



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM JURIQUILLA, QRO

“EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL
HIPOTÁLAMO”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (Neurobiología)

P R E S E N T A
Q.F.B. Claudia Leticia Vega Cázares

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ

COTUTORA DE TESIS
DRA. MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ CASTILLO

Juriquilla, Querétaro

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	5
I. PRL Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	5
a. Funciones	5
b. Receptores	7
c. Producción local	9
II. NO Y SISTEMA NERVIOSO	11
a. Generalidades del NO	11
b. Funciones	12
III. NO Y PRL	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO Y METAS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	30
REFERENCIAS	37

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) restringe la secreción de vasopresina (VP) y oxitocina (OXT) neurohipofisarias que tienen lugar en respuesta al aumento en el consumo de sal (NaCl). Por su parte, la prolactina (PRL) estimula la secreción de VP y OXT por el sistema hipotálamo-neurohipofisario y tiene acciones inhibitorias sobre la producción NO en diversos tipos celulares. En el presente trabajo investigamos si el efecto estimulador de la PRL sobre la secreción de VP y OXT involucra la inhibición de la vía del NO en ratas. Con este propósito, determinamos si la sobrecarga de sal estimula la concentración de NO en el hipotálamo y si la PRL puede inhibir dicho incremento. La concentración de NO se evaluó mediante el método de citrulina radioactiva en extractos hipotálamicos de ratas macho que recibieron o no 2% de NaCl en el agua de beber por cuatro días. La sobrecarga de NaCl aumentó seis veces la concentración hipotalámica de NO con respecto al grupo control. Además, este efecto se localizó en los núcleos paraventriculares del hipotálamo, a juzgar por la tinción positiva a la reacción de NADPH-diaforasa que revela la actividad de las sintetasas de NO (NOS). De hecho, observamos que el aumento en las NOS incluye a la isoforma del tipo inducible (iNOS), ya que el consumo de NaCl incrementó la concentración de iNOS evaluada por Western blots y por inmunohistoquímica en extractos hipotálamicos y en los núcleos paraventriculares, respectivamente. En vista de estos resultados, determinamos el efecto de administrar tres dosis de PRL (300 ng/2 μ l/24 horas) en el ventrículo cerebral lateral derecho, sobre la respuesta de aumento en NO hipotalámico inducida por la sobrecarga de sal. La administración de PRL bloqueó el aumento en la concentración de NO hipotalámico inducida por el NaCl, pero no modificó la producción de NO basal en ausencia de NaCl. Estos resultados demuestran que la PRL inhibe la producción de NO en el hipotálamo y sugieren que esta acción puede formar parte del mecanismo de acción por el cual la PRL regula de manera positiva la secreción fisiológica de VP y OXT.

INTRODUCCIÓN

La prolactina (PRL) representa a una familia de hormonas y citocinas derivadas de un mismo gen que difieren estructuralmente entre sí por la presencia de modificaciones postraduccionales que incluyen a la glicosilación, la fosforilación y la proteólisis. Estas proteínas se producen principalmente en la hipófisis anterior, pero también en el sistema nervioso central, en el sistema inmune y en órganos periféricos, y están involucradas en múltiples funciones que se ubican dentro de la reproducción, la osmoregulación, el crecimiento y la respuesta inmune (Ben Jonathan et al., 1996).

Desde hace tiempo se sabe que el sistema nervioso central es blanco de las acciones de la PRL. Entre los efectos centrales de la PRL se incluyen: la regulación de la secreción de neuropéptidos y neurotransmisores, la regulación del ciclo sueño-vigilia, la regulación de las conductas sexual, materna y de ingesta de agua y alimentos, así como la modulación de la respuesta al estrés (Ben-Jonathan et al., 1996). Si bien estos efectos parecen claros hay mucha información que se desconoce. Por ejemplo, no se sabe si estas acciones centrales obedecen al efecto de la PRL o al de sus variantes moleculares. Además, a pesar de que los receptores de PRL se han descrito en diferentes regiones del sistema nervioso central, no se ha dilucidado con claridad los sitios centrales de las acciones de la PRL, ni los mecanismos celulares e intracelulares involucrados (Fujikawa et al., 1995).

Evidencias recientes muestran que la PRL y su fragmento hormonal de 16 kDa (PRL-16K) regulan la producción de NO en distintos tipos celulares. El NO es un gas altamente reactivo con una vida media de segundos en los sistemas biológicos. El NO posee múltiples efectos que incluyen acciones sobre la neurotransmisión, la fisiología vascular (vasorelajación y angiogénesis) y la inmunorregulación (inhibición de la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio vascular y efectos tóxicos para microorganismos). El efecto de la PRL y el de la PRL-16K sobre la producción de NO puede ser opuesto. La PRL-16K estimula la

expresión de la sintasa inducible de NO (iNOS) y la producción de NO en fibroblastos de pulmón (Corbacho et al., 2000), mientras que la PRL la inhibe (Corbacho et al., 2003). Más recientemente, se observó que la PRL-16K, pero no la PRL, inhibe a la sintasa endotelial de NO (eNOS) y que este efecto se traduce en una acción vasoconstrictora (González et al., 2004).

Una de las funciones del NO en el sistema nervioso central es la regulación de la secreción de las neurohormonas vasopresina (VP) y oxitocina (OXT) por parte del sistema hipotálamo-neurohipofisario. El sistema hipotálamo-neurohipofisario está conformado por los núcleos hipotalámicos paraventricular (NPV) y supraóptico (NSO) y sus proyecciones neurohipofisarias. Ambos núcleos producen grandes cantidades de NO y esta producción puede ser regulada. Por ejemplo, el aumento en el consumo de sal (NaCl) produce un incremento en el RNA mensajero de la sintasa neuronal de NO (nNOS) y en la producción de NO en el NPV y en el NSO. El NO parece restringir la secreción neurohipofisaria de VP y OXT que tiene lugar en respuesta a la sobrecarga de sal, porque cuando se bloquea la síntesis local de NO, aumenta la secreción de ambas hormonas (Kadowaki et al., 1994). Resultados similares se han obtenido utilizando como estímulo la deshidratación (Kadekaro, 2004). Interesantemente, las neuronas magnocelulares vasopresinérgicas del NPV expresan el receptor de PRL, la PRL estimula la secreción de OXT (Parker et al., 1991), y tanto la PRL como la PRL-16K estimulan la secreción de vasopresina por explantes hipotálamo-neurohipofisarios en cultivo (Mejía et al., 2003). Dado que la PRL estimula la secreción de las hormonas neurohipofisarias y en distintos tipos celulares puede inhibir la producción de NO, que es un regulador negativo de la secreción de VP y OXT, la PRL puede inhibir la producción de NO en el sistema hipotálamo-neurohipofisario favoreciendo así el efecto estimulador de la PRL sobre la secreción de las hormonas VP y OXT.

En esta tesis se estudian aspectos de la fisiología de la PRL y del NO sobre el sistema nervioso central con el propósito de estudiar si el NO pudiese estar involucrado en las acciones centrales de la PRL. En particular, pretendemos

abordar experimentalmente si la PRL regula la producción de NO en el núcleo PV del hipotálamo.

ANTECEDENTES

I. PRL Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

a. Funciones

La PRL ejerce diversas acciones en el SNC principalmente dentro del hipotálamo, que incluyen: la regulación de la secreción de neurotransmisores y neuropéptidos, la estimulación de la proliferación de astrocitos y neuronas, la regulación del ciclo sueño y vigilia, y la regulación de la expresión de conductas como la maternal, sexual, de ingesta y de ansiedad (Ben-Jonathan, 1996, Shingo et al., 2003).

Un ejemplo del efecto de la PRL sobre la secreción de neurotransmisores, es su acción sobre las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) en el núcleo arcuato del hipotálamo. La PRL estimula la secreción de dopamina por estas neuronas dando lugar a un mecanismo de retroalimentación negativa sobre su propia secreción. Este mecanismo se apoya también en el efecto inhibitorio de la PRL sobre la secreción del péptido intestinal vasoactivo (VIP), que al producirse por el hipotálamo y ser secretado al sistema portal hipotálamo-neurohipofisiario funciona como secretagogo de la PRL hipofisiaria (Ben-Jonathan, 1996). También se han descrito efectos inhibitorios de la PRL sobre la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (Ngr.) por las neuronas que la producen en el hipotálamo (Milenkovic et al., 1994), y se piensa que este es el mecanismo que media el cese de ovulación durante la lactancia. El receptor de PRL está presente en los núcleos PV y SO del hipotálamo (Roky et al., 1996), y la PRL estimula la secreción de OXT y VP por explantes hipotálamo-neurohipofisarios en cultivo (Mejía et al., 2003).

El efecto de la PRL sobre OXT podría participar en aumentar el aporte de esta hormona durante la lactancia; sin embargo las implicaciones funcionales del efecto de la PRL sobre la secreción de VP son menos claras. Al respecto, recientemente se ha tenido evidencia de que la PRL-16K tiene propiedades vasoconstrictoras, a

través de inhibir la producción de eNOS, un importante relajador del músculo liso vascular (González et al., 2004). Dado que la PRL, pero también la PRL-16K, estimulan la secreción de VP por el sistema hipotálamo-neurohipofisiario, este podría ser un mecanismo para potenciar sistémicamente la acción vasoconstrictora de la PRL-16K. Alternativamente, la acción sobre VP, 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). Todas estas posibilidades son especulativas y deberán ser abordadas experimentalmente.

Por otra parte, se ha demostrado que la PRL puede estimular la proliferación de astrocitos en cultivo (De Vito et al., 1992), y más recientemente se demostró que podría promover la neurogénesis en un modelo de ratas lactantes adultas (Bridges et al., 2003, Shingo et al., 2003). Además, diversos estudios han propuesto la posible participación de la PRL en la regulación del ciclo sueño-vigilia. La administración intracerebroventricular (icv) de PRL promueve la fase de movimientos oculares rápidos del sueño (MOR), mientras que la inmunoneutralización de las PRLs centrales con anticuerpos anti-PRL bloquea dicha fase del sueño (Ben-Jonathan, 1996). Del mismo modo, estudios más recientes han mostrado que la hipofisectomía suprime la fase MOR del sueño (Bodosi et al., 2000).

Por lo que respecta a sus acciones sobre la conducta, parece claro que 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 consistentemente se ha descrito un incremento en la expresión de la PRL como de su receptor durante la gestación y la lactancia (Pi XJ et al., 1999, Bakowska et al., 1997). 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 PV 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 en la modulación de la ansiedad. Por ejemplo, estudios de Torner y colaboradores (Torner et al., 2001, 2004) mostraron que la PRL icv reduce la ansiedad y la secreción de ACTH en respuesta al estrés y que estos efectos se eliminan mediante el bloqueo de la expresión del receptor de PRL en el SNC. El NPV participa en la integración de las respuestas neuroendocrinas al estrés (Steimer 2002, Millan, 2003) y constituye la vía final común para la secreción de la hormona liberadora de las corticotropinas (CRH) responsable de promover la secreción de ACTH por la hipófisis (Aguilera, 1994). Además, el NPV expresa a la PRL y a un fragmento de 14 kDa de la hormona (Clapp et al., 1994).

b. Receptores

Se han identificado al menos tres isoformas del receptor de PRL. Estas variantes moleculares son resultado del procesamiento alternativo del RNA mensajero (Boutin et al., 1988). La región extracitoplasmática de unión a la PRL es idéntica entre las tres isoformas. Pero difieren en la expresión del dominio citoplasmático, que las define como receptor corto (291 aminoácidos, 42 kDa), intermedio (393 aminoácidos, 65kDa) y largo (591 aminoácidos, 80kDa) (Nelly et al., 1991).

La forma larga es la isoforma mejor representada, que aunque está en un nivel de expresión basal 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 et al., 1998, Torner et al., 2004).

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

Con respecto al hipotálamo, se ha descrito la expresión del RNA mensajero y la proteína del receptor largo de la PRL en los núcleos SO y PV. Esta localización se correlaciona funcionalmente con los efectos de esta hormona sobre la secreción de la OXT y VP por el sistema hipotálamo-neurohipofisario (Chiu et al., 1992, Grattan et al., 2001, Mejía et al., 2003), las acciones sobre la integración de las respuestas neuroendocrinas y conductuales al estrés (Neumann et al., 1998, Lightman, 1992, Grattan et al., 2001, Torner et al., 2001, 2004), y el incremento en la ingesta de agua (Moore et al., 1984, Sauvé et al., 1996, Grattan et al., 2001). También se ha detectado al receptor de PRL en el núcleo ventromedial (NVM) (Pi XJ et al., 1999) y en el núcleo preóptico medio (Pi XJ et al., 1999), donde se propone que tienen lugar las acciones de la PRL en la regulación de la conducta maternal (Grattan et al., 2001). Además, se ha descrito al receptor en el núcleo arcuato (NARC) donde la PRL tiene sus acciones sobre las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) del NARC estimulando la producción de dopamina (Pi XJ et al., 1999) y es importante señalar que la expresión del receptor de PRL en el NVM no cambia durante la gestación pero si en la lactancia (Bridges et al., 1997, Pi XJ et al., 1999).

También se ha descrito la presencia de RNAm del receptor de PRL y de la proteína en otras áreas del SNC 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 et al., 1998, Bakowska et al., 1997)

Esta distribución amplia del receptor de PRL probablemente refleja la complejidad de las acciones de esta hormona, si bien el nivel de expresión es bajo en muchas de estas regiones y podría no tener una relevancia funcional significativa.

c. Producción local

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

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

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

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

En la actualidad se acepta que la producción de PRL es mayor en el hipotálamo, particularmente en los núcleos hipotalámicos ARC, VM, PV, SO y que las proyecciones neuronales que contienen PRL tienen una distribución amplia, que incluye al tálamo, la amígdala, el hipocampo y el caudado (Freeman et al., 2000).

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

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

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

II. NO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

a. Generalidades del NO

El óxido nítrico (NO) es un radical libre, que se ha establecido como uno de los principales mediadores en la interacción célula-célula. En células de mamíferos 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 tercera isoforma contrasta con éstas dos, ya que normalmente no se expresa en condiciones basales y es inducida por ciertas citocinas y 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 calmodulina, la isoforma inducible es poco sensible a calcio y su actividad sólo depende de que se exprese su RNAm y este se traduzca a proteína.

Este grupo de enzimas para generar NO 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 más neurotransmisores (Ignarro, 1992)

b. Funciones

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 esta dada por sus efectos fisiológicos en las neuronas, en la glia 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 de la corteza durante el desarrollo (Dawson, 1996). El NO puede inhibir reversiblemente el crecimiento de neuritas del ganglio de la raíz dorsal. Este radical libre parece estar activo en las fases tempranas de diferenciación celular. Además, se ha demostrado que el NO es un mediador del dolor ya que inhibidores de NOS disminuyen la termohiperalgnesia.

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).

Por otra parte, se ha demostrado que las células colinérgicas del tegmento laterodorsal y del núcleo pontino de la protuberancia, están involucradas en la generación y el mantenimiento de la fase de sueño humor o sueño "paradójico". Estas células producen NO, durante esta etapa del sueño, por lo que se ha planteado que la activación de las NOS interviene en la generación de este estado. En efecto, la inhibición de la síntesis de NO en esta región disminuye la duración del sueño paradójico (Leonard & Lydic, 1997, y la administración de sustancias donadoras de NO lo aumenta (Datta et al., 1996).

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

El NPV es un sitio importante de regulación de NO. Algunos de sus efectos se asocian directamente con la activación del eje hipotálamo hipófisis adrenal (HPA) en respuesta a cambios en la circulación cerebral y en parámetros cardiovasculares como es la disminución de la presión sanguínea. Además se ha observado un aumento en la producción de NO en estructuras como la amígdala y el hipocampo por influencia de la activación del eje HPA (Seo y Rivier, 2001).

Por otra parte, se ha demostrado que el NO producido puede regular la activación del sistema hipotálamo-neurohipofisario. Por ejemplo, se sabe que en respuesta a la hidratación aumenta el NO en el NPV, y que este aumento inhibe la secreción basal de VP y OXT (Liu et al., 1997), además en condiciones de deshidratación el NO inhibe de manera preferencial la secreción de OXT (Ueta et al., 1998).

Se sabe poco acerca de las NOS que participan en la producción del NO responsable de la regulación de las hormonas neurohipofisarias. La expresión del RNAm de la nNOS aumenta en las neuronas magnocelulares del NPV y NSO después de la ingestión crónica de una sobrecarga de NaCl (Kadowaki et al., 1994). Si bien no se ha investigado el efecto de esta estimulación sobre la expresión de las otras isoformas de la NOS, se piensa que el NO liberado por el aumento en la sal modula la secreción de VP que resulta de dicha estimulación hiperosmótica (Leng et al., 1999). Esta conclusión deriva de la observación de que donadores de NO administrados *icv* inhiben la actividad eléctrica de neuronas en

el NPV y en el NSO del hipotálamo, debida a la liberación de GABA (Stern y Ludwing, et al., 2001). Además, bloqueadores de NO resultan en un aumento en la VP y OXT circulantes en respuesta a la mayor ingestión de sal. Se propone que este efecto del NO podría ser importante para ayudar a conservar las reservas de VP y OXT durante periodos en los que habría una gran demanda de estas hormonas (Surisawat et al., 2004).

Sin embargo en situaciones como la preñez hay una inhibición de este mecanismo. En ratas embarazadas la ingestión de una sobrecarga de sal no provoca una modificación en la expresión del RNAm de nNOS posiblemente con la finalidad de que el sistema sea más excitable al término de esta condición de manera que haya una mayor capacidad para la liberación de OXT durante el parto (Srisawat et al., 2000).

La liberación de hormonas neurohipofisarias es modificada también por estímulos no osmóticos tales como la hemorragia y la hipovolemia, donde disminuye el volumen de los compartimientos intracelulares e intravasculares. Al respecto, se encontró que en la hipovolemia aumenta la expresión de la nNOS en NPV y NSO así como la actividad de las NOS en las neuronas magnocelulares y en las parvocelulares de ambos núcleos (Ueta et al., 1997).

III. NO Y PRL

Se sabe que tanto la PRL como su fragmento hormonal de 16 Kda (PRL-16K) regulan la producción de NO a través de acciones sobre las NOS inducible y constitutivas. La PRL inhibe la expresión de la iNOS inducida por citocinas proinflamatorias en fibroblastos de pulmón (Corbacho et al., 2003). Esta acción llevo a proponer que la PRL podría ejercer efectos antiinflamatorios. Por otra parte, la PRL puede ser procesada hacia PRL-16K por enzimas presentes en diversos tejidos, que incluyen a las metaloproteasas de matriz (Macotela, 2005), y

la PRL-16K inhibe la activación de la eNOS (Gonzalez et al., 2004). Las implicaciones de este efecto pueden ser también inhibitorias de procesos inflamatorios, ya que el NO producido por la eNOS en el endotelio vascular promueve la vasorrelajación, la vasopermeabilidad e inhibe la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio vascular (Eiserich et al., 1998).

Las acciones inhibitorias de las PRLs sobre las NOS podrían ser de relevancia para la secreción del sistema hipotálamo-neurohipofisiario, dado que de acuerdo a la información discutida anteriormente el NO restringe dicha secreción y las PRLs la estimulan. El tratamiento de explantes hipotálamo-neurohipofisarios con PRL y PRL 16K estimula la secreción de VP (Mejía et al, 2003) y de OXT (Gosh y Sladek, 1995). Los receptores a PRL se han localizado en las neuronas magnocelulares de ambos núcleos (Mejia et al., 2003) y dichas neuronas expresan el RNAm de PRL y procesan a la proteína hacia un fragmento de 14 kDa que comparte actividades biológicas con la PRL-16K (González et al., 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La PRL inhibe la producción de NO a través de acciones sobre las sintasas de NO inducible y la constitutiva del tipo endotelial. Se desconoce si la PRL regula a la sintasa neural de NO (nNOS) que también es de naturaleza constitutiva. Dado que las NOS parecen participar en funciones a las que también se han asociado a la PRL, como es la regulación de la secreción de las neurohormonas VP y OXT, en este proyecto investigamos si la PRL puede inhibir la producción de NO en el hipotálamo.

Dado que las acciones de la PRL sobre la producción de NO pueden ser inhibitorias, utilizamos el modelo experimental de la sobrecarga de NaCl en la rata, donde se estimula la producción de NO en el NPV.

HIPÓTESIS

La PRL inhibe la producción de NO en hipotálamo.

OBJETIVO:

Evaluamos el efecto de la administración intracerebroventricular de la PRL sobre la producción de NO en el hipotálamo estimulada por una sobrecarga de sal.

METAS:

1. Establecimos la siguiente metodología:
 - a. Administración esterotáxica de PRL en los ventrículos laterales de ratas macho.
 - b. Evaluación de la concentración de NO en extractos hipotalámicos mediante el método de citrulina radioactiva.
 - c. Localización inmunohistoquímica de la producción de NO en el NPV.
 - d. Determinación de la sobrecarga de NaCl para incrementar el NO en el hipotálamo y en el NPV.
2. Determinamos si la sobrecarga de sal incrementa la producción de NO en el hipotálamo y en el NPV, así como los niveles de iNOS en el NPV y de las NOS (iNOS, eNOS y nNOS) en el hipotálamo.
3. Determinamos si la administración intracerebroventricular de PRL modifica la producción de NO inducida en el hipotálamo por una sobrecarga de sal.

MATERIALES Y MÉTODOS

a. **Animales.** Se utilizaron ratas Wistar macho adultas de aproximadamente 250g de peso corporal. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y de luz-oscuridad libre acceso al agua y al alimento.

b. **Sobrecarga de NaCl.** Para estimular la producción de NO en el hipotálamo se utilizó como estímulo un aumento en la concentración de NaCl 2% en el agua de beber por un período de 4 días. Este procedimiento estimula la producción de NO en el hipotálamo incluidos los núcleos PV y SO y en la neurohipófisis (Kadekoro y Sumí-long, 2000).

Todos los animales fueron manipulados durante al menos 4 días para tratar de mimetizar la maniobra experimental a que fueron sometidos el día del experimento.

c. **Implantación esterotáxica de la cánula guía.** La cánula guía se implantó estereotáxicamente bajo anestesia (pentobarbital 0.1 mg/g de peso corporal). Las cánulas se prepararon con agujas de acero (0.7 x 30 mm) romas colocadas en el sitio que corresponde al ventrículo lateral derecho [coordenadas: antero posterior -0.4, lateral -1.4 y dorsoventral -3.4; con un ángulo de inclinación de 1° (Paxinos, 1986)] y aseguradas con cemento acrílico mediante un tornillo lateral insertado en el hueso del cráneo. Los experimentos se realizaron 7 días después de la cirugía y en este periodo de recuperación los animales fueron manipulados diariamente mimetizando el proceso de inyección en el gorro de acrílico que sujeta a la cánula guía.

d. **Microinyección.** Los microinyectores fueron contruidos con agujas 2 mm más largos que la cánula guía. Todas las inyecciones son unilaterales. Para el grupo control se inyectaron 2 μ l de vehículo (amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4); mientras que para el grupo tratado se inyectaron 2 μ l de PRL (300 ng/24

horas) durante los tres últimos días del periodo en que se administró la sobrecarga de sal y los animales se sacrificaron 24 horas después de la última inyección. En ambos casos la inyección fue bajo un flujo de 1 µl/min.

e. Método de la citrulina radioactiva

La concentración de NO fue evaluada en extractos hipotalámicos mediante el método de citrulina radioactiva (Bredt DS, & Zinder SH, 1990). Dicho método es altamente sensible y específico. Este método se basa en la transformación bioquímica de L-arginina a NO por las sintetasas de NO y es una reacción que involucra la oxidación de 5 e⁻ del grupo guanidino de la L-arginina para generar NO y L-citrulina en una relación estequiométrica equimolar.

Para este método los animales previamente manipulados durante 4 días, fueron sacrificados mediante una exposición a una atmósfera saturada de CO₂. Inmediatamente después los animales fueron decapitados y los hipotálamos extraídos y congelados para su posterior procesamiento.

Los hipotálamos fueron homogenizados en 150 µl de buffer de extracción (sacarosa 320 mM, Hepes 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, 2 µl/ml, y 10 mg/ml de PMFS y de aprotinina; pH 7.2) y centrifugados durante 5 minutos a 4°C a 1000 rpm. Veinticinco µl del sobrenadante se combinaron con 100 µl del buffer de ensayo (Hepes 50 mM, NADPH 1 mM, CaCl₂ 1.25 mM, DTT 1 mM, FAD 1mM y calmodulina 10 mg/ml; pH 7.4) y se les adicionó 0.5 µl de ³H-L-arginina (Perkin Elmer Life Sciences, Inc, Boston MA). La reacción se detuvo con HEPES 20 mM y EDTA 2 mM pH 5.5 y las muestras colocadas en columnas de intercambio iónico de tipo catiónico (Dowex AG50WX8) para separar la citrulina radioactiva, utilizamos el amortiguador HEPES-EDTA pH 5.5. esta separación ocurre debido a que al pH 5.5 la L-arginina tritiada está cargada positivamente y puede interaccionar con las cargas negativas presentes en la columna y por tanto queda retenida en ella; en cambio a este pH la L-citrulina tritiada tiene una carga neutra lo que le permite eluir por la columna sin ningún impedimento y ser colectada en

un vial que contenga líquido de centelleo para cuantificar el tritio unido a citrulina en un contador de emisiones β (LS 6500 BECKMAN).

f. Tinción de NADPH-Diaforasa

La localización de la producción de NO en el NPV se determinó por la tinción de NADPH-diaforasa que es una actividad característica de las NOS (Hope et al., 1991). En este método las enzimas que poseen actividad diaforasa catalizan la deshidrogenación del NADPH reduciéndose el colorante azul de nitrotetrazolio y formándose un precipitado de color azul marino.

Para la metodología de NADPH-diaforasa, los animales fueron anestesiados mediante una exposición a una atmósfera saturada de CO₂ y posteriormente perfundidos a través de la aorta descendente con 250 ml de solución salina al 9% y 250 ml de paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron removidos, post-fijados en una solución de paraformaldehído al 4% durante 24 horas y crioprotejidos en una solución saturada de sacarosa (30 grs/100ml de PBS). Después de 24 horas, los cerebros fueron seccionados coronalmente de acuerdo a las coordenadas: -1.4 mm hasta -2.12 mm partir de bregma (Paxinos y col., 1986). Se obtuvieron 10 cortes de 30 μ de cada cerebro que se flotaron en PBS.

Los cortes se enjuagaron 3 veces por 10 minutos con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 adicionado con 0.03% de Tritón X-100 . Posteriormente, los cortes se incubaron a 37° C durante 60 minutos bajo agitación constante en una solución que contiene 1 mg/ml de NADPH y 0.3 mg/ml de azul de nitrotetrazolio (NBT) en amortiguador de fosfatos. Al finalizar el tiempo de reacción se añadió amortiguador frío y se enjuagaron los cortes con agua destilada, para después montarlos en portaobjetos gelatinizados y cubrirlos con permount y cubreobjetos hasta su observación al microscopio.

g. Inmunocitoquímica para iNOS, eNOS y nNOS

Los animales fueron tratados como se indicó en la metodología anterior para obtener los cerebros que fueron seleccionados en 10 cortes coronales de 30 micras y flotados en amortiguador de fosfatos (PBS) e incubados a temperatura ambiente en una solución de 1% de H₂O₂ por 15 minutos. Los cortes se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBS y se bloquearon con 5% Tritón X-100, 1% albúmina sérica bovina y 1% suero normal de cabra en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se incubaron con anticuerpos contra las diferentes NOS a una dilución de 1:500 durante toda la noche y después de varios lavados en PBS fueron incubados en la solución del segundo anticuerpo biotinilado para posteriormente incubarlos con solución de peroxidasa biotinilada acoplada a avidina (ABC) por 2 horas. Los cortes se sumergieron en la solución de revelado (stock KIT Vector SK 41000) hasta tornarse cafés, la reacción se detuvo con PBS frío y los cortes se montaron en laminillas para ser observados al microscopio.

h. Western blots

Los homogenados de hipotálamo fueron procesados por electroforesis en geles de poliacrílamida al 7.5% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras. Los geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa en amortiguador de transferencia (0.25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% de Metanol) a 25 V por 35 minutos. Las membranas se bloquearon con 2% de albúmina sérica bovina y Tween-20 al 0.05% en PBS durante 1 hora y posteriormente se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpos primarios policlonales anti-iNOS, anti-eNOS o anti-nNOS. Los blots se lavaron 3 veces con 0.9% de NaCl y 0.05% Tween-20 en PBS durante 5 minutos y se incubaron con segundos anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina por una hora. Finalmente, la reacción con los anticuerpos se reveló utilizando un sustrato de fosfatasa alcalina y un estuche comercial (kit Bio-Rad, Hercules, CA. USA).

RESULTADOS

Primeramente, se implementaron los métodos para determinar NO (citrulina radioactiva y diaforasa) y las técnicas para determinar a las NOS (inmunohistoquímica y Western blot). Establecimos el modelo experimental de la sobrecarga de NaCl para estimular la producción de NO y con este modelo validamos las técnicas mencionadas y su pertinencia en el análisis de la regulación de la producción del NO en el hipotálamo y en el NPV. Finalmente, implantamos el método de la administración estereotáxica de PRL en ventrículos laterales.

a. Efecto de la sobrecarga de NaCl sobre la producción de NO en el hipotálamo.

Para aumentar la carga de NaCl y con ello la osmolaridad de los fluidos corporales capaz de estimular la producción de NO en el hipotálamo (Kodowaki et al., 1994), se adicionó NaCl al 2% en los bebederos durante los cuatro días anteriores al sacrificio. La sobrecarga de sal tuvo el efecto dipsogénico esperado (Kodowaki et al., 1994), ya que los animales bebieron dos veces más agua que el grupo testigo (Fig. 1).

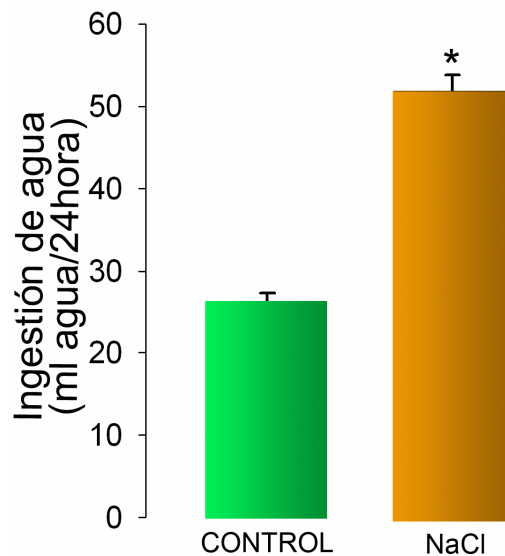


Figura 1. Medición del consumo de agua en ml de animales sometidos o no a una sobrecarga de NaCl al 2% en el agua de beber. *P<0.05 vs Control.

Dado que el estrés puede estimular la producción de NO en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario, fue necesario manipular a los animales diariamente, mimetizando el procedimiento a utilizar para su sacrificio, para minimizar una posible condición estresante. El sacrificio se realizó en el mismo cuarto del bioterio a través de introducir con todo cuidado al animal en una cámara saturada de CO₂, y una vez anestesiado se le sacó del cuarto para su sacrificio por decapitación. Bajo estas condiciones y con el método de la citrulina radioactiva se lograron observar niveles estables de NO en hipotálamos del grupo testigo, que probablemente reflejan una baja o inexistente respuesta al estrés (Fig. 2). En contraposición, los animales sometidos a una sobrecarga de NaCl incrementaron los niveles hipotalámicos de NO más de dos veces y este efecto fue significativo ($p < 0.05$) (Fig. 2).

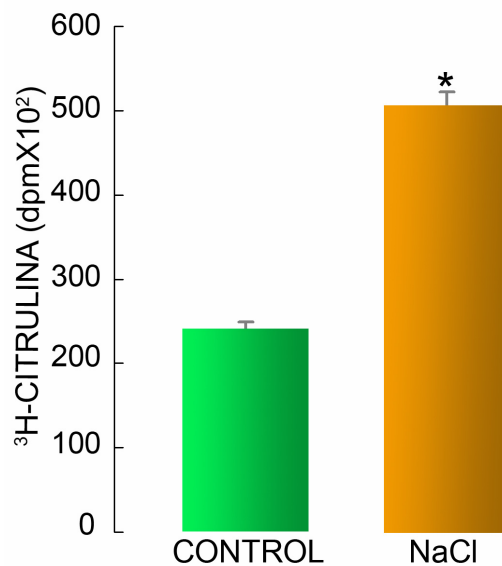


Figura 2. Determinación de la producción de NO en 100µg de proteína total obtenida de extractos de hipotálamos aislados de ratas macho en ausencia (Control) o presencia de 2% de NaCl en el agua de beber por un periodo de cuatro días. El NO se determinó mediante el método [3H]-citrulina. Los valores son promedios ±EE de cuatro animales. * $p < 0.05$ vs control.

b. Efecto de la sobrecarga de NaCl sobre la producción de NO en el NPV.

En forma consistente con la posibilidad de que parte del aumento en NO observado en el hipotálamo se localice en el NPV, la técnica de NADPH-diaforasa mostró un aumento en la tinción del NVP en los animales que recibieron un exceso de sal en el agua de beber (Fig. 3A). Este aumento se observó en los cuatro animales tratados y fue cuantificado a través del número de las neuronas positivas en el NPV (Fig. 3B), diferencia que fue significativa cuando se analizaron los promedios de este grupo con respecto al control, no tratado (Fig. 3C).

Por lo tanto, podemos concluir que confirmamos el que la sobrecarga de NaCl produce un aumento en el NO hipotalámico y que parte de este aumento se localiza en el NPV de acuerdo a lo reportado en la literatura (Kadekaro et al., 1997). Por lo que nuestro modelo y metodología son adecuados para valorar la regulación del NO en el hipotálamo.

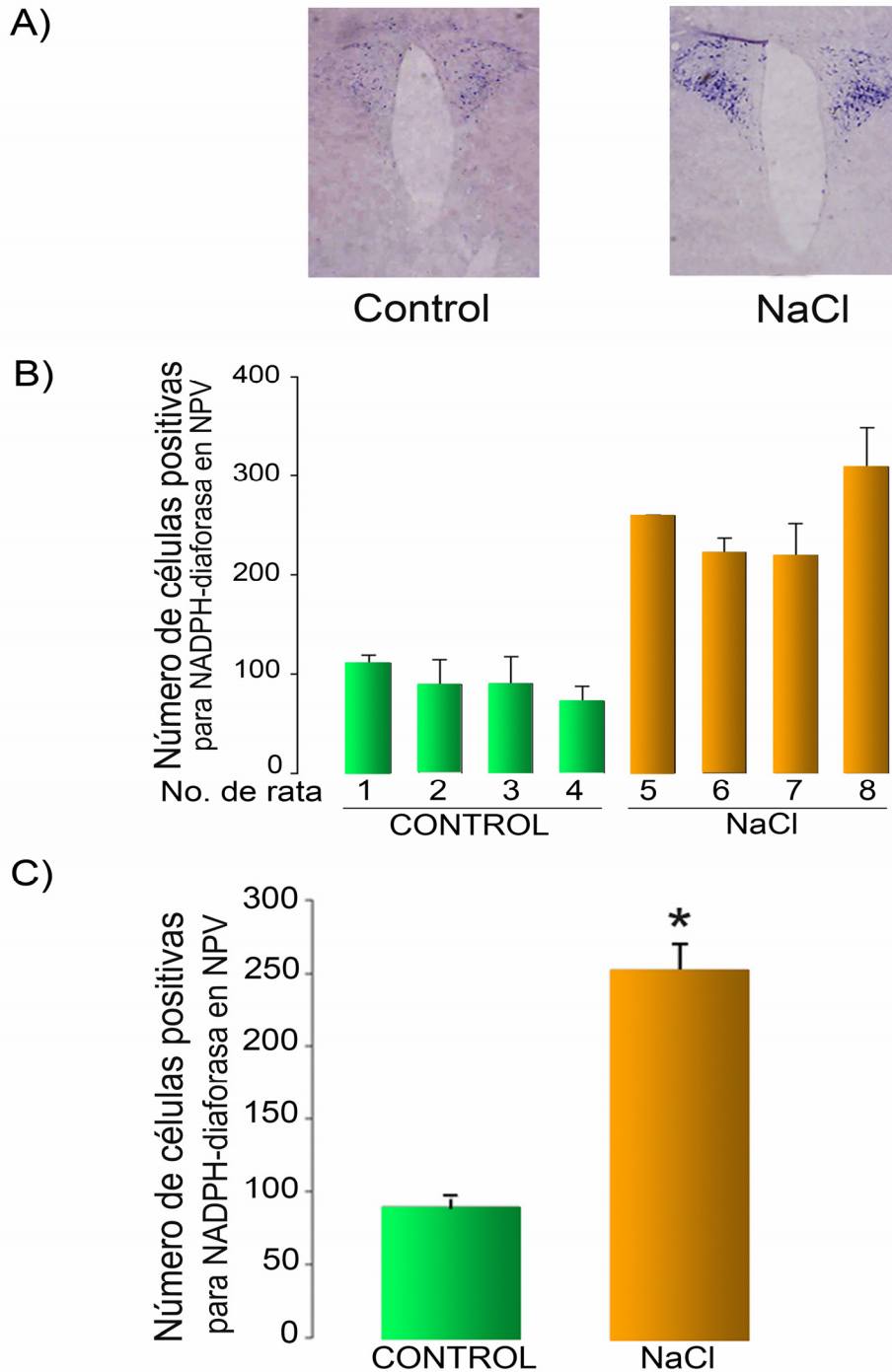


Figura 3. Localización de la producción de NO en el hipotálamo evaluada por el método de NADPH-diaforasa que revela la actividad de las sintetasas de NO. (A) Secciones representativas de cortes coronales de cerebros que muestran el NPV de animales en ausencia (Control) o presencia (NaCl) de 2% de NaCl en el agua de beber. (B) Cuantificación del número de células positivas para diaforasa en el NPV de 4 animales sometidos o no al aumento en NaCl. Los resultados son promedios \pm EE de varias secciones del NPV. (C) Promedios \pm EE de los valores registrados en los 4 animales de cada grupo. * $p < 0.05$ vs control.

c. Efecto de la sobrecarga de NaCl sobre la concentración de iNOS en el hipotálamo.

Para determinar cual de las NOS podría ser activada en el hipotálamo en respuesta a la sobrecarga de sal, determinamos mediante western blots los niveles de las isoformas en extractos hipotalámicos. La figura 4 muestra la presencia de proteínas inmunorreactivas para iNOS (Fig. 4A), eNOS (B) y nNOS (C) en extractos hipotalámicos de ratas sometidas o no al aumento de sal en el agua de beber. Mientras que para eNOS y para nNOS no se observaron diferencias entre los diferentes grupos experimentales, la sobrecarga de sal aumento la concentración hipotalámica de iNOS.

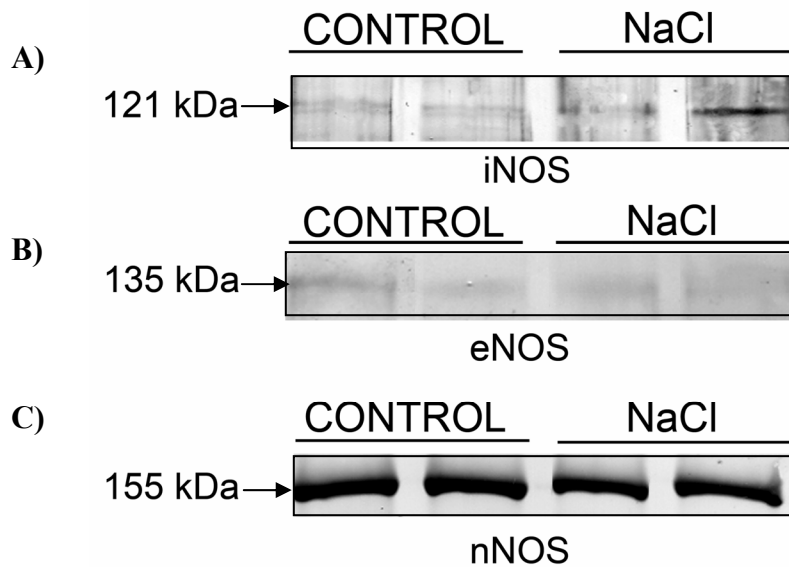


Figura 4. Determinación de iNOS (A), eNOS (B) y nNOS (C) en western blot de homogenados de hipotálamo de animales que recibieron (NaCl) o no (Control) 2% de NaCl en el agua de beber. Se indican las masas moleculares en kDa. Los resultados corresponden a dos homogenados independientes de cada grupo.

d. Efecto de la sobrecarga de NaCl sobre la concentración de iNOS en el NPV.

Para analizar la activación de la iNOS por el estímulo hiperosmótico y la localización de dicho efecto en el NPV, llevamos a cabo el análisis por inmunohistoquímica de la concentración de iNOS en el NPV. Los resultados en un solo animal mostraron un aumento en el número de células positivas a iNOS después del aumento en NaCl sistémico (Fig. 5A y B). Si bien estos resultados son preliminares y deben extenderse a un mayor número animales, son claramente confirmatorios de la mayor expresión de iNOS y de su participación en la producción en el hipotálamo y en el NPV de NO en respuesta al NaCl.

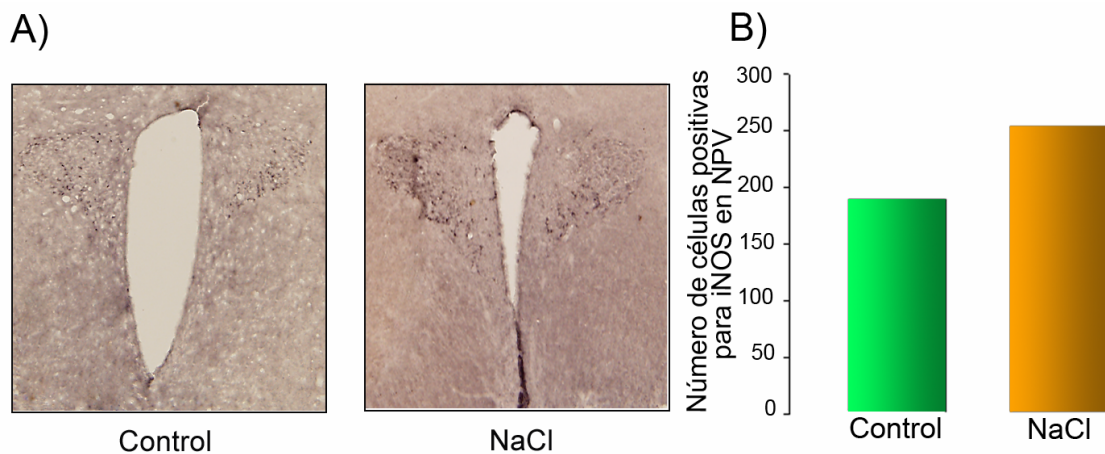


Figura 5. Inmunohistoquímica para iNOS de animales que ingirieron (NaCl) o no (Control) 2% de NaCl en el agua de beber. (A) secciones que ilustran la marca para iNOS en el NPV. (B) Cuantificación del número de células positivas para iNOS en el NPV de un solo animal.

e. Efecto de la PRL sobre la producción de NO en el hipotálamo inducida por una sobrecarga de NaCl.

La correcta implantación estereotáxica en el ventrículo lateral se muestra en cortes de cerebro donde se administró de azul de pontamina a través de la cánula implantada y se observa una coloración azul en los ventrículos laterales y en el tercer ventrículo (Fig. 6). La administración icv de PRL produjo una disminución significativa en la producción de NO en el hipotálamo de animales sometidos a una sobrecarga de NaCl, pero no la modificó en el grupo control (Fig. 7).

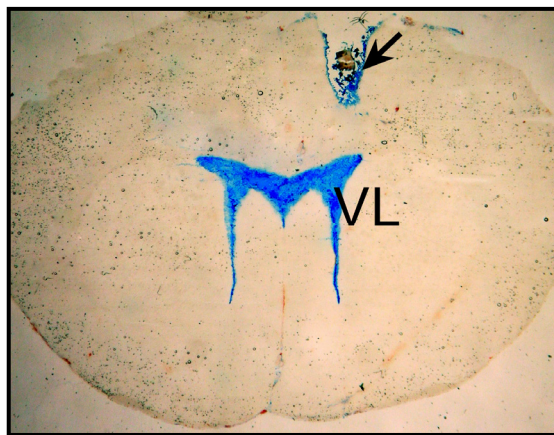


Figura 6. Sección representativa de un corte coronal que ilustra la correcta implantación de la cánula en el ventrículo lateral derecho (icv), la flecha indica el rastro de la cánula guía.

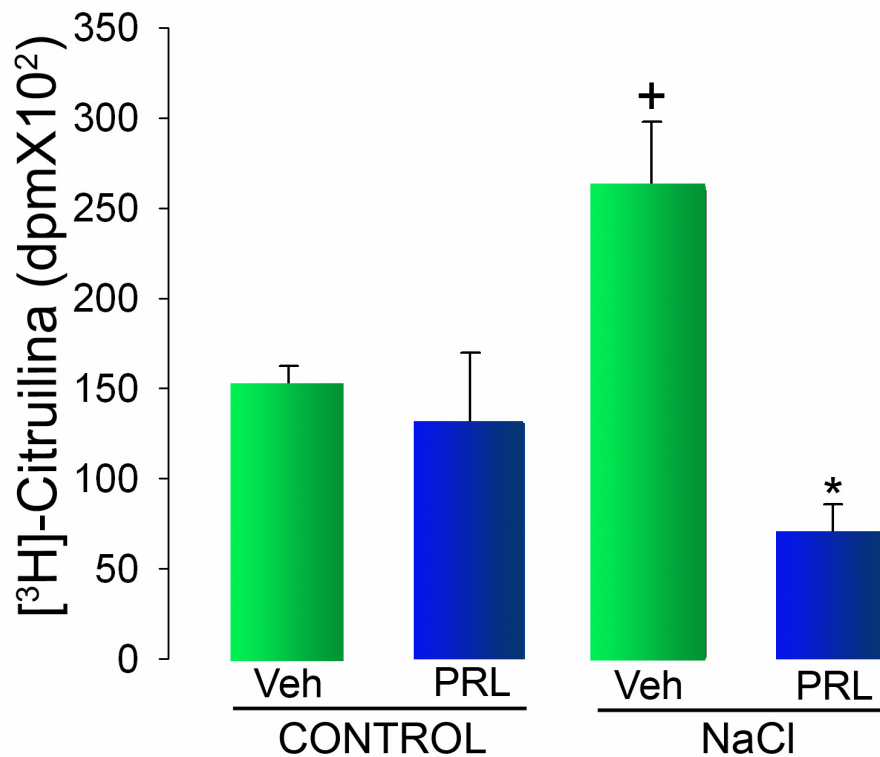


Figura 7. Efecto de la administración icv de PRL sobre la producción de NO en el hipotálamo (100µg de proteína total) de animales sometidos (NaCl) o no (Control) a un aumento en el consumo de NaCl. ⁺p<0.05 vs grupo control y ^{*}p<0.05 vs NaCl sin PRL y control sin PRL. Los valores son promedios ±EE de seis animales.

f. Efecto de la PRL sobre la concentración de iNOS en el hipotálamo

Mediante el análisis por western blots de proteínas inmunorreactivas para el anti iNOS, nNOS y eNOS en extractos hipotalámicos de animales sometidos o no a una sobrecarga de sal se encontró que la enzima del tipo inducible se ve disminuida por acción de la PRL (Fig. 8A), mientras que las enzimas constitutivas eNOS y nNOS no se vieron modificadas (Fig. 8B y C).

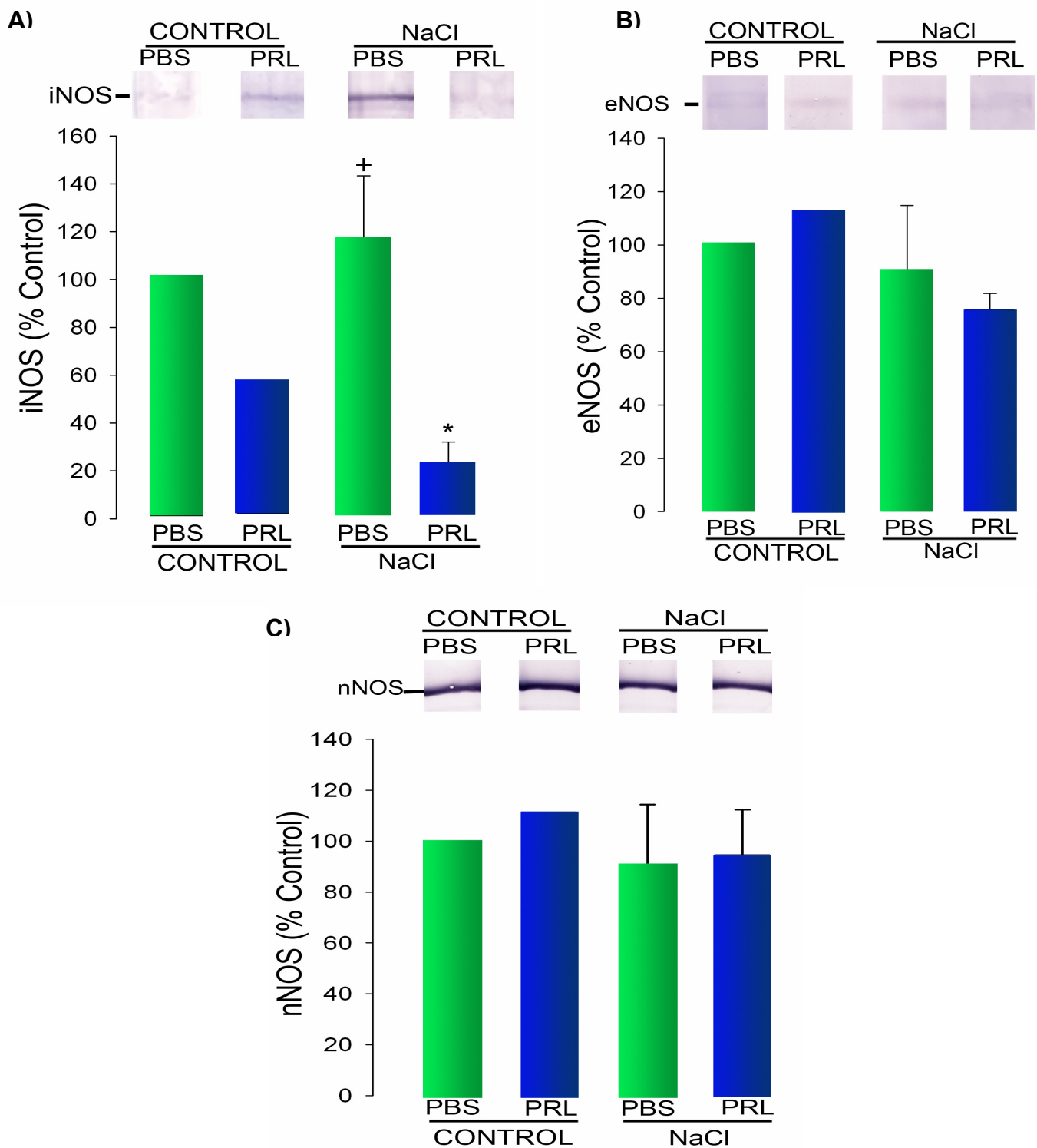


Figura 7. Efecto de la administración icv de PRL sobre los niveles de iNOS (A), eNOS (B) y nNOS (C) de animales control y sometidos a NaCl en el agua de beber (NaCl). Se muestran los Western blots representativos de los cuatro grupos experimentales y el análisis densitométrico de los niveles de las respectivas NOS como \pm EE de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs NaCl sin PRL y control con PRL.

DISCUSIÓN

Desde hace tiempo se sabe que el sistema nervioso central es blanco de las acciones de la PRL y que uno de los efectos centrales de esta hormona es la estimulación de la secreción de los neuropéptidos VP Y OXT por el sistema hipotálamo-neurohipofisiario. Al respecto, se conoce que la PRL estimula la liberación de ambas neurohormonas al medio de incubación de explantes hipotálamo-neurohipofisiarios (Gosh y Sladek, 1995, Mejia et al., 2003), y se ha demostrado que la PRL incrementa los niveles circulantes de OXT (Parker et al., 1991). Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares que median estos efectos. En esta tesis demostramos que la PRL regula negativamente la producción de NO en el hipotálamo. Dado que el NO puede inhibir la secreción de la VP y de la OXT por el sistema hipotálamo-neurohipofisiario, proponemos que el efecto inhibitorio de la PRL sobre la producción hipotalámica de NO podría ser parte del mecanismo por el cual esta hormona estimula la secreción de las hormonas neurohipofisiarias.

En este estudio utilizamos la sobrecarga de sal en el agua de beber como modelo experimental para inducir la activación de las NOS en la rata. En este modelo ocurre un aumento gradual de la osmolaridad y de la concentración de Na^+ en plasma que actúan como un fuerte estímulo para la secreción de VP y OXT por el sistema hipotálamo-neurohipofisiario (Jones et al., 1969, Ventura et al., 2005). Nosotros corroboramos que la sobrecarga de sal que utilizamos en el agua de beber es un buen estímulo hiperosmótico ya que produjo el efecto dipsogénico esperado (Kadowaki et al., 1994) y estos animales bebieron dos veces más agua que el grupo control. Es importante señalar que los animales fueron manipulados diariamente para intentar simular lo más posible la maniobra experimental del día del sacrificio. Esto permitió minimizar el nivel de estrés asociado al manejo experimental de los animales y evitar condiciones estresantes que se sabe pueden estimular la producción de NO y oscurecer el efecto de la sobrecarga de sal (Shirakawa et al., 2004).

Bajo estas condiciones, observamos que la sobrecarga de sal incrementó más de dos veces la producción hipotalámica de NO sobre el nivel basal de los animales no expuestos al estímulo hiperosmótico. Este incremento fue similar a lo reportado previamente (Ventura et al., 2005). Una vez que determinamos mediante el método de citrulina radioactiva, que la actividad de las NOS se incrementa en el hipotálamo de los animales sometidos al estímulo hiperosmótico, utilizamos el método histoquímico de la NADH-diaforasa para determinar si parte de este aumento se localiza en el NPV. La actividad de NADPH-diaforasa es característica de las NOS y convencionalmente se acepta como índice de su actividad (Hope et al., 1991). De acuerdo a lo esperado, encontramos un incremento significativo en el NPV del número de neuronas positivas para la tinción de NADPH-diaforasa en respuesta a la sobrecarga de sal y por lo tanto corroboramos que dicho estímulo aumenta la actividad de las NOS en el NPV.

La VP, pero también la OXT tienen acciones directas en la regulación del balance hidromineral de los fluidos. Estas acciones obedecen al efecto antidiurético y natriurético de la VP y la OXT, respectivamente (Fraser et al., 1942). Por lo tanto, desde hace mucho tiempo se sabe que ambas neurohormonas se liberan a la circulación en respuesta a estímulos osmóticos, como la sobrecarga de sal, o a la deshidratación y la hipovolemia, donde disminuye el volumen de los compartimientos intracelulares e intravasculares (Balment et al., 1980, Stricker et al., 1986, Haanwinckel et al., 1995). Evidencias recientes indican que el NO es un mediador fisiológico importante de la homeostasis de los fluidos corporales vía la regulación de la producción y liberación de VP y OXT (Kadekaro et al., 1997). Diversas evidencias muestran que la nNOS se expresa en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario y que la actividad de las NOS se incrementa en las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas de los núcleos PV y SO después de un período de sobrecarga de sal (Ventura et al., 2002) y de deshidratación (Bredt et al., 1990). Más aún, la actividad de las NOS disminuye cuando se reducen los niveles de sodio en la dieta (Ventura et al., 2002). Existe controversia acerca de si el NO estimula o restringe la secreción de ambas neurohormonas. Por ejemplo, se

ha mostrado que donadores de NO, como el nitroprusiato de sodio, administrado centralmente produce un incremento de los niveles plasmáticos de ambas hormonas (Yamaguchi et al., 2000). Sin embargo y en apoyo al posible efecto inhibitorio de NO, se reportó que la administración intracerebroventricular de inhibidores competitivos de las NOS, como el L-NAME, resultan en un aumento de la liberación de OXT y de VP a la circulación (Kadekaro, 2004) y que en condiciones de deshidratación el NO liberado inhibe de manera preferencial la secreción de OXT (Ueta et al., 1997). Además, experimentos hechos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el NO inhibe la actividad de las neuronas vasopresinérgicas y oxitosinérgicas vía la activación sináptica GABAérgica (Stern y Ludwig 2001). En relación a su posible implicación funcional, se ha propuesto que el efecto inhibitorio del NO podría ser importante para ayudar a conservar las reservas de VP y OXT durante periodos en los que habría una gran demanda de estas hormonas (Srisawat et al., 2000, Ventura et al., 2005).

Se sabe poco acerca de las isoformas de las NOS que participan en la producción del NO asociado a la regulación de las hormonas neurohipofisarias. Se ha mostrado que la iNOS se expresa en el NPV, aunque la isoforma mas estudiada es la nNOS (Harada et al., 1999), donde se tiene evidencia de que la expresión de su RNAm aumenta en las neuronas magnocelulares del NPV y NSO después de la ingestión crónica de NaCl (Kadowaki et al., 1994). Sin embargo, no se ha analizado la proteína nNOS, ni el efecto del estímulo hiperosmótico sobre la expresión y actividad de las otras isoformas de la NOS. En este estudio utilizamos western blots para determinar los niveles de las tres NOS hipotalámicas en respuesta a la sobrecarga de sal. Los resultados mostraron un aumento en la concentración de la iNOS en respuesta a la estimulación hiperosmótica, pero no de la eNOS y de la nNOS, cuyos niveles no mostraron diferencias en relación al grupo control. Adicionalmente, en un estudio muy preliminar de un solo animal expuesto a la sobrecarga de sal, observamos un mayor número de neuronas positivas a iNOS en el NPV. Así, parece claro que la expresión de la iNOS en el NPV se estimula en respuesta a la sobrecarga de sal, y que esta isoforma podría

contribuir a la producción hipotalámica de NO involucrada en la regulación de OXT y VP.

Sin embargo, nuestro trabajo no permite descartar la participación de las otras isoformas de las NOS en estos efectos. A diferencia de la iNOS cuya actividad depende de la estimulación de su síntesis, tanto la nNOS como la eNOS son enzimas constitutivas, normalmente presentes en concentraciones suficientes, pero en forma inactiva y cuya activación requiere de eventos postraduccionales como son la fosforilación de sus residuos de serina y su interacción con el complejo calcio-calmodulina (Boo y Jo., 2003). Si bien nuestro trabajo permite concluir que el estímulo hiperosmótico no incrementa los niveles de la nNOS y de la eNOS en el hipotálamo, no podemos saber si la sobrecarga de sal modifica la actividad de estas enzimas. La activación de las NOS constitutivas podría ser analizada mediante el uso de bloqueadores selectivos para cada una de ellas. Además, se podría evaluar el grado de fosforilación de isoformas constitutivas en respuesta al incremento en la sal.

El haber corroborado que la sobrecarga de sal incrementa la producción del NO en el hipotálamo y en el NPV, validó el uso de este modelo experimental para investigar la posible acción de la PRL sobre el NO involucrado en la secreción de la VP y OXT. Al respecto, observamos que la administración intracerebroventricular de PRL produjo una disminución significativa en la producción de NO inducida por el estímulo hiperosmótico, y no modificó la producción de NO en el grupo control. Además, se encontró que la PRL disminuye el aumento en los niveles hipotalámicos de la iNOS inducidos por el estímulo hiperosmótico. Estos resultados apoyan el que la PRL puede actuar como inhibidor de la producción hipotalámica de NO y en particular del NO producido por el sistema hipotálamo-neurohipofisario. Esta acción inhibitoria de la PRL es consistente con resultados reportados en otros tipos celulares donde la PRL y algunos de sus fragmentos moleculares inhiben la producción de NO debida a iNOS y a eNOS (Corbacho et al., 2003, González et al., 2004). Con respecto a la

iNOS, en cultivos de fibroblastos de pulmón, se mostró que la PRL inhibe su síntesis en respuesta a citocinas proinflamatorias (Corbacho et al 2003). El mecanismo de este efecto involucra la vía de señalización clásica de la PRL, que es la de la cinasa Janus-2 (JAK-2) y la subsecuente fosforilación/activación del factor de transcripción “transductor y activador de la transcripción-5b (STAT-5b). STAT-5b inhibe la expresión del factor regulador de interferón-1 (IRF-1), que es un conocido factor de transcripción para iNOS (Corbacho et al., 2003).

Es posible que el efecto inhibitorio de la PRL sobre la expresión de la iNOS ocurra directamente en las neuronas del NPV, ya que se han localizado receptores a PRL tanto en poblaciones vasopresinérgicas (Mejia et al., 2003) como oxitosinérgicas (Grattan, 2001). Además, en apoyo a que la PRL regula la fisiología de este núcleo y del sistema hipotálamo-neurohipofisario en general, se ha mostrado que esta hormona estimula la secreción de VP y OXT *in vitro* sobre explantes hipotálamo-neurohipofisarios (Gosh y Sladek, 1995, Mejia et al., 2003); y en experimentos hechos *in vivo*, que la PRL administrada intracerebroventricularmente aumenta los niveles circulantes de OXT (Parker et al., 1991). Adicionalmente, se ha mostrado que la administración de bromocriptina, un agonista dopaminérgico que inhibe la secreción de PRL, produce una disminución de la expresión del RNAm de OXT y que la administración sistémica de PRL revierte este efecto (Popeski et al., 2003). Dado que el NO puede ser un regulador negativo de la secreción de VP y OXT, la inhibición del NO por la PRL podría ser parte del mecanismo por el cual la PRL regula de manera positiva la secreción fisiológica de ambas hormonas por el sistema hipotálamo-neurohipofisario.

Ahora bien, el mecanismo propuesto de la PRL vía la inhibición de NO, parecería operar en condiciones de reto osmótico o bajo otros estímulos al sistema, pero no bajo condiciones basales. No observamos efecto de PRL sobre el NO o la iNOS hipotalámica en el grupo control de animales no expuestos a la sobrecarga de sal. Sin embargo, la administración de PRL por si sola resulta en un aumento de VP y

OXT (Mejia et al., 2003, Parker et al., 1991). Además, el L-NAME estimula la secreción de dichas neurohormonas en ausencia de otra estimulación, por lo que el NO parece inhibir la secreción basal de VP y OXT (Kadekoro, 2004). Se desconoce cual es la razón de esta discrepancia, pero es posible que en condiciones basales el efecto inhibitorio de la PRL sobre el NO fuera pequeño y/o transitorio, lo que habría impedido su detección con el presente enfoque experimental que valora acciones de la PRL durante un período de 4 días. Al respecto, es interesante especular acerca de si las posibles acciones de la PRL sobre el NO basal y estimulado pudiera involucrar la actividad de diferentes NOS, ya que es bien sabido que las NOS constitutivas median una producción baja de NO (pM-nM), mientras que la iNOS se asocia con niveles mM de este gas (Eiserich et al., 1998). Estas posibilidades deberán ser abordadas en experimentos futuros.

Finalmente, se requiere más información para poder entender las implicaciones funcionales de las acciones de la PRL sobre el NO en el hipotálamo y sobre la secreción de VP y de OXT por el sistema hipotálamo-neurohipofisario. Una posible implicación funcional se ubica en el contexto de la lactancia. La PRL y la OXT son las hormonas determinantes de dicho estadio reproductor. Ambas hormonas son liberadas a la circulación en respuesta a la succión de las crías, y mientras la PRL es responsable de mantener la secreción de la leche, la OXT promueve la evacuación de la leche a lo largo de la lactancia. La acción de la PRL estimuladora de la secreción de OXT podría garantizar la eficiencia de la evacuación láctea durante la lactancia. Por ejemplo, se ha mostrado que en presencia de bromocriptina se reduce la cantidad de OXT liberada por la succión, y que los niveles de esta hormona se recuperan cuando se administra PRL. Por otra parte, la PRL ejerce efectos osmorregulatorios que son particularmente relevantes para la producción de la fase acuosa de la leche durante la lactancia. La glándula mamaria transporta grandes volúmenes de fluido isotónico que son posibles en parte, gracias a acciones directas de la PRL sobre el transporte activo de iones a través de la membrana del epitelio mamario (Shiu y Frueseb, 1980).

También participan acciones que regulan la retención de agua y sodio a nivel renal y que pueden involucrar efectos antidiuréticos y antinatriuréticos de la VP y de la OXT, respectivamente. Sería de gran interés investigar si la secreción de VP y OXT en respuesta a PRL podría influir sobre el manejo de los fluidos corporales y de su concentración iónica durante la lactancia o en condiciones donde dicha homeostasis se viese amenazada.

En conclusión, la presente tesis demuestra que la PRL inhibe la actividad de las NOS en el hipotálamo y en el NPV, y propone que este efecto puede mediar eventos osmorregulatorios vía la estimulación de la secreción de las neurohormonas VP y OXT.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera G. 1994. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol.* 15: 321-350.

Bakowska JC, Morrell JI. 1997. Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *J Comp Neurol.* 22;386(2):161-77.

Balment RJ, Brimble MJ, Forsling ML. 1980. Release of oxytocin induced by salt loading and its influence on renal excretion in the male rat. *J Physiol.* Nov;308:439-49.

Barbanel G, Ixart G, Arancibia S, Assenmacher I. 1986. Probable extrapituitary source of the immunoreactive prolactin measured in the cerebrospinal fluid of unanesthetized rats by push-pull cannulation of the 3rd ventricle. *Neuroendocrinology.* 43(4):476-82.

Ben_Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:6 639-69.

Boo YC, Jo H. 2003. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285(3):C499-508.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 25;347(6295):768-70.

Bodosi B, Obal F Jr, Gardi J, Komlodi J, Fang J, Krueger JM. 2000. An ether stressor increases REM sleep in rats: possible role of prolactin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Nov;279(5):R1590-8.

Boutin JM, Jolicoeru C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. 1998. Clonin and expression of the rat

prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 8;53(1):69-77.

Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE. **1990**. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(20):8003-7.

Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE. **1997**. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology*. 138(2):756-63.

Bridges RS, Grattan DR. **2003**. Prolactin-induced neurogenesis in the maternal brain. *Trends Endocrinol Metab*. 14(5):199-201.

Chiu S, Koos RD, Wise PM. **1992**. Detection of prolactin receptor (PRL-R) mRNA in the rat hypothalamus and pituitary gland. *Endocrinology* 130(3):1747-9.

Clapp C, Torner L, Gutierrez_Ospina G, Alcantara E, López_Gomez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejía S, Morales MA, Martínez de la Escalera G. **1994**. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:22 10384-8

Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martinez De La Escalera G, Freeman BA, Clapp C. **2000**. Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem*. May 5;275(18):13183-6.

Corbacho A, Macotela Y, Nava G, Jason P. Eiserich, Carroll E. Cross, Gonzalo Martínez de la Escalera, Clapp C **2003**. Cytokine induction of prolactin

receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett.* 5;544(1-3):171-5.

DeVito WJ, Connors JM, Hedge GA. **1987**. Immunoreactive prolactin in the rat hypothalamus: in vitro release and subcellular localization. *Neuroendocrinology.* 46(2):155-61.

DeVito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C. **1992**. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 130(5):2549-56.

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

Emanuele NV, Metcalfe L, Lubrano T, Rubinstein H, Kirsteins L, Lawrence AM. **1987**. Subcellular distribution of hypothalamic prolactin-like immunoreactivity. *Brain Res.* 407(2):223-9.

Emanuele NV, Jurgens JK, Halloran MM, Tentler JJ, Lawrence AM, Kelley MR. **1992**. The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol Endocrinol.* 6(1):35-42.

Fraser AM. **1942**. The action of the oxytocic hormone of the pituitary gland on urine secretion. *J Physiol.* Aug 18;101(2):236-251.

Fujikawa T, Soya H, Yoshizato H, Sakaguchi K, Doh-Ura K, Tanaka M, Nakashima K. **1995**. Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus. *Endocrinology* . 12:5608 –13.

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

Ghosh R, Sladek CD. **1995**. Prolactin modulates oxytocin mRNA during lactation by its action on the hypothalamo-neurohypophyseal axis. *Brain Res.* 672(1-2):24-8.

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

González C, Corbacho AM, Eiserich JP, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Diaz-Munoz 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.

Haanwinckel MA, Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. **1995.** Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15;92(17):7902-06.

Harada S, Imaki T, Chikada N, Naruse M, Demura H. **1999.** Distinct distribution and time-course changes in neuronal nitric oxide synthase and inducible NOS in the paraventricular nucleus following lipopolysaccharide injection. *Brain Res.* 13;821(2):322-32

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

Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. **1991.** Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;88(7):2811-4.

Ignarro LJ. **1992.** Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans.* 20(2), 465-469.

Jones CW, Pickering BT. **1969**. Comparison of the effects of water deprivation and sodium chloride inhibition on the hormone content of the neurohypophysis of the rat. *J Physiol*. 203(2):449-58.

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.

Kadekaro M., **2004**. Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37: 441-450.

Kadowaki K., Kishimoto J., Leng G y Piers C. **1994**. Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-Hypophysial system after chronic salt loading: evidence of neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology*, Vol. 134 No., 3; 1011-1017.

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

Lightman SL. **1992**. Alterations in hypothalamic-pituitary responsiveness during lactation. *Ann N Y Acad Sci*. Jun 12;652:340-6.

López-Figueroa M, Day E. W., Lee s., Rivier C., Akil H. **2000**. Temporal and anatomical distribution of nitric oxide synthase mRNA expresión and nitric oxide production during central nervous system inflammation. *Brain Research* 239-246.

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.

Mangurian LP, Walsh RJ, Posner BI. **1992**. Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology*. 131(2):698-702.

Mejía S, Morales MA, Zetina ME, Martínez de la Escalera G, Clapp C. **1997**. Immunoreactive prolactin forms colocalize with vasopressin in neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology* 3:151-9.

Mejía S, Torner LM, Jeziorski MC, González C, Morales MA, de la Escalera GM, Clapp C. **2003**. Prolactin and 16K prolactin stimulate release of vasopressin by a direct effect on hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrine* 1-2 155-62.

Milenkovic L, D'Angelo G, Kelly PA, Weiner RI. **1994**. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;91(4):1244-7.

Moore BJ, Gerardo-Gettens T, Horwitz BA, Stern JS. **1986**. Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res Bull*. 17(4):563-9.

Nagano M, Kelly PA. **1994**. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem*. 6;269 (18):13337-45.

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(5):503-10.

Paxinos, G & Watson, C. **1997**. *The rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.

Pi XJ, Grattan DR. 1998. Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J Comp Neurol.* 18;394(4):462-74.

Pi XJ, Grattan DR. 1998. Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 15;59(1):1-12.

Pi XJ, Grattan Dr. 1999. Expression of prolactin receptor mRNA is increased in the preoptic area of lactating rats. *Endocrine.* 11(1):91-8.

Popeski N, Amir S, Diorio J, Woodside B. 2003. Prolactin and oxytocin interaction in the paraventricular and supraoptic nuclei: effects on oxytocin mRNA and nitric oxide synthase. *J Neuroendocrinol.* 15(7):687-96.

Roky R, Paut-Pagano L, Goffin V, Kitahama K, Valatx JL, Kelly PA, Jouvét M. 1996. Distribution of prolactin receptors in the rat forebrain. Immunohistochemical study. *Neuroendocrinology.* 63(5):422-9.

Sauve 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.

Schachter BS, Durgerian S, Harlan RE, Pfaff DW, Shivers BD. 1984. Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. *Endocrinology.* 4(5):1947-9.

Seo DO y River C. 2001. Microrinfucion of a nitric oxide donor in discrete brain regions activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology.* Vol. 13, 925-933.

Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science.* 299(5603):117-20.

Shirakawa T, Mitome M, Kikuri T, Nakamura W, Oshima S, Hasegawa T, Shindoh M, Oguchi H. **2004**. Immobilization induces acute nitric oxide production in the rat hypothalamus: a role of ionotropic glutamate receptors in the paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 145(8):3603-7.

Shiu RP, Friesen HG. **1980**. Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function. *Annu Rev Physiol.*;42:83-96.

Siaud P, Manzoni O, Balmefrezol M, Barbanel G, Assenmacher I, Alonso G. **1989**. The organization of prolactin-like-immunoreactive neurons in the rat central nervous system. Light- and electron-microscopic immunocytochemical studies. *Cell Tissue Res*. 255(1):107-15.

Srisawat R, Ludwig M, Bull PM, Douglas AJ, Russell JA, Leng G. **2000**. Nitric oxide and the oxytocin system in pregnancy. *J Neurosci*. 1;20(17):6721-7.

Stern JE y Ludwig M. **2001**. NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 280: R1815-R1822.

Stricker EM, Verbalis JG. **1986**. Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *Am J Physiol*. (2 Pt 2):R267-75

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(12):5454-60.

Torner L, Nava G, Duenas Z, Corbacho A, Mejia S, Lopez F, Cajero M, Martinez de la Escalera G, Clapp C. **1999**. Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J Endocrinol*. 161(3):423-32.

Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID. **2001**. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neuroscience* 21:9 3207-14

Torner L, Maloumby R, Nava G, Aranda J, Clapp C, Neumann ID. **2004**. In vivo release and gene upregulation of brain prolactin in response to physiological stimuli. *Eur J Neurosci.* 19(6):1601-8.

Toubeau G, Desclin J, Parmentier M, Pasteels JL. **1979**. Cellular localization of a prolactin-like antigen in the rat brain. *J Endocrinol.* Nov;83(2):261-6.

Ueta, Yoichi, Levy Andrew, Lightman Stafford, Hara Yuko, Serino Ryota, Nomura Masayoshi, Shibuya Izumi, Hattori Yokio, Yamashita Hiroshi. **1997**. Hypovolemia upregulates the expression of neuronal nitric oxide synthase gene in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. *Brain Research.* 790 25-32.

Ventura RR, Gomes DA, Reis WL, Elias LL, Castro M, Valenca MM, Carnio EC, Rettori V, McCann SM. **2002**. Antunes-Rodrigues J. Nitrgic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. *Braz J Med Biol Res.* 35(9):1101-9.

Ventura RR, Giusti-Paiva A, Gomes DA, Elias LL. **2005**. Antunes-Rodrigues J, Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. *Neurosci Lett.* 6;379(2):75-80

Yamaguchi K, Watanabe K, Yamaya K, **2000**. evaluation for roles of nitric oxide generated in the anteroventral third ventricular region to hyperosmolality-induced vasopressin secretion in conscious rats. *Eur J Endocrinol* 134:523-837.