimentos, la sangre se colectó por decapitación para evaluar los niveles de OXT y AVP en plasma. Tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico, el 7-NI actúa como un inhibidor selectivo de la nNOS (Moore & Handy, 1997). La dosis y el tiempo de administración utilizados fueron los previamente reportados que tienen efecto antinociceptivo vía la inhibición de la nNOS y que no afectan la presión sanguínea debida a la NOS endotelial (Moore et. al., 1993).

En el tercer experimento, la PRL (1 μ g) o el vehículo (solución Ringer) fueron infundidos icv y 10 minutos después, los animales fueron anestesiados mediante inhalación de CO₂ y posteriormente perfundidos a través de la aorta descendente con 200 ml de 0.9% de NaCl seguidos de 200 ml de paraformaldehído al 4% disuelto en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4). Los cerebros fueron removidos y procesados para la tinción de NADPH-diaforasa, que refleja la actividad de las NOS.

c. Inducción de hiperprolactinemia. Los niveles altos de PRL en plasma se indujeron mediante el implante de dos glándulas de hipófisis anterior (HA) de hembras bajo la cápsula renal siguiendo el procedimiento reportado previamente (Adler, 1986). Las ratas hembras donadoras y la rata macho receptora fueron hermanos de una misma camada y la cirugía se realizó en los animales adultos (200-250 g p.c.). El grupo de ratas “sham” (control) fué sometido a una cirugía similar pero sin implante. Quince días después de la colocación de los implantes, el grupo de ratas implantadas y las ratas “sham” fueron inyectadas intraperitonealmente o no con bromocriptina (5 mg/kg p.c.) o con 7-NI 24 horas o 30 minutos antes del sacrificio, respectivamente. En el primer experimento, los hipotálamos fueron extraídos y congelados para evaluar la fosforilación de la nNOS en Ser⁸⁴⁷ por Western blot y la sangre obtenida por decapitación para medir a la OXT, la AVP y la PRL. En un segundo experimento, los animales fueron anestesiados y perfundidos con paraformaldehído y los cerebros fueron procesados para la tinción de NADPH-diaforasa.

d. Cuantificación de hormonas circulantes. Las muestras de sangre fueron extraídas y refrigeradas en tubos que contenían o no EDTA (1 mg/ml de sangre) con el fin de obtener plasma o suero respectivamente. Las hormonas OXT y AVP fueron extraídas y medidas en plasma usando Kits específicos de ELISA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Assay Desings, Ann Arbor, MI). Los niveles de PRL en suero se determinaron mediante radioinmunoensayo usando procedimientos estándar y reactivos proporcionados por el Programa Nacional de hormonas y pituitaria (NHPP) de EUA y el Dr. A.F. Parlow (UCLA Medical Center), y la PRL RP-3 de rata, como referencia. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron <7% y <12% respectivamente. Para evitar variaciones inter-ensayo se midieron todas las muestras en un mismo ensayo.

e. Tinción de NADPH-diaforasa. Los cerebros fueron post-fijados en una solución de paraformaldehído al 4% durante 24 horas y crioprotejidos en una solución de sacarosa al 30% a 4°C. Después de 24 horas, se obtuvieron series de secciones

coronales de 30 micras de grosor que fueron cortadas a lo largo del NPV y NSO (coordenadas: -1.4 mm hasta -2.12 mm a partir de bregma) (Paxinos et. al., 1986) utilizando un criostato. Los cortes se almacenaron a 4 °C en una solución crioprotectora (glicerol, etilenglicol y amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, 1:1:2). Posteriormente se enjuagaron 3 veces por 10 minutos con amortiguador de fosfatos (TBS, pH 7.4 adicionado con 0.03% de Tritón X-100) y se incubaron a 37°C durante 60 minutos bajo agitación constante con una mezcla de reacción (1 mg/ml β -NADPH, 0.3 mg/ml de azul de nitrotetrazolio (NTB) y 0.3% de Triton X-100 en TBS). La incubación con el medio de reacción sin β -NADPH confirmó la especificidad de la reacción. La reacción se paró con amortiguador frío y los cortes se lavaron tres veces con TBS frío para después montarlos en portaobjetos gelatinizados, cubrirlos con permount y cubreobjetos hasta su observación al microscopio. Las laminillas fueron analizadas utilizando un escáner digital y el software Color Deconvolution (Scanscope, Aperio Technologies, Vista, CA). Las áreas positivas para NADPH-diaforasa fueron evaluadas a través de imágenes capturadas a lo largo de la extensión rostro-caudal del NPV y el NSO en tres series de laminillas, para un total de seis secciones hipotalámicas de diferentes animales.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedios \pm error estándar de la media. En los casos apropiados, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una cola, seguido por la prueba de t de Student no pareada para comparar promedios individuales. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

a. *La administración icv de PRL incrementa los niveles circulantes de OXT y AVP a través de la activación de nNOS en el NPV y NSO.*

La infusión icv de PRL se asoció con un aumento significativo de los niveles plasmáticos tanto de OXT (Fig. 2A) como de AVP (Fig. 2B) que fue dosis-dependiente. Dado que el efecto máximo se obtuvo con 1 μ g de PRL, esta dosis se utilizó en los experimentos subsecuentes tendientes a analizar si el efecto estimulador de la PRL sobre la secreción de las dos neurohormonas pudiera ser mediado a través de la activación de las NOS en el NPV y el NSO.

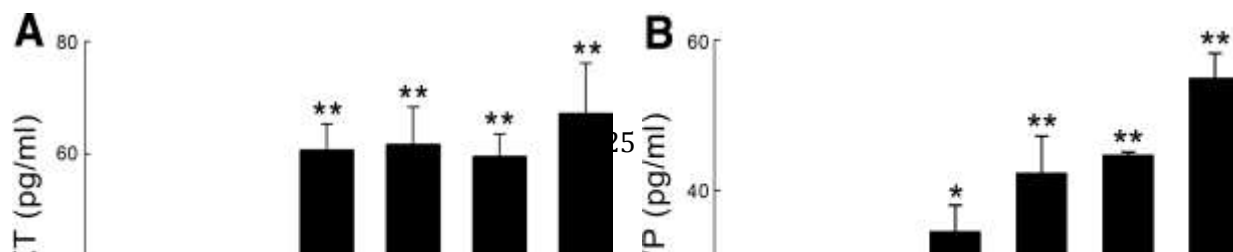


Figura 2. La infusión intracerebroventricular (icv) de prolactina (PRL) incrementa los niveles circulantes de oxitocina (OXT) y vasopresina (AVP). Los niveles de OXT **(A)** y AVP **(B)** fueron medidos por ELISA 10 minutos después de la infusión icv del vehículo (Veh) o PRL. Los valores son promedios \pm EE de siete animales por grupo. $^{\dagger}p < 0.05$ vs animales inyectados con Veh. $^{**}p < 0.05$ vs animales inyectados con 0.06 μ g de PRL.

Para esto, evaluamos la actividad de las NOS determinada mediante la detección histoquímica de la actividad de la NADPH-diaforasa, en animales tratados o no con PRL icv. Se conoce que en el cerebro las NOS son responsables de la actividad de la enzima NADPH-diaforasa, una enzima que cataliza la reducción dependiente de NADPH de una sal de tetrazolium (por ejemplo azul de nitrotetrazolium) hacia un precipitado azul insoluble (formazan). Se ha demostrado que en el cerebro esta tinción es selectiva para medir la actividad de las NOS y es el método más utilizado para revelar su distribución en el SNC (Hope et. al., 1991). Se ha mostrado que las neuronas positivas para nNOS exhiben actividad de la enzima NADPH-diaforasa (Nagano et. al., 1999).

La administración icv de PRL incrementó aproximadamente dos veces la tinción para NADPH-diaforasa tanto en el NPV (Fig. 3A) como en el NSO (Fig. 3B), comparados con el respectivo grupo control inyectado con vehículo.

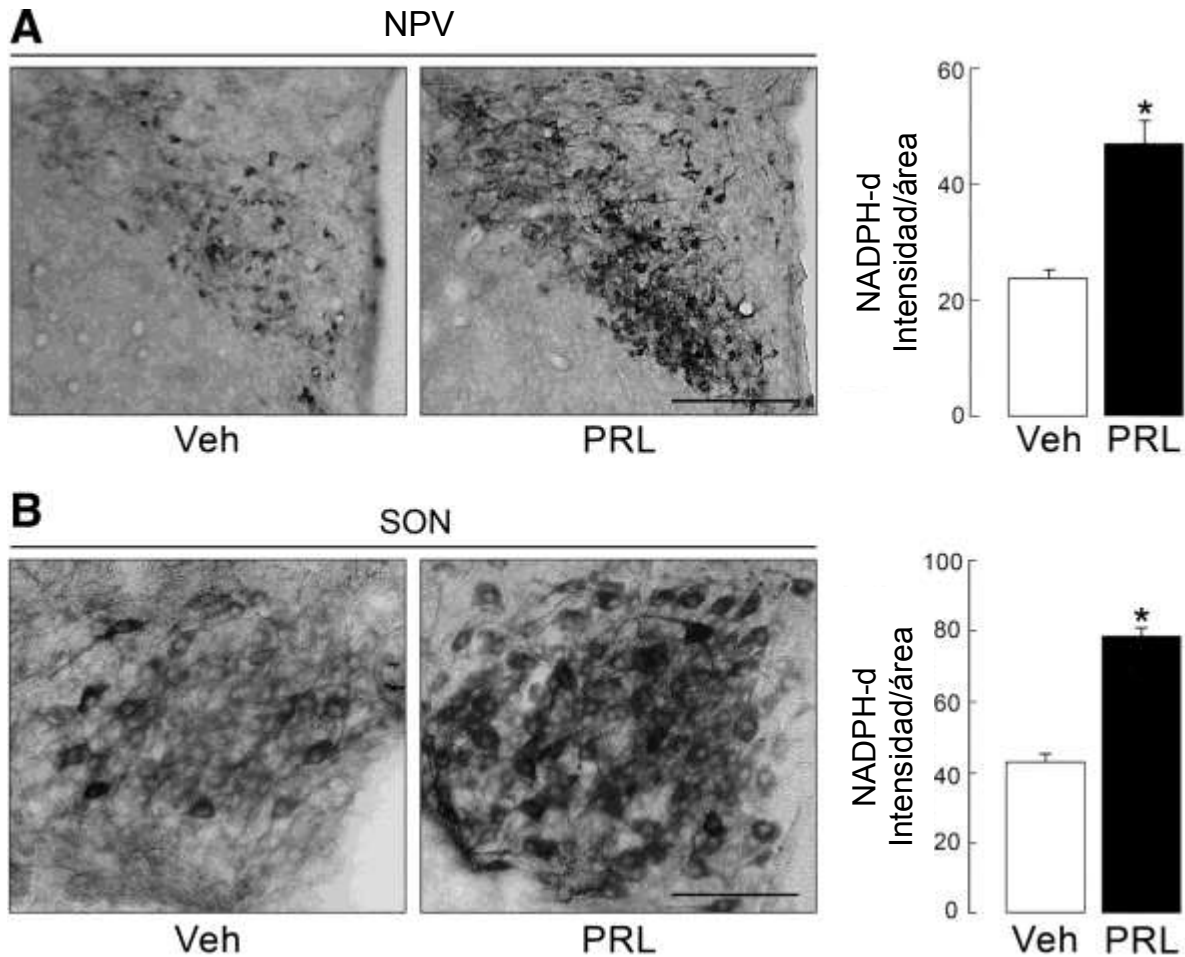


Figura 3. La infusión intracerebroventricular (icv) de PRL promueve la actividad de las óxido nítrico sintetasas (NOS) en el núcleo paraventricular (NPV) y en el núcleo supraóptico (NSO) del hipotálamo. Micrografías representativas (izquierda) teñidas para NADPH-diaforasa (NADPH-d) del NPV (**A**) y NSO (**B**) de secciones de cerebro de ratas infundidas icv con 1 μ g de PRL o vehículo (Veh). Escala = 100 μ m. Cuantificación de la señal positiva para NADPH-d (derecha) evaluada a través de toda la extensión rostro-caudal del NPV y NSO en cuatro animales diferentes. Los resultados se expresan como promedios \pm EE. * $p < 0.05$ vs animales inyectados con Veh.

Dado que la nNOs es la principal isoforma de las NOS y que constituye la fuente predominante de producción de NO en neuronas (Zhou & Zhu, 2009), es posible que el efecto de la PRL sobre la actividad de la NADPH-deaforasa se deba a la activación de la nNOS. Además, dado que el NO puede estimular la liberación de la OXT y de la AVP (Kadekaro, 2004; Orlando et. al., 2007), es posible que la activación de la nNOS por PRL medie su efecto sobre la secreción de OXT y AVP

a la circulación. Por lo tanto, la siguiente pregunta a responder fue si los cambios en la actividad de las NOS encontrados en el NPV y el NSO en respuesta a PRL corresponden a la activación de la nNOS y si estos se traducen en el aumento en la secreción de OXT y AVP.

Para este propósito, utilizamos el 7-NI, un inhibidor selectivo de la nNOS (Moore et al., 1993; Moore & Handy, 1997) y valoramos los niveles circulantes de OXT y AVP en respuesta a la administración icv de PRL. Como se puede observar en la figura 4A, el pre-tratamiento con 7-NI bloqueó el aumento en la liberación de OXT y AVP circulante en respuesta a la administración de PRL. Mientras que cuando se administró únicamente el 7-NI no se modificaron los niveles basales de ambas neurohormonas. Estos resultados apoyan que la PRL activa a la nNOS en el NPV y en el NSO y que dicha activación trae como resultado la liberación de OXT y AVP hacia la circulación.

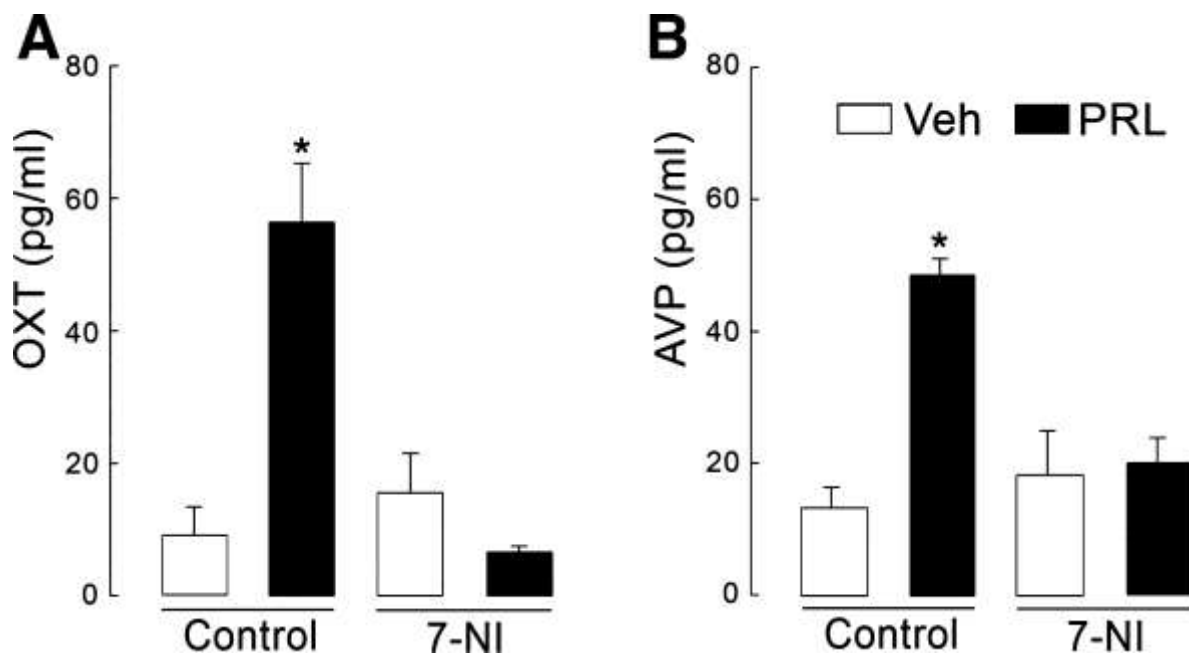


Figura 4. La actividad de la NOS neuronal (nNOS) media el incremento de los niveles circulantes de OXT y AVP inducido por la PRL intracerebroventricular (icv). Las concentraciones circulantes de OXT (**A**) y AVP (**B**) fueron medidas por ELISA 10 minutos después de la administración icv de PRL o vehículo (Veh) en ausencia (control) o presencia de una inyección intraperitoneal de un inhibidor de nNOS, 7-nitroindazole (7-NI). Los valores son promedio \pm EE de cuatro animales por grupo * $p < 0.05$ vs animales inyectados con Veh.

b. La hiperprolactinemia aumenta los niveles de OXT y AVP en la circulación vía la activación de la nNOS en el NPV y NSO.

Con la finalidad de estudiar si los niveles circulantes de OXT y AVP pueden también ser regulados por la PRL sistémica, utilizamos el modelo de hiperprolactinemia que consiste en implantar dos hipófisis anteriores de ratas singénicas, dentro de la cápsula renal de ratas macho. A los quince días post-operación, cuando se alcanzan niveles máximos de hiperprolactinemia (Moro et. al., 2001), se evaluó la actividad de las NOS en el NPV y el NSO (Fig. 5) y la concentración de PRL, OXT y AVP en suero (Fig. 5).

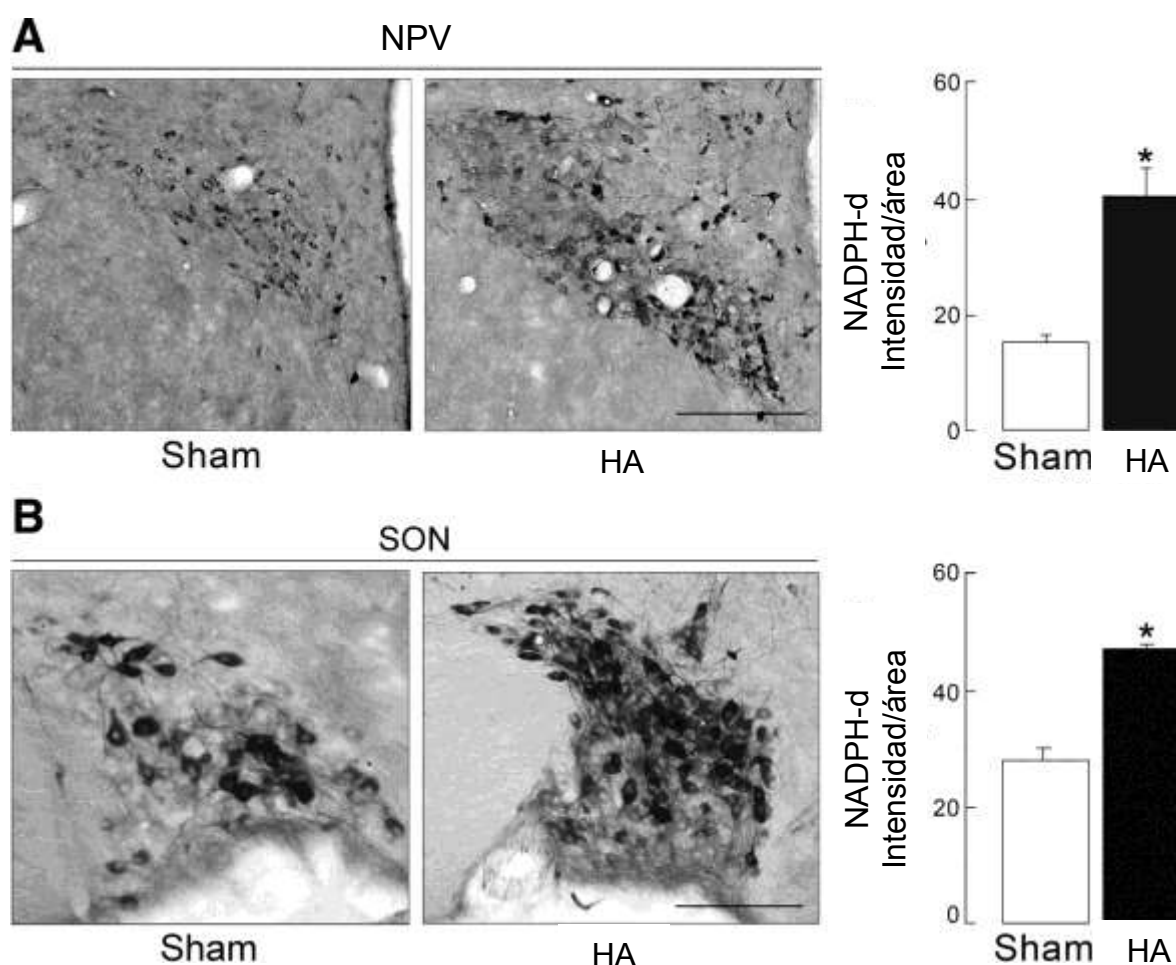


Figura 5. La actividad de las NOS en los núcleos hipotalámicos NPV y SON se incrementa en animales implantados con hipófisis anteriores (HA) bajo la cápsula

renal. Micrografías representativas (izquierda) de la tinción de NADPH-diaforasa en el NPV (A) y NSO (B), en secciones obtenidas de ratas sham y animales implantados. Escala= 100 μ m. Cuantificación de la señal positiva para NADPH-diaforasa (NADPH-d) (derecha) evaluada a través de toda la extensión rostro-caudal del NPV y NSO en tres diferentes animales. Los resultados son promedios \pm EE. * p <0.05 vs ratas sham.

Se observó que la presencia de implantes de HA, y por ende la posible hiperprolactinemia, produjo un incremento en la actividad de NADPH-diaforasa en el NPV y NSO comparados con el grupo control no implantado (Fig. 6). La hiperprolactinemia se confirmó en los animales implantados donde se observó un incremento de cinco veces en los niveles séricos de PRL (Fig. 5A) que fue bloqueado por el tratamiento con bromocriptina, y no así con 7-NI. Más aún, la hiperprolactinemia se asoció con un aumento significativo de los niveles de OXT (Fig. 5B) y AVP (Fig. 5C), mismo que fue inhibido por el tratamiento tanto con bromocriptina como con 7-NI. Estos resultados apoyan la propuesta de que el incremento en los niveles circulantes de OXT y AVP debido a la hiperprolactinemia es consecuencia de que la PRL circulante induce la elevación de la actividad de la nNOS en los NPV y NSO.

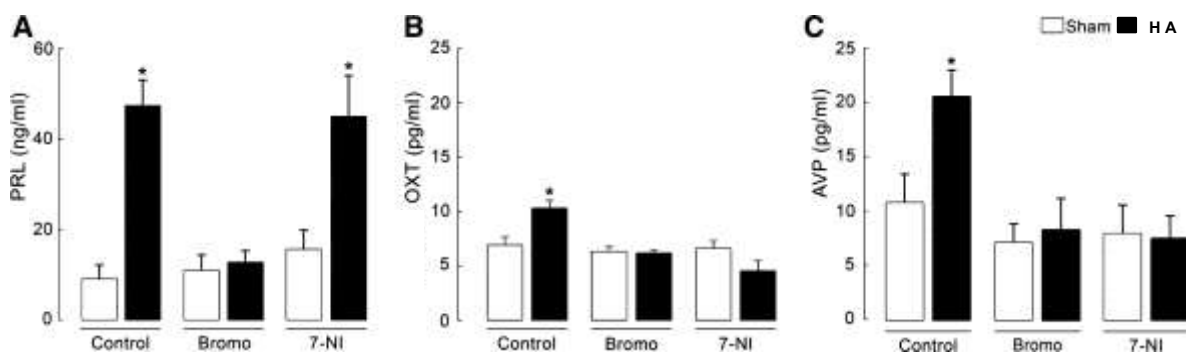


Figura 6. La activación de la nNOS media el incremento de los niveles circulantes de OXT y AVP inducidos por la hiperprolactinemia. Las concentraciones circulantes de PRL (A), OXT (B) y AVP (C) fueron evaluados en ratas no implantadas (sham) y en animales con el implante de dos hipófisis anterior (HA) en ratas tratadas o no (control) con bromocriptina (Bromo) o con 7-nitroindazole (7-NI). Los niveles de PRL fueron evaluados por RIA mientras que las concentraciones de OXT y AVP fueron evaluados por ELISA. Los valores son promedios \pm EE de seis animales por grupo. * p <0.05 vs animales sham, control.

c. La hiperprolactinemia reduce la inactivación/fosforilación en Ser⁸⁴⁷ de la nNOS en extractos hipotalámicos

Se conoce que la fosforilación de la nNOS en la Ser⁸⁴⁷ reduce su actividad al impedir la unión Ca²⁺-CAM necesaria para su activación (Ozuka et al., 2002; Zhou & Zhu, 2009). El análisis por Western blot de la fosforilación de la nNOS en la Ser⁸⁴⁷ reveló que extractos hipotalámicos de ratas implantadas con HA muestran una reducción de la nNOS fosforilada en dicha serina (Fig. 7A). Esta reducción es debida a los altos niveles de PRL circulante, porque se deja de observar al tratar a los animales con bromocriptina. Estas diferencias son significativas cuando se cuantifican los valores densitométricos de la nNOS fosforilada corregidos por la β -actina utilizada como control de carga (Fig. 7B). Estos hallazgos representan evidencia adicional de que la hiperprolactinemia eleva la actividad de la nNOS hipotalámica.

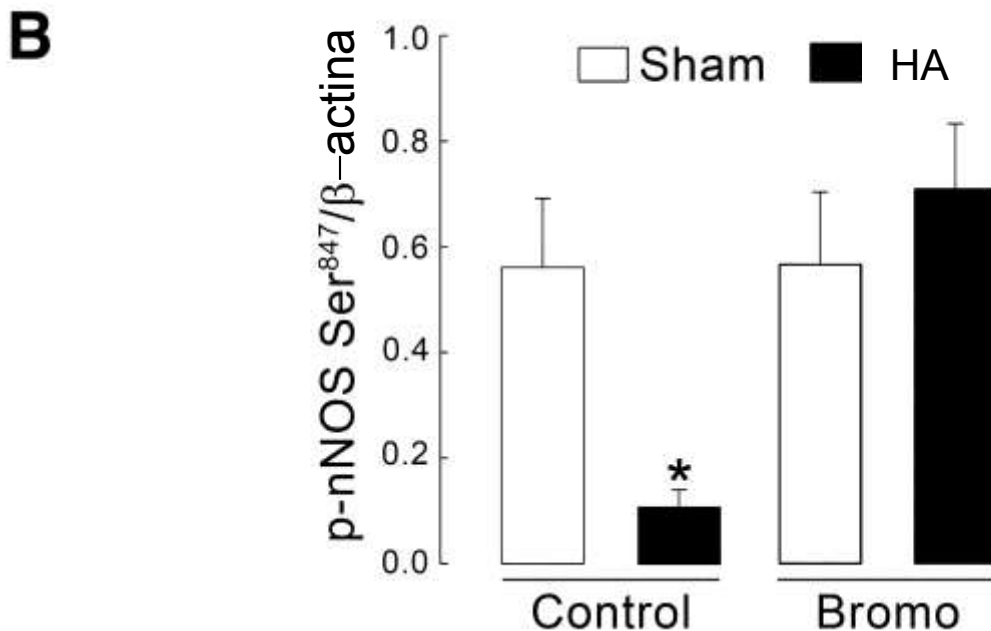
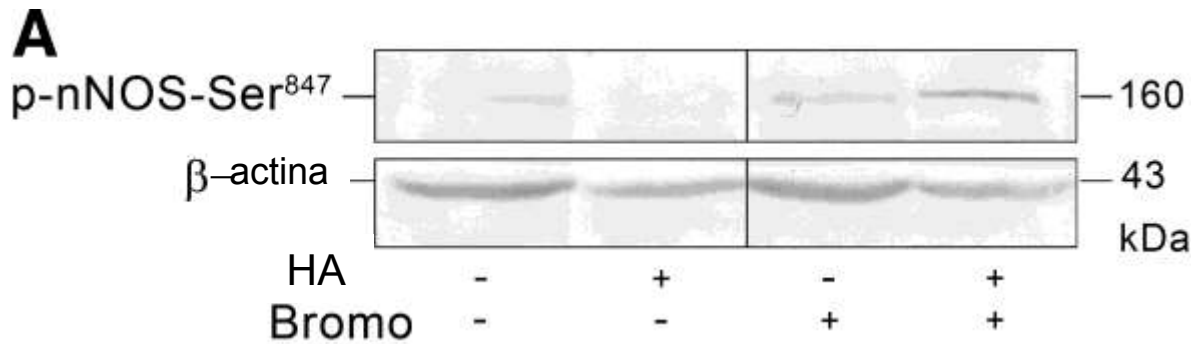


Figura 7. La hiperprolactinemia reduce la fosforilación de nNOS en Ser⁸⁴⁷. **A:** Western blot representativo de la fosforilación de nNOS-Ser⁸⁴⁷ en extractos hipotalámicos de ratas sham y ratas implantadas con hipófisis anteriores (HA), tratadas o no (control) con bromocriptina (Bromo). Se utilizó la proteína β -actina como control de carga. Se muestran las bandas de ambas proteínas del mismo gel. **B:** cuantificación de la fosforilación de nNOS por densitometría después de la normalización por β -actina en un promedio de tres experimentos independientes. Los valores se expresan como promedios \pm EE. * $p < 0.05$ vs animales sham control.

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra por primera vez que la elevación de los niveles centrales o sistémicos de PRL induce la activación de la nNOS en los NPV y NSO

del hipotálamo y que esto resulta en la liberación de OXT y AVP a la circulación. Además, este es el primer trabajo que muestra que la PRL estimula la secreción de ambas neurohormonas en el macho, sugiriendo que la PRL, la OXT y la AVP interaccionan para regular eventos fuera de la esfera reproductiva de las hembras.

Las acciones estimuladoras de la PRL sobre la secreción de OXT y AVP se reportaron asociadas a la lactancia (Parker et. al., 1991) y al embarazo (Donner & Neumann, 2009). En estos estudios, la administración sistémica o icv de la PRL elevó los niveles circulantes de ambas neurohormonas. Además, experimentos en ratas hembra, fuera y dentro de estos estadios reproductivos, mostraron la presencia de receptores a PRL en el NPV y NSO (Kokay et. al., 2006; Mejía et. al., 2003), la expresión de PRL en el SHN (Clapp et. al., 1994; Mejía et. al., 2003; Torner et. al., 1995) y la elevación de la PRL en el NPV por acción de estímulos que también liberan a la OXT y a la AVP neurohipofisiarias, como son la succión de las crías durante la lactancia (Torner et. al., 2004), el tratamiento con estrógenos (Ghosh et. al., 1995; Mohr & Schnitz, 1991; Sladek & Somponpun, 2008; Torner et. al., 1999; Wang et. al., 2007; Yamaguchi et. al., 1979) y la exposición al estrés por inmovilización (Torner et. al., 2004). La conclusión de estos estudios fue que la acción estimuladora de la PRL sobre la secreción de dichas neurohormonas durante el embarazo y la lactancia potencia sus efectos sobre la homeostasis hídrica y de electrolitos, el trabajo de parto, la conducta maternal y la evacuación láctea.

Sin embargo, también existen reportes de que el estrés por inmovilización aumenta los niveles de PRL en extractos hipotalámicos (Zamorano et. al., 2004) y en el perfusado de ratas macho (Torner et. al., 2004). De manera, que también es posible que la PRL estimule la liberación de las hormonas neurohipofisiarias para regular procesos biológicos comunes a ambos sexos, como por ejemplo las respuestas al estrés. Consistentemente con esta posibilidad, el presente trabajo mostró que la infusión icv de PRL induce la liberación de OXT y AVP a la circulación de ratas macho. El efecto fue dosis-dependiente y las dosis utilizadas fueron equivalentes a las concentraciones de PRL usadas en ratas tratadas con esteroides

ováricos (Donner & Neumann, 2009; Popeski et. al., 2003). Dado que el efecto fue observado en machos, es claro que los esteroides ováricos pueden no ser requeridos para que la PRL central estimule la liberación de las hormonas neurohipofisiarias.

Si bien, la administración intracerebroventricular de PRL puede mimetizar el aumento de la PRL producida por el cerebro, también puede reflejar una mayor incorporación central de la hormona sistémica. La PRL puede internalizarse dentro del SNC vía sus receptores presentes en los plexos coroides que permiten su ingreso al líquido cefalorraquídeo (Mangurian et. al., 1992; Walsh et. al., 1987). El líquido cefalorraquídeo es la ruta de acceso de la PRL a varias estructuras cerebrales donde ejerce diferentes funciones (Ben-Jonathan et. al., 1996; Grattan & Kokay, 2008). Además, la hiperprolactinemia aumenta la expresión del receptor de PRL en los plexos coroides (Fujikawa et. al., 1995; Mangurian et. al., 1992), se correlaciona con el incremento en los niveles de PRL en el líquido cefalorraquídeo (Felicio & Bridges, 1992; Mangurian et. al., 1992; Nyberg et. al., 1990; Simpkins, 1992) y produce diferentes efectos sobre el SNC que incluyen la estimulación de la conducta materna (Bridges et. al., 1990; Grattan & Kokay, 2008) la supresión de la fertilidad (Grattan & Kokay, 2008), la atenuación de la secreción de ACTH y de la conducta de ansiedad en respuesta a estímulos estresantes (Torner et. al., 2001) la estimulación de la neurogénesis (Shingo et. al., 2003), y la regulación de la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos (Ben-Jonathan et. al., 1996; Grattan & Kokay, 2008).

En este estudio, mostramos que los niveles circulantes de OXT y AVP se elevan en ratas hiperprolactinemicas comparadas con los animales normoprolactinemicos. El aumento sistémico de ambas neurohomonas parece deberse a que la hiperprolactinemia favorece la incorporación al SNC de la PRL, ya que la disminución de los niveles circulantes de PRL con bromocriptina bloquea dicho

efecto. En apoyo a estas observaciones se ha mostrado que la hiperprolactinemia inducida por el antagonista dopaminérgico, domperidone, incrementa los niveles de PRL en el líquido cefalorraquídeo (Felicio & Bridges, 1992).

También encontramos que un mecanismo molecular similar parece mediar los efectos de la hiperprolactinemia y de la administración intracerebroventricular de PRL sobre la secreción de la OXT y la AVP. En ambos casos, ocurre un incremento en la actividad de las NOS tanto en el NPV como en el NSO, que es revelada por el ensayo de histoquímica para NADPH-diaforasa. Más aún, el tratamiento con 7-NI, un inhibidor selectivo de la nNOS (Moore et. al., 1993; Moore & Handy, 1997), previene la elevación sistémica de ambas neurohormonas, lo que indica que el efecto sistémico y central de la PRL es mediado por la activación específicamente de la nNOS. Consistentemente con esta interpretación, nuestros resultados mostraron que la hiperprolactinemia reduce la fosforilación de la nNOS en sitios de Ser⁸⁴⁷ y que dicho efecto también se bloquea con la administración de bromocriptina. La fosforilación es un mecanismo importante para inhibir la actividad de la nNOS. La nNOS se expresa constitutivamente y su actividad es dependiente del complejo calcio-calmodulina. La unión a este complejo no ocurre cuando la nNOS es fosforilada en la Ser⁸⁴⁷ por la protein cinasa-dependiente de calcio/calmodulina (Hayashi et. al., 1999). Asimismo, se conoce que la fosforilación de la nNOS en Ser⁸⁴⁷ inhibe efectos mediados por la nNOS en el cerebro (Osuka et. al., 2002).

Existe evidencia de que la PRL regula la expresión de la NOS inducible en fibroblastos (Corbacho et. al., 2003), en leucocitos (Dogusan et. al., 2001), y en células de glioma C6 (Raso et. al., 1999). Además, la PRL regula a la NOS endotelial en células endoteliales vasculares (Molinari et. al., 2007). Sin embargo, nuestros hallazgos, son el primer reporte que muestra que la actividad de la nNOS es estimulada por PRL. Esta observación es consistente con reportes previos que indican que bajos niveles de PRL sistémica, debido al tratamiento con bromocriptina, inhiben la actividad de las NOS en el NPV y NSO en ratas ovariectomizadas tratadas con esteroides (Popeski et. al., 2003). La principal

isoforma de las NOS en el SNC es la nNOS, la cual media diferentes funciones biológicas y podría actuar como mediador químico tanto de los efectos centrales como periféricos de la PRL. Por ejemplo, se conoce que la PRL participa en el mantenimiento de la erección peneana a través de inhibir la relajación del cuerpo cavernoso del pene (Ra et. al., 1996), y el NO producido en el tejido eréctil, vía la activación de la nNOS presente en la inervación autónoma de este órgano, es el principal promotor de la erección peneana (Succu et. al., 2008). Por otra parte, no sería inesperado que la PRL ejerciera efectos opuestos sobre la activación de la nNOS dependiendo del tipo de tejido. Se sabe que la regulación de esta enzima es específica de acuerdo al tipo celular (Bugajski et. al., 2004; Wu et. al., 2007). En este sentido, se ha reportado que la activación del receptor de la PRL puede incrementar el calcio intracelular (Sorin et. al., 1998; Vacher et. al., 1994; Villalba et. al., 1991) y la movilización de calmodulina (Arbogast, 2001) lo que, por ende, estimularía la actividad de nNOS. Sin embargo, el receptor de la PRL también se ha asociado con la regulación positiva de la proteína fosfatasa 2A (Carey & Liberty, 1998) y la protein cinasa dependiente de calmodulina (Albarracin et. al., 1994; Bordin et. al., 2004) que se conoce inhiben la actividad de la nNOS al defosforilarla en sitios de Ser⁸⁴⁷ vía proteína fosfatasa 2A (Komeima & Watanabe, 2001)

Como se mencionó previamente, la interacción funcional entre PRL, OXT, y AVP ha sido bien establecida durante el ciclo reproductor en la hembra, donde la regulación positiva de la PRL sobre la liberación de las hormonas neurohipofisarias podría contribuir a promover diversas adaptaciones en el organismo materno (Consiglio & Bridges, 2009; Donner & Neumann, 2009; Grattan & Kokay, 2008; Nephew et. al., 2007; Nephew et. al., 2010; Parker et. al., 1991). El presente trabajo sugiere que las tres hormonas pueden estar funcionalmente ligadas también en el macho. La magnitud del incremento de la PRL circulante (50 ng/ml) utilizado para este estudio es equivalente a los valores de PRL reportados en ratas macho durante sus elevaciones circadianas (Esquifino et. al., 2004) o en respuesta a estímulos estresantes (Krulich et. al., 1975; Sylvester et. al., 1989). La implicación funcional de la interacción entre estas tres hormonas se desconoce en machos. Sin embargo, se puede proponer que estas acciones neuroendócrinas operan en la regulación de

las respuestas al estrés, en el balance de sodio y agua, y en la regulación de la actividad sexual. En todos estos procesos se ha descrito la participación de las tres hormonas. Por ejemplo, la PRL, la OXT, y la AVP se liberan a la circulación en respuesta a diferentes estresores (Engelmann et. al., 2004; Freeman et. al., 2000) y, mientras que la PRL actúa centralmente inhibiendo la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) inducida por el estresor (Torner et. al., 2001), la OXT y la AVP sistémicas estimulan la secreción de ACTH y de glucocorticoides a la circulación (Engelmann et. al., 2004). Así, a través de estimular la liberación sistémica de OXT y AVP, la PRL podría modular su efecto central inhibitorio sobre el eje HHA ante las diferentes demandas fisiológicas. Por otra parte, también se sabe que las tres hormonas son liberadas en respuesta a estímulos osmóticos (Cunningham & Sawchenko, 1991; Kaufman & Mackay, 1983). La AVP estimula la retención de agua y aumenta la presión sanguínea; la OXT promueve la natriuresis, y la PRL estimula la retención de sodio y agua, y tiene efectos vasoconstrictores (Cunningham & Sawchenko, 1991; Freeman et. al., 2000; Molinari et. al., 2007). De tal forma que vía la liberación de ambas neurohormonas, la PRL podría ejercer efectos acumulativos y/o moduladores de la homeostasis de los fluidos y electrolitos. Finalmente, tanto la PRL como la OXT aumentan en la circulación en respuesta al orgasmo (Kruger et. al., 2003), y se ha propuesto que la PRL y la OXT podrían contribuir a la generación del periodo refractario post-eyaculatorio (Stoneham et. al., 1985; Kruger et. al., 2003; Vignozzi et. al., 2004). Además, la hiperprolactinemia se asocia con un bajo deseo sexual y problemas eréctiles (Kruger et. al., 2002; Ra et. al., 1996), la AVP (Sodersten et. al., 1983) y la OXT (Stoneham et. al., 1985) alargan el periodo refractario post-orgásmico, y la OXT induce la flacidez peneana post-orgásmica (Vignozzi et. al., 2004).

En resumen, nuestro trabajo muestra que el incremento en los niveles de PRL en el SNC o en el suero estimula la actividad de la nNOS, induciendo en consecuencia la secreción de OXT y AVP a la circulación y que este mecanismo opera en ratas machos. Estas observaciones pueden ayudar a comprender mejor las interacciones funcionales de estas tres hormonas no solamente durante el ciclo reproductor de las hembras sino en procesos funcionales comunes a ambos sexos, como son las

respuestas al estrés, la osmoregulación, y la actividad sexual. Asimismo, este estudio muestra que la nNOS es blanco de la PRL y es parte de su vía de señalización en el SNC. Sin embargo, se requieren más estudios para esclarecer todas estas posibilidades.

BIBLIOGRAFIA

Adler RA. 1986. The anterior pituitary-grafted rat: a valid model of chronic hyperprolactinemia. *Endocr Rev* 7: 302–313.

Aguilera G. 1994. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol.* (4):321-50. Review.

Albarracin CT, Palfrey HC, Duan WR, Rao MC, Gibori G. 1994. Prolactin regulation of the calmodulin-dependent protein kinase III elongation factor-2 system in the rat corpus luteum. *J Biol Chem* 269: 7772–7776.

Arbogast LA. 2001. Calmodulin and a cyclic nucleotide-dependent protein kinase facilitate the prolactin-induced increase in tyrosine hydroxylase activity in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Endocrine* 16: 105–112.

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.* 386(2):161-77.

Bátor J, Varga J, Berta G, Barbakadze T, Mikeladze D, Ramsden J, Szeberényi J. 2012. Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, fails to bypass the block of neuronal differentiation in PC12 cells imposed by a dominant negative Ras protein. *Cell Mol Biol Lett.* 17(3):323-32.

Ben_Jonathan N., Mershon JL., Allen DI, Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev:* 17:6639-669.

Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR. **2006**. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab.* 17(3):110-6. Review.

Bodosi B, Obál F Jr, Gardi J, Komlódi 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):R1590-8.

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* 19:3 225-268.

Bordin S, Amaral ME, Anhe GF, Delghingaro-Augusto V, Cunha DA, Nicoletti-Carvalho JE, Boschero AC. **2004**. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. *Mol Cell Endocrinol* 220: 41–50.

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 USA* 87: 8003–8007.

Bugajski J, Gadek-Michalska A, Bugajski AJ. **2004**. Nitric oxide and prostaglandin systems in the stimulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by neurotransmitters and neurohormones. *J Physiol Pharmacol* 55: 679–703.

Bussieres L, Laborde K, Dechaux M, Sachs C. **1987**. Effects of prolactin on Na-K-ATPase activity along the rat nephron. *Pflugers Arch.* 409(1-2):182-7.

Carey GB, Liberti JP. **1998**. Okadaic acid mimics several proximal effects of prolactin in Nb2 lymphoma cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 219: 57–63.

Clapp C, Torner L, Gutierrez-Ospina G, Alcantara E, Lopez-Gomez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejia S, Morales MA, Martinez 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 USA* 91: 10384– 10388.

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. Review.

Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G. **2009**. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev.* 89(4):1177-215. Review.

Consiglio AR, Bridges RS. **2009**. Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. *Behav Brain Res* 197: 97–102.

Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Eiserich JP, Cross CE, Martinez de la Escalera G, Clapp C. **2003**. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett* 544: 171–175.

Cunningham ET Jr, Sawchenko PE. **1991**. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends Neurosci* 14: 406 –411.

Dale HH. **1906**. On some physiological actions of ergot. *J Physiol.* 34(3):163-206.

Dawson VL, Dawson TM. **1996**. Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem Int.* 29(2):97-110. Review.

de Wied D, Diamant M, Fodor M. 1993. Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. *Front Neuroendocrinol.*14:251–302.

Dogusan Z, Hooghe R, Verdood P, Hooghe-Peters EL. **2001**. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *J Neuroimmunol* 120: 58–66.

Donaldson ZR, Young LJ. **2008**. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* 322: 900–904.

Donner N, Neumann ID. **2009**. Effects of chronic intracerebral prolactin on the oxytocinergic and vasopressinergic system of virgin ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 90: 315–322.

DU VIGNEAUD V, WARD DN. **1956**. Studies on the purification of lysine vasopressin from hog pituitary glands. *J Biol Chem.* 222(2):951-8

Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. **1998**. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med.* 19(4-5):221-357. Review.

Elphick MR, Rowe ML. **2009**. amide and echinotocin: structurally unrelated myoactive neuropeptides derived from neurophysin-containing precursors in sea urchins. *J Exp Biol.* 212:1067–77.

Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. **2004**. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* 25: 132–149.

Esquifino AI, Chacon F, Jimenez V, Reyes Toso CF, Cardinali DP. **2004**. d24-hour changes in circulating prolactin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in male rats subjected to social isolation [Online]. *J Circ Rhythms* 2:1.

Felicio LF, Bridges RS. **1992**. Domperidone induces a probenecid-sensitive rise in immunoreactive prolactin in cerebroventricular perfusates in female rats. *Brain Res* 573: 133–138.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. **2000**. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80: 1523–1631.

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* 136: 5608–5613.

Garrison JL, Macosko EZ, Bernstein S, Pokala N, Albrecht DR, Bargmann CI. **2012**. Oxytocin/vasopressin-related peptides have an ancient role in reproductive behavior. *Science*. 338:540–3.

Garthwaite J, Boulton CL. **1995**. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*.57:683-706. Review.

Geller DA, Billiar TR. **1998**. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*. 17(1):7-23.

Ghosh R, Sladek CD. **1995**. Role of prolactin and gonadal steroids in regulation of oxytocin mRNA during lactation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 269: E76–E84.

Grattan DR, Kokay IC. **2008**. Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 20: 752–763.

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

Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Diaz-Muñoz M, Rubio R, Lin SH, Martinez de la Escalera G, Clapp C. **2004**. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*. 145(12):5714-22.

Gutkowska J, Jankowski M, Mukaddam-Daher S, McCann SM. **2000**. Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Braz J Med Biol Res*. 33(6):625-33. Review.

Hatakeyama S, Kawai Y, Ueyama T, Senba E. **1996**. Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express Fos following stress stimuli. *J Chem Neuroanat* 11: 243–256.

Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y. **1999**. Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem* 274: 20597–20602.

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

Ignarro LJ. **1992**. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans*. 20(2):465-9. Review.

Ingram CD, Ciobanu R, Coculescu IL, Tanasescu R, Coculescu M, Mihai R. **1998**. Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res*. 119:351–64.

Kadekaro M. **2004**. Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Braz J Med Biol Res* 37: 441–450.

Kadekaro M, Liu H, Terrell ML, Gestl S, Bui V, Summy-Long JY. **1997**. Role of NO on vasopressin and oxytocin release and blood pressure responses during osmotic stimulation in rats. *Am J Physiol*. 273(3 Pt 2):R1024-30

Kaufman S, Mackay BJ. **1983**. Plasma prolactin levels and body fluid deficits in the rat: causal interactions and control of water intake. *J Physiol* 336: 73–81.

Kokay IC, Bull PM, Davis RL, Ludwig M, Grattan DR. **2006**. Expression of the long form of the prolactin receptor in magnocellular oxytocin neurons is associated with specific prolactin regulation of oxytocin neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1216–R1225.

Kokay IC, Grattan DR. **2005**. Expression of mRNA for prolactin receptor (long form) in dopamine and pro-opiomelanocortin neurones in the arcuate nucleus of non-pregnant and lactating rats. *J Neuroendocrinol*. (12):827-35.

Kruger TH, Haake P, Chereath D, Knapp W, Janssen OE, Exton MS, Schedlowski M, Hartmann U. **2003**. Specificity of the neuroendocrine response to orgasm during sexual arousal in men. *J Endocrinol* 177: 57–64.

Kruger TH, Haake P, Hartmann U, Schedlowski M, Exton MS. **2002**. Orgasm-induced prolactin secretion: feedback control of sexual drive? *Neurosci Biobehav Rev* 26: 31–44.

Krulich L, Hefco E, Aschenbrenner JE. **1975**. Mechanism of the effects of hypothalamic deafferentation on prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 96: 107–118.

Kurose T, Ueta Y, Nomura M, Yamaguchi K, Nagata S. **2001**. Nociceptive stimulation increases NO synthase mRNA and vasopressin heteronuclearRNA in the rat paraventricular nucleus. *Auton Neurosci* 88: 52–60.

Legros JJ. **2001**. Inhibitory effect of oxytocin on corticotrope function in humans: are vasopressin and oxytocin ying-yang neurohormones? *Psychoneuroendocrinology*. 26(7):649-55. Review.

Lerant A, Freeman ME. **1998**. Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Res*. 802(1-2):141-54.

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.

Makuch W, Mika J, Rojewska E, Zychowska M, Przewlocka B. **2013**. Effects of selective and non-selective inhibitors of nitric oxide synthase on morphine- and endomorphin-1-induced analgesia in acute and neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology*. 75:445-57.

Mangurian LP, Walsh RJ, Posner BI. **1992**. Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology* 131: 698–702.

McCall C, Singer T. **2012**. The animal and human neuroendocrinology of social cognition, motivation and behavior. *Nat Neurosci*. 15:681–8.

McEwen BB. **2004**. General introduction to vasopressin and oxytocin: structure/metabolism, evolutionary aspects, neural pathway/receptor distribution, and functional aspects relevant to memory processing. *Adv Pharmacol*. 50:1–50, 655-708.

Mejia S, Morales MA, Zetina ME, Martinez de la Escalera G, Clapp C. **1997**. Immunoreactive prolactin forms colocalize with vasopressin in neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology* 66: 151–159.

Mejia S, Torner LM, Jeziorski MC, Gonzalez 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* 20: 155–162.

Milenković 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*.91(4):1244-7

Millan MJ. **2003**. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*. 70(2):83-244. Review

Mohr E, Schmitz E. **1991**. Functional characterization of estrogen and glucocorticoid responsive elements in the rat oxytocin gene. *Brain Res Mol Brain Res* 9: 293–298.

Molinari C, Grossini E, Mary DA, Uberti F, Ghigo E, Ribichini F, Surico N, Vacca G. **2007**. Prolactin induces regional vasoconstriction through the α_2 -adrenergic and nitric oxide mechanisms. *Endocrinology* 148: 4080–4090.

Moore PK, Handy RL. **1997**. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase— is no NOS really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol Sci* 18: 204–211.

Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL, Babbedge RC. **1993**. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol* 110: 219–224.

Nagano M, Kelly PA. **1994**. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem*. 269(18):13337-45.

Nephew BC, Amico J, Cai HM, Walker AM, Bridges RS. **2007**. Intracerebroventricular administration of the prolactin (PRL) receptor antagonist, S179D PRL, disrupts parturition in rats. *Reproduction* 134: 155–160.

Nephew BC, Byrnes EM, Bridges RS. **2010**. Vasopressin mediates enhanced offspring protection in multiparous rats. *Neuropharmacology* 58: 102–106.

Neumann ID. **2008**. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol* 20: 858–865.

Neumann ID, Torner L, Wigger A. **2000**. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience*.95(2):567-75.

Nyberg F, Isacson CA, Brostedt E, Roos P. **1990**. Characterization of prolactin immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. *Brain Res* 506: 129–132.

Orlando GF, Langnaese K, Landgraf R, Spina MG, Wolf G, Engelmann M. **2007**. Neural nitric oxide gene inactivation affects the release profile of oxytocin into the blood in response to forced swimming. *Nitric Oxide* 16: 64–70.

Orlando GF, Wolf G, Engelmann M. **2008**. Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice. *Amino Acids* 35: 17–27.

Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Fukunaga K, Miyamoto E, Takayasu M, Tokuda M, Yoshida J. **2002**. Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser847 by CaM-KII in the hippocampus of rat brain after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 1098–1106.

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

Parker SL, Armstrong WE, Sladek CD, Grosvenor CE, Crowley WR. **1991**. Prolactin stimulates the release of oxytocin in lactating rats: evidence for a physiological role via an action at the neural lobe. *Neuroendocrinology* 53: 503–510.

Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A. **1985**. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* 13: 139–143.

Pedersen CA, Prange AJ Jr. **1979**. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(12):6661-5.

Pi XJ, Grattan DR. **1998**. Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J Comp Neurol*. 394(4):462-74

Pi XJ, Grattan DR. **1999**. Increased prolactin receptor immunoreactivity in the hypothalamus of lactating rats. *J Neuroendocrinol*. (9):693-705.

Pi XJ, Grattan DR. **1999**. Increased expression of both short and long forms of prolactin receptor mRNA in hypothalamic nuclei of lactating rats. *J Mol Endocrinol*. (1):13-22

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.

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

Ra S, Aoki H, Fujioka T, Sato F, Kubo T, Yasuda N. **1996**. In vitro contraction of the canine corpus cavernosum penis by direct perfusion with prolactin or growth hormone. *J Urol* 156: 522–525.

Raso GM, Meli R, Gualillo O, Pacilio M, Di Carlo R. **1999**. Prolactin induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells *J Neurochem*. 73: 2272–2277.

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*. (5):422-9.

Sauvé D, Woodside B. **1996**. The effect of central administration of prolactin on food intake in virgin female rats is dose-dependent, occurs in the absence of ovarian hormones and the latency to onset varies with feeding regimen. *Brain Res*. 729(1):75-81.

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: 117–120.

Sinha YN. **1995**. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 354: 69.

Simpkins JW. 1992. Effects of advancing age on cerebrospinal fluid concentrations of prolactin in the female rat. *Brain Res* 582: 357–358.

Sladek CD, Somponpun SJ. 2008. Estrogen receptors: their roles in regulation of vasopressin release for maintenance of fluid and electrolyte homeostasis. *Front Neuroendocrinol* 29: 114–127.

Sodersten P, Henning M, Melin P, Ludin S. 1983. Vasopressin alters female sexual behaviour by acting on the brain independently of alterations in blood pressure. *Nature* 301: 608–610.

Sonigo C, Bouilly J, Carré N, Tolle V, Caraty A, Tello J, Simony-Conesa FJ, Millar R, Young J, Binart N. 2012. Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration. *J Clin Invest.* 122(10):3791-5.

Sorin B, Goupille O, Vacher AM, Paly J, Djiane J, Vacher P. 1998. Distinct cytoplasmic regions of the prolactin receptor are required for prolactin-induced calcium entry. *J Biol Chem* 273: 28461–28469.

Srisawat R, Bishop VR, Bull PM, Douglas AJ, Russell JA, Ludwig M, Leng G. 2004. Regulation of neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in the rat magnocellular neurosecretory system. *Neurosci Lett* 369: 191–196.

Srisawat R, Ludwig M, Bull PM, Douglas AJ, Russell JA, Leng G. 2000. Nitric oxide and the oxytocin system in pregnancy. *J Neurosci* 20: 6721–6727.

Stefano GB, Kim E, Liu Y, Zhu W, Casares F, Mantione K, Jones DA, Cadet P. 2004. Nitric oxide modulates microglial activation. *Med Sci Monit.* 10(2):BR17-22.

Steimer T. 2002. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci.* (3):231-49.

Stoneham MD, Everitt BJ, Hansen S, Lightman SL, Todd K. **1985.** Oxytocin and sexual behaviour in the male rat and rabbit. *J Endocrinol* 107: 97–106.

Stoop R. 2012. Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron.* 76:142–59.

Sylvester PW, Forczek S, Ip MM, Ip C. **1989.** Exercise training and the differential prolactin response in male and female rats. *J Appl Physiol* 67:804–810.

Thackare H, Nicholson HD, Whittington K. **2006.** Oxytocin—its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Hum Reprod Update* 12:437–448.

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: 1601–1608.

Torner L, Mejia S, Lopez-Gomez FJ, Quintanar A, Martinez de la Escalera G, Clapp C. **1995.** A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* 136: 5454–5460.

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: 423–432.

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 Neurosci* 21: 3207–3214.

Vacher P, Tran Van Chuoi M, Paly J, Djiane J, Dufy B. **1994**. Short term effect of prolactin on intracellular calcium in Chinese hamster ovary cells stably transfected with prolactin receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 134: 1213–1218.

Ventura RR, Giusti-Paiva A, Gomes DA, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. **2005**. Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. *Neurosci Lett* 379:75–80.

Verbalis JG, Mangione MP, Stricker EM. **1991**. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology*. 128(3):1317-22.

Vignozzi L, Filippi S, Luconi M, Morelli A, Mancina R, Marini M, Vannelli GB, Granchi S, Orlando C, Gelmini S, Ledda F, Forti G, Maggi M. **2004**. Oxytocin receptor is expressed in the penis and mediates an estrogen-dependent smooth muscle contractility. *Endocrinology* 145:1823–1834.

Villalba M, Zabala MT, Martinez-Serrano A, de la Colina R, Satrustegui J, and Garcia-Ruiz JP. **1991**. Prolactin increases cytosolic free calcium concentration in hepatocytes of lactating rats. *Endocrinology* 129: 2857–2861.

Villar MJ, Ceccatelli S, Ronnqvist M, Hokfelt T. **1994**. Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Res* 644: 273–281.

Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI. **1987**. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120: 1846–1850.

Wang H, Ward AR, Morris JF. **1995**. Estradiol acutely stimulates exocytosis of oxytocin and vasopressin from dendrites and somata of hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience* 68: 1179–1188.

Wu R, Yin J, Yao K, Haefliger I. **2007**. Inhibition by brimonidine of forskolin-induced nitric oxide synthase expression in human ciliary bodies in vitro. *Mol Vis* 13: 493–496.

Yamaguchi K, Akaishi T, Negoro H. **1979**. Effect of estrogen treatment on plasma oxytocin and vasopressin in ovariectomized rats. *Endocrinol Jpn* 26: 197–205.

Zamorano M, Ledesma-Colunga M, Adán N, Vera-Massieu C, Lemini M, Méndez I, Moreno-Carranza B, Neumann I, Thebault S, Martínez de la Escalera G, Torner L, Clapp C. **2014**. Vasoinhibin increases anxiety- and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology* Accepted (PNEC-D-13-00742), doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.03.006.

Zhou L, Zhu DY. **2009**. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20: 223–230.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Neurobiología y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. Becario 173245) por haber otorgado la beca que me permitió realizar mis estudios de doctorado y el financiamiento de mi trabajo experimental (donativos 87015 y 161594)

A mi tutora, la Dra. Carmen Clapp por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por dirigir este proyecto.

A los Doctores Gonzalo Martínez de la Escalera y Michael Jeziorski por sus consejos.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Ma. Isabel Miranda Saucedo y el Dr. Rolando Hernández Muñoz por su participación en los exámenes tutorales que tanto ayudaron en mi formación y en la mejora del proyecto.

A los integrantes del jurado, las Doctoras Carmen Aceves Velasco, Maricela Luna Muñoz y María de La Luz Torner Aguilar y el Doctor Miguel Ángel Morales Mendoza por sus valiosas sugerencias y comentarios.

A la Doctora Isabel C. Méndez Hernández y el Doctor Andrés Quintanar Stephano por su asesoría y ayuda en la medición de la prolactina y la obtención de animales hiperprolactinemicos respectivamente.

A la Dra. Bibiana Moreno por el apoyo que me brindo en la realización de algunos de los experimentos.

Al Nut. Fernando López Barrera por su apoyo técnico necesario para la realización de los experimentos, organización y presentación de los resultados. Le agradezco su disposición a ayudarme en todo, pero sobre todo su gran amistad.

A los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán por su apoyo en las labores cotidianas.

Al M.V.Z. Martín García Servín, responsable del bioterio del Instituto de Neurobiología, por su labor en la atención y suministro de los animales necesarios para el desarrollo de esta tesis.

A María de Lourdes Lara Ayala de la unidad de videoconferencia por hacer posible las evaluaciones tutorales a lo largo del doctorado.

A los coordinadores del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Neurobiología, los Doctores Mauricio Díaz Muñoz, Maricela Luna Muñoz y Aurea Orozco Rivas.

A la M en C Leonor Casanova Rico y Carmen Vázquez por su apoyo invaluable en los trámites y procesos administrativos del posgrado.

A todos los miembros pasados y presentes de los laboratorios A-14 y A-15 pues han sido excelentes compañeros y en todo momento me han brindado su ayuda.

DEDICATORIA

A Dios, que me bendice cada día

A mi querida madre Victoria Cázares

A mis amados hijos, Josué e Isaac.

