



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**RESPUESTA NEUROENDOCRINA AL ESTRÉS EN LA RATA LACTANTE: PAPEL DEL
ÓXIDO NÍTRICO**

TESIS
Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Biomédicas

PRESENTA

M en C. NELA MONASTERIO RAMÍREZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

Juriquilla, Querétaro. Noviembre 2011



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

1. **Introducción**

2. **Antecedentes**

- 2.1. Estrés.- conceptos relacionados
- 2.2. Respuesta neuroendocrina al estrés
 - 2.2.1. Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HPA)
 - 2.2.2. Núcleo paraventricular del hipotálamo
- 2.3. Neurobiología de la lactancia
 - 2.3.1. Respuesta neuroendocrina al estrés durante la lactancia
- 2.4. Modelos experimentales de estrés
 - 2.4.1. Estrés Inmunológico
 - 2.4.2. Estrés Neurogénico
- 2.5. Óxido nítrico
- 2.6. Lactancia y óxido nítrico
- 2.7. Óxido nítrico y estrés

3. **Hipótesis**

4. **Objetivos**

- 4.1. General
 - 4.1.1. Particulares

5. **Materiales y métodos**

- 5.1. Animales
- 5.2. Paradigmas experimentales
- 5.3. Cirugía estereotáxica
- 5.4. Perfusión y obtención de cortes
- 5.5. Inmunohistoquímica
- 5.6. Histoquímica para NADPH-d
- 5.7. Hibridación *in situ*
- 5.8. Determinación de nitratos y nitritos
- 5.9. Cuantificación de corticosterona
- 5.10. Cuantificación de Interleucinas
- 5.11. Procesamiento de imágenes
- 5.12. Análisis estadístico

6. **Resultados**

- 6.1. Determinación de la de la respuesta neuroendócrina al estrés inducida por ovoalbúmina o restricción de movimiento
 - 6.1.1. expresión de Fos
-

- 6.1.2. Determinación de marcadores de localización y producción de óxido nítrico
 - 6.1.2.1. Expresión de NADPH-d y nNOS en el PVH
 - 6.1.2.2. Cuantificación de nitratos y nitritos
 - 6.1.3. Análisis del fenotipo neural que participa en la respuesta al estrés
 - 6.1.4. Expresión de RNA mensajero de CRF en el PVH y la amígdala
 - 6.1.5. Determinación de la concentración de las interleucinas 1a y 6 en respuesta a la administración de ovoalbúmina
 - 6.1.6. Cuantificación de la concentración de corticosterona
- 6.2. Efecto de la administración icv de L-NAME sobre la expresión de:
- 6.2.1. c-fos,
 - 6.2.2. NADPH-diaforasa y nNOS en el PVH
 - 6.2.3. *Cuantificación de nitratos y nitritos*
 - 6.2.4. Presencia de OT, VP y CRF
 - 6.2.5. Expresión de CRF en el PVH y la amígdala
 - 6.2.6. Efecto de la administración icv de L-NAME sobre la concentración basal de corticosterona
- 6.3. Evaluación de la administración icv de L-NAME previo al estímulo estresante
- 6.3.1. Expresión de Fos
 - 6.3.2. Expresión de nNOS y NADPH-diaforasa en el PVH
 - 6.3.3. Cuantificación de nitratos y nitritos
 - 6.3.4. Expresión de VP y CRF en el PVH
 - 6.3.5. Concentración de CORT.

7. *Discusión*

8. *Conclusión*

9. *Referencias*

Resumen

Durante la lactancia, el cerebro de la madre tiene una serie de adaptaciones como la reestructuración morfológica y funcional del hipotálamo, el aumento en la expresión de las sintasas del óxido nítrico (NOS), y la disminución de la síntesis de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH), así como la pérdida de la ritmicidad en la secreción de corticosterona (CORT). Además, la lactancia se asocia con una notable disminución de la respuesta neuroendocrina al estrés. Al respecto, se ha propuesto que la menor respuesta al estrés, resulta de mecanismos adaptativos que ocurren en diferentes regiones cerebrales, entre ellas, la reducción de la actividad de las vías aferentes al PVH y una modulación diferencial de la activación del PVH. Sin embargo, aún se desconoce si el aumento del óxido nítrico (NO) en el PVH durante la lactancia contribuye a la disminución en la respuesta al estrés. En este trabajo se investigó la participación del NO sobre la respuesta neuroendócrina al estrés en ratas lactantes y en diestro. Como herramienta metodológica se usó la inhibición farmacológica de la NOS mediante una inyección intracerebral de L-NAME 24 h antes del estímulo estresante. El estímulo estresante fue inducido por restricción de movimiento durante 60 minutos o por inyección de ovoalbúmina a ratas (madre) lactantes entre el día 10-14 postparto y se compararon con hembras vírgenes en diestro. Como índice de activación neuronal se utilizó la detección inmunohistoquímica del gen de respuesta inmediata c-fos tanto en el PVH como en la amígdala, además se detectó la presencia de NOS neuronal (nNOS) y la diaforasa del NO (NADPH-d), y la modificación en la expresión de CRH en el PVH y la amígdala. Adicionalmente, se determinó la cantidad total de nitratos en el hipotálamo, como índice de la producción total de NO, y CORT plasmática.

En ratas en diestro, ambos tipos de estrés indujeron una clara activación en el eje HPA como se observa en la síntesis de CRH en el PVH y el nivel de CORT circulante, así como un aumento en todos los marcadores de NO analizados, en contraste con sus controles y con las hembras lactantes. En el PVH de ratas lactantes después de la aplicación del estrés no se encontraron diferencias en ninguno de los marcadores utilizados con respecto a sus controles. La administración de L-NAME a ratas en diestro

24 h previas al estrés bloqueó la respuesta ante este estímulo, en términos de todos los marcadores de NO y de la respuesta al estrés analizados en este estudio. Sin embargo, las hembras lactantes que recibieron L-NAME presentaron un aumento en la síntesis de CRH en el PVH y CORT plasmática, alcanzando niveles similares a los observados en ratas en diestro cuando se aplica el estímulo estresante sin manipulación previa. Estos resultados muestran que la lactancia afecta los mecanismos de regulación del NO ante un estímulo estresante, y que el NO participa en la atenuación de la respuesta del PVH al estrés durante esta etapa reproductiva.

Abstract. The mother's brain undergoes fundamental morphological and physiological changes during lactation. In particular, the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH) display an increased nitric oxide synthases expression, reduced synthesis of the corticotrophin releasing factor (CRF) and the lost of circadian secretion of corticosterone (CORT). The lactation period in the female is a physiological state during which there is marked reduction of the neuroendocrine response to stress. To this regard, several studies suggest that the unaltered response to stress may be due to adaptative modifications in several brain sites, but particularly in the afferent stress pathways that reach the PVH and presumably less neuronal activation. To this regard, several studies have shown a close interaction between nitric oxide (NO) and neuroendocrine stress response. This study investigated whether NO inhibition could restore the neuroendocrine stress response in lactating dams. Stress was induced by restraint or an anaphylactogenic dose of egg white (EW) to lactating and diestrus rats. Immunoreactivity and relative levels of corticotropin releasing factor (CRH) in the PVH and the amygdala, and plasmatic corticosterone level induced after restraint stress was determined in lactating and diestrus rats. Whether NO modulates these responses to restraint stress was investigated by injecting the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, Nw-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) to diestrus or lactating rats (10-14 days pp) before the stressor. Restraint stress and EW injection increased the number of CRH positive cells and relative mRNA level in the PVH and the amygdala, and plasmatic corticosterone in diestrus rats, whereas lactating rats showed no change above basal level in these parameters. Central L-NAME infusion induced CRH expression in the PVH and the amygdala of lactating and diestrus rats. Restraint stress and EW injection were effective inducing a significantly increased number of CRH-positive cells and mRNA level the PVH and circulating corticosterone in lactating rats that were previously treated with L-NAME, whereas the amygdala displayed changes after restraint stress. The EW injection significantly increased the mRNA CRH level in the PVH and circulating corticosterone level in diestrus rats compared to EW-treated, and the level of circulating corticosterone induced by restraint stress in lactating rats after NO inhibition was similar to those observed in diestrus restrained rats. These data indicate that NO modulates the activity of neuroendocrine neurons in the PVH that respond to stress depending on the reproductive state of the animal. NO sustained production in the PVH during the lactation period may be of adaptive value to protect the dam and its offspring from stress-induced alteratio

1.- Introducción

La lactancia es la característica fisiológica más distintiva de los mamíferos y es esencial para el éxito en la supervivencia de la especie. Incluso, es de la función de las glándulas mamarias, de dónde deriva el nombre del taxa, *Mammalia* (McKenna y Bell, 1997). A pesar de la importancia evolutiva de la lactancia, nuestro conocimiento acerca de las consecuencias fisiológicas y conductuales de este proceso sigue siendo notablemente reducido. La capacidad de la glándula mamaria para secretar leche se adquiere al final de la gestación y progresa durante la lactancia. Después del parto, la secreción láctea aumenta hasta su nivel más alto y va declinando progresivamente con el tiempo. Inicialmente, se demostró, que las hormonas secretadas por la hipófisis son esenciales para la lactancia. Actualmente se conoce que el crecimiento de las glándulas mamarias, la secreción y la evacuación láctea son producto de una compleja interacción entre el sistema nervioso y las hormonas (Mepham, 1987; Stern y Lonstein, 2001).

Los estudios recientes sobre los efectos fisiológicos de las hormonas indican que éstas participan en otras funciones del sistema nervioso que son importantes en la regulación de la conducta. A partir de uno de los trabajos pioneros, se demostró que la oxitocina (OT), que induce las contracciones uterinas durante el parto y evacuación láctea durante la lactancia, también participa en la regulación general de la conducta materna y, en particular, en el aprendizaje y la memoria (Kinsley y Lambert, 2006). Subsecuentemente, se ha mostrado que la OT, además de su papel durante el parto y la lactancia, contribuye a la manifestación de la conducta sexual, la construcción de vínculos afectivos, la conducta materna, el desempeño cognitivo y el estrés (Carter y col., 2001; Theodosios y Poulain, 2001; Windle y col., 2006; Brunton y col., 2006).

Las fluctuaciones hormonales que ocurren durante el embarazo y la lactancia remodelan el cerebro femenino. Una de las modificaciones importantes es la disminución en la respuesta neuroendocrina al estrés y la ansiedad, donde la OT y la prolactina (PRL) pueden tener acciones ansiolíticas. Este fenómeno, junto con otras adaptaciones del cerebro materno

garantizan la capacidad de la madre para sobrellevar con éxito las demandas establecidas por la lactancia y por situaciones adversas (Russell y col., 2001; Neumann,).

La respuesta al estrés, es una respuesta automática del organismo a cualquier cambio ambiental, externo o interno, mediante la cual se prepara para hacer frente a las posibles demandas que se generen como consecuencia de la nueva situación. Estas reacciones permiten evitar el peligro, por lo que a corto plazo, son benéficas. Pero, si la situación persiste, la fatiga resultante será nociva para la salud del organismo. Actualmente, la respuesta al estrés prolongada o inadecuada, se ha asociado con diversos padecimientos humanos, que si bien no llevan inmediatamente al individuo a la muerte, sí menoscaban su nivel de vida (Sapolsky y col., 1994).

La lactancia en la rata ofrece un modelo de investigación en donde la respuesta al estrés está naturalmente atenuada, con lo cual se puede tener una aproximación a la fisiología del estrés a partir de las propiedades intrínsecas de los organismos en una situación endócrina y de estimulación sensorial particular. Esto resulta conceptualmente atractivo, ya que, sin lugar a dudas, el mecanismo más eficaz para modular la respuesta al estrés o lograr que ésta no llegue a tener consecuencias negativas, sería el que los propios organismos producen. Por ello, este trabajo se centra en el papel que tiene el neuromodulador óxido nítrico, durante la respuesta neuroendocrina al estrés en el cerebro de la rata lactante.

2.1. Estrés.- Conceptos relacionados

La supervivencia de los organismos depende de la capacidad para mantener su homeostasis, lo cual implica un equilibrio complejo, dinámico y armonioso entre su medio interno y el ambiente externo. Este equilibrio se ve constantemente comprometido o amenazado por factores que lo alteran y modifican. Cuando alguno de estos factores aleja al organismo de su homeostasis, éste tiene que reaccionar activamente a través de respuestas adaptativas, las cuales deben llevarlo a la preservación o al restablecimiento de la estabilidad fisiológica (Rabin, 1999). Así, la capacidad de responder o adaptarse a un estímulo adverso contribuye a la protección del organismo. Los sistemas encargados de tales adaptaciones son: el nervioso autonómico, el cardiovascular, el metabólico y el inmunológico y, de particular importancia, el eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (eje HPA). Este proceso de mantenimiento de la estabilidad a través de variaciones, referido como alostasis, es un componente esencial para mantener la homeostasis, ya que promueve la adaptación y ayuda al organismo a contender con el estímulo estresante o estresor (McEwen, 1998). Cuando el estímulo persiste o se intensifica y el equilibrio no puede ser restablecido por ajustes fisiológicos o por cambios de comportamiento inmediatos, se produce una reacción de alarma en el organismo que se denomina respuesta al estrés (Charmandari y col., 2005). Durante la década de los 30's, el fisiólogo Hans Selye introdujo el término "estrés" para definir: el estado fisiopatológico asociado con cambios fisiológicos específicos que pueden ser inducidos por diversos estímulos físicos y psicológicos (Selye H., 1936). Sin embargo, el estrés es un concepto amplio y complejo, que ha sido sujeto a diversas descripciones sin haberse llegado hasta la fecha a un consenso en cuanto a su definición.

La respuesta al estrés implica una amplia y coordinada gama de procesos que comienzan con la activación del sistema nervioso central y periférico, el eje HPA, secreciones hormonales y respuestas quimio-celulares (Lightman y col., 2001, Besedovsky y del Rey, 2002), además de respuestas conductuales como la ansiedad, el miedo y la ira (Tsigos y Chrousos, 2002). Las reacciones iniciales ante un estímulo estresante, usualmente se traducen en el incremento de la presión sanguínea y del ritmo cardiaco, así como en el

aumento de niveles circulantes de las hormonas reactivas al estrés: catecolaminas, hormona liberadora de corticotropina (CRH. por sus siglas en inglés), corticosterona (CORT), hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés), OT, PRL, entre otras (Nishioka y col., 1998; Rabin, 1999; Morales y Sawchenko, 2003).

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

2.2. Respuesta neuroendocrina al estrés

2.2.1. Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HPA)

El hipotálamo es la vía común final por la cual el sistema nervioso ejerce control sobre el sistema endocrino. El eje HPA constituye una unidad anatómica y funcional que regula procesos vitales como el balance hídrico, el control de la alimentación y el metabolismo. Una de sus funciones más importantes es la de responder a diversos estímulos estresantes para restablecer la alostasis, ya que tiene un papel crítico en la adaptación a tales retos (Palkovits, 1999; Rabin, 1999). La respuesta al estrés se genera mediante la liberación de CRH en el hipotálamo, el principal regulador del eje HPA al estimular la secreción de ACTH de la hipófisis anterior. Ante un estímulo estresante, CRH y por consiguiente ACTH, se liberan de manera exacerbada. A nivel del hipotálamo, existe una interacción recíproca entre CRH y vasopresina (VP), donde cada neuropéptido estimula la liberación del otro. En condiciones basales VP y CRH son secretadas al sistema porta de manera circádica y

pulsátil (Tsigos y Chrousos, 2002; Charmandari y col., 2005), y ambos funcionan como secretagogos de ACTH. Por su parte, ACTH estimula, en la corteza de la glándula adrenal, la secreción de esteroides catabólicos a la circulación como los glucocorticoides (GC). El nivel de GC es la señal que se encarga de orquestar las respuestas de todo el organismo para restablecer su alostasis, ya que actúan sobre numerosos órganos, incluido el cerebro, para modular la fisiología y la conducta (Sapolsky y col., 2000).

En condiciones basales, la secreción de los glucocorticoides es regulada por el cerebro, casi exclusivamente, por un pequeño número de neuronas que residen en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH, por sus siglas en inglés) y cuya identidad química principal es la de CRH y VP. En el PVH se encuentran neuronas que proveen la triada de eferencias (eminencia media, la hipófisis posterior y centros autonómicos de tallo cerebral y médula espinal), que en conjunto dirigen (Sawchenko y col., 1996) las acciones consecuentes de los corticotropos localizados en la adenohipófisis y de la corteza adrenal (Herman y col., 2002, Sawchenko y col., 2000).

La secreción pulsátil de CRH es, aumenta por la mañana, lo que resulta de manera inicial en la amplitud de la secreción de ACTH y CORT. Las variaciones diurnas de ACTH y CORT son frecuentemente perturbadas por cambios de luz, horarios de alimentación y ritmos de actividad, así como por estrés. Durante el estrés agudo, hay un incremento en la amplitud y sincronización de la liberación de CRH y VP desde el PVH, hacia el sistema de circulación porta hipotálamo-hipofisario (Charmandari y col., 2005). Además, dependiendo del estímulo estresante, otros factores, tales como angiotensina II, citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés), interleucinas e interferones, que participan como mediadores de la inflamación, son secretadas y actúan sobre los componentes hipotalámicos, hipofisarios y/o adrenal del eje HPA aumentando su activación (Buller, 2003; Charmandari y col., 2005).

Por otro lado, los glucocorticoides juegan un papel muy importante en la regulación de la actividad basal del eje HPA, ya que provocan la terminación de la respuesta al estrés al actuar sobre el hipotálamo y en la hipófisis o sobre diferentes centros extrahipotalámicos. Por medio de la circulación, llegan al cerebro y regulan de manera negativa la síntesis y

secreción de CRH en el hipotálamo y de ACTH en la adenohipófisis (Buller, 2003; Herman y col., 2002; Tsigos y Chrousos, 2002; Charmandari y col., 2005).

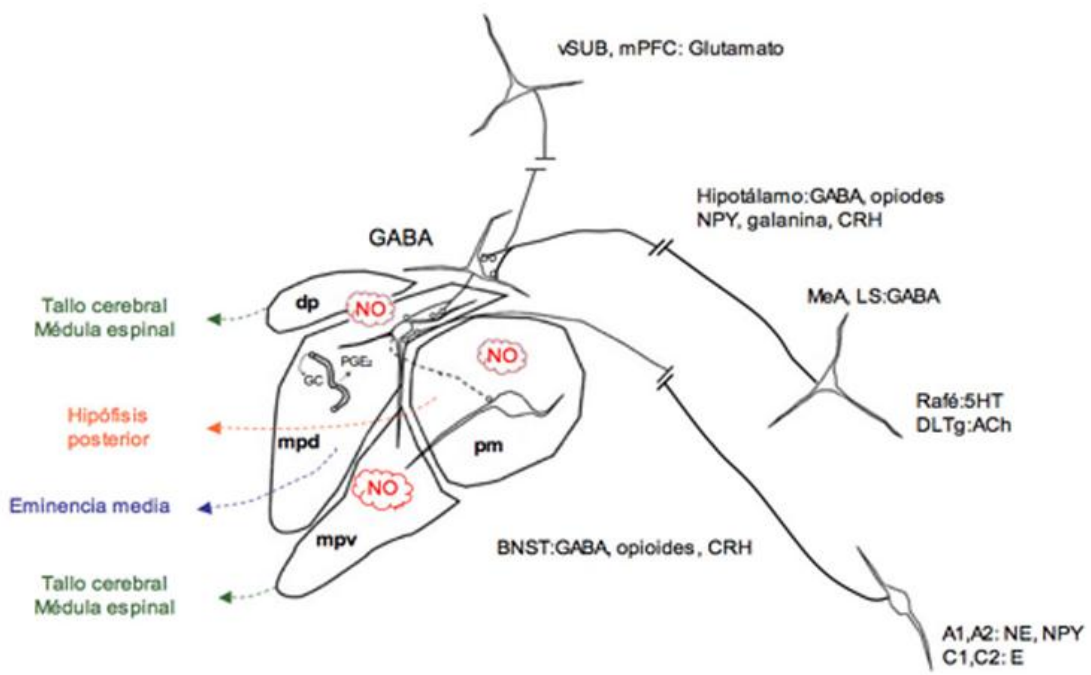
Además, a través del uso de técnicas de lesión o con trazadores neuronales se han obtenido evidencias experimentales que sugieren la existencia de una importante red de estímulos excitadores provenientes de la médula oblonga y mediados por noradrenalina que dirige la respuesta al estrés en el eje HPA PVH. Estos llegan al (Sawchenko y Swanson, 1983; Charmandari y col., 2005; Douglas, 2005). La concentración de noradrenalina en el PVH se eleva durante la exposición al estrés debido a la disminución de la actividad de la enzima que la degrada, la monoamina-oxidasa. Además, la respuesta a estímulos estresantes, tales como el reto inmunológico, se pierde después de la destrucción de las aferencias noradrenérgicas del PVH, lo que indica que ésta es la principal vía de estimulación del eje HPA. Aunque tanto el estrés psicológico como el físico reclutan células noradrenérgicas que se proyectan al PVH, la señal también debe activar neuronas del PVH-CRH indirectamente, a través de una vía de intra-señalización propia del PVH (Sawchenko y col., 2000; Walker y col., 2001).

2.2.2. Núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH)

Entre los núcleos que conforman el hipotálamo, el PVH es una de las regiones críticas en el mantenimiento de la homeostasis y en la respuesta al estrés (Swanson y Sawchenko., 1983; Herman y col, 2002; Buller, 2003). Este núcleo está localizado como una estructura par en ambos lados del tercer ventrículo en la base del cerebro. Morfológicamente, el PVH se divide en dos regiones celulares, parvocelular y magnocelular, denominadas así por el tamaño del soma neuronal (Swanson y Sawchenko, 1983). Con base en su citoarquitectura, conectividad y fenotipo neural, estas regiones se han subdividido de la siguiente manera: neuronas magnocelulares, en la región posterior del PVH (pm), liberan VP y OT directamente a la circulación sistémica desde el lóbulo posterior de la hipófisis. Estas hormonas controlan el balance hídrico, la presión sanguínea, la lactancia y el parto. Las neuronas de la región dorsal parvocelular (dp) y ventro-medial parvocelular (mpv), expresan somatostatina, CRH, OT y VP, y envían sus proyecciones hacia el tallo cerebral y a la médula espinal, ejerciendo control directamente sobre el sistema nervioso autónomo (Sawchenko y col., 1992, Buller, 2003). Finalmente, las neuronas de la porción dorsomedial parvocelular

(mpd), de las cuales un gran porcentaje expresan CRH, además de otros péptidos como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), neuropéptido Y (NPY), encefalinas (ENK, por sus siglas en inglés) y VP, envían sus proyecciones hacia la eminencia media (Swanson y Sawchenko, 1983; Sawchenko y col., 2000). El CRH es transportado por las proyecciones neuronales a la lámina externa de la eminencia media, donde es secretado hacia el sistema porta hipotálamo-hipofisiario hasta alcanzar la hipófisis anterior, donde estimula la síntesis y liberación de ACTH hacia la periferia (Kovács y col., 1996). El principal órgano blanco de la ACTH es la corteza de la glándula adrenal, donde estimula la secreción de glucocorticoides, cortisol en humanos y corticosterona en la rata. Los niveles elevados de glucocorticoides tienen efectos catabólicos importantes que resultan en la conversión de proteínas y glucógeno a glucosa en el músculo. También disminuyen la utilización celular de glucosa en los órganos y tejidos que no son necesarios en una situación de emergencia, aumentan la movilización de ácidos grasos y glicerol del tejido adiposo, por lo que aumenta su concentración en la sangre a favor de la síntesis de glucosa. Como resultado, los glucocorticoides mantienen la concentración de glucosa en sangre necesaria para contender contra las demandas metabólicas que ejerce el estrés sobre el organismo (Sapolsky y col., 2000).

Además de las conexiones intranucleares, el PVH integra aferencias de centros superiores (corteza cerebral y sistema límbico) y recibe proyecciones catecolaminérgicas del tallo cerebral, de órganos circunventriculares y de áreas del sistema límbico, como el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), el septum, el hipocampo y la amígdala (Swanson y Sawchenko, 1983, Herman, 2002)



1.

Figura

Diagrama de la microanatomía del núcleo paraventricular del hipotálamo. Las neuronas Parvocelulares de la región dorsolateral medial (mpd), reciben aferencias de grupos de las neuronas del tallo cerebral: noradrenérgicas (A1 y A2), adrenérgicas (C1 y C2) y peptidérgicas. La información peptidérgica y GABAérgica se recibe de varios núcleos hipotalámicos, así como del núcleo del lecho de la estria terminalis (BNST) y de las interneuronas de la periferia del PVH. En estas neuronas parvocelulares converge la información descendente que proviene del sistema límbico: subíctulo ventral (vSub), corteza prefrontal media (mPFC), amígdala medial (MeA) y septum lateral (LS), las aferencias colinérgicas (ACh) que provienen del núcleo tegmental dorsolateral (DLTg), así como información serotoninérgica (5HT) que llega del tallo cerebral. Las neuronas del mpd envían sus axones hacia neuronas magnocelulares (pm) así como a las regiones parvocelulares dorsal (dp) y medial ventral (mpv). Las dendritas neuronales se ramifican a través de los límites funcionales dentro del mismo núcleo. Las neuronas parvocelulares (dp y mpv) envían sus proyecciones a grupos de neuronas autonómicas en el tallo cerebral y la médula espinal. Las neuronas de la región magnocelular sintetizan principalmente OT y VP y proyectan al lóbulo posterior de la hipófisis. Las neuronas del PVH también reciben información de señales circulantes en la sangre como glucocorticoides (GCs) y prostaglandinas (PGE₂). Finalmente, las neuronas magnocelulares y parvocelulares pueden producir óxido nítrico (NO) y monóxido de carbono (CO₂), los cuales actúan como neuromoduladores dentro del PVH (Modificado de: Herman y col., 2002)

2.3. Neurobiología de la lactancia

El ciclo reproductivo de los mamíferos comprende varias fases subsecuentes estrechamente relacionadas como son: el embarazo, el parto y la lactancia. La transición entre estas fases implica que lo que antes era un organismo dedicado a satisfacer sus propias necesidades

metabólicas y ver por su supervivencia, ahora necesita adaptarse a las demandas de sus crías y redirigir todos sus recursos disponibles para procurar la supervivencia de la camada (Mepham, 1987; Kinsley y Lambert, 2006). Dichas adaptaciones inician con el embarazo y finalizan con el destete, e inciden en la fisiología general de la madre, en particular, sobre aspectos del metabolismo, la regulación neuroendocrina, y la conducta materna (Carter y col., 2001; Russell y col., 2001; Neumann, 2001; Douglas, 2005).

Durante el embarazo, prevalecen niveles altos de hormonas como estradiol (E_2), progesterona (P), lactógeno placentario y PRL, que preparan a las glándulas mamarias para la lactancia. Después del parto inicia la lactancia como efecto de la disminución de las hormonas feto-placentarias, lo que deja a la hipófisis materna a merced de la retroalimentación positiva que ejerce la PRL a medida que su secreción aumenta. A partir de ese momento, la secreción de PRL y la secreción láctea dependen totalmente del estímulo de la succión. La transferencia de leche a la camada se lleva a cabo mediante el proceso de la evacuación láctea durante la succión, para la cual la OT es esencial (Mepham, 1987; Russell y col., 2001). Las neuronas oxitocinérgicas se localizan en el PVH y en respuesta a la succión, la OT se libera hacia la circulación para llegar a la glándula mamaria donde se une a receptores específicos de las células mioepiteliales para generar la contracción que origina la evacuación de la leche acumulada en la glándula mamaria (Mepham, 1987; Thodosis y Poulain, 2001; Armstrong y Hatton, 2006).

En el caso particular de la lactancia, se hace una división en tres etapas subsecuentes y con características específicas en cuanto a las fluctuaciones en las concentraciones circulantes de PRL, OT, E_2 y P. Con respecto a las hormonas ováricas (E_2 y P), el nivel circulante de E_2 aumenta considerablemente al momento del parto, provocando que la hembra pueda volver a ovular (ovulación posparto) (Connor y Davis, 1980), sin embargo disminuye gradualmente en los días subsecuentes y se mantiene bajo durante la mayor parte de la lactancia. Los niveles de P permanecen elevados gracias al mantenimiento del cuerpo lúteo formado después de la ovulación postparto y esta condición se mantiene durante la lactancia. Por su parte, la OT, se incrementa para llevar a cabo la inducción del parto, y la evacuación láctea, y al igual que PRL sus niveles mantiene relativamente elevados durante el tiempo que el estímulo de la succión esté presente (Mepham, 1987; Armstrong y Hatton, 2006).

Desde hace mucho tiempo se han estudiado algunos de los cambios más evidentes que caracterizan la transición entre parto y lactancia, como el cese temporal del ciclo reproductivo, aumento en el consumo de líquidos y alimento, manifestación de la conducta materna, la secreción y evacuación láctea, sin embargo, recientemente se ha comenzado a entender cuáles son los mecanismos celulares que los subyacen (Mephram, 1987; Kinsley y Lambert, 2006). Al respecto las investigaciones muestran que las fluctuaciones hormonales que ocurren durante, y a lo largo de estas tres fases pueden remodelar el cerebro femenino. Entre los cambios observados en el cerebro materno incluyen el aumento del tamaño neuronal en algunas regiones y cambios estructurales en otras. Algunas de estas regiones, como el PVH, están involucradas en la regulación de las conductas maternas, como la construcción de un nido, acicalamiento y la protección de las crías ante los depredadores. Otras de las regiones cerebrales en donde también se observan cambios son las que están involucradas en procesos como la memoria, el aprendizaje y la respuesta al estrés, como el hipocampo y la amígdala (Carter y col., 1997, 2001; Lightman y col., 2001; Russell y col., 2001; Theodosis y Poulain, 2001).

Las modificaciones que ocurren durante la lactancia son especialmente notables en el eje HPA, en particular en el PVH, ya que en este núcleo los cambios morfofuncionales que se observan en este periodo, como la reducción sintética de CRH, contribuyen directamente a la atenuación de la respuesta neuroendócrina al estrés. Las modificaciones que contribuyen a esta atenuación durante la lactancia son diversas (Windle y col., 1997a, 1997b; Walker y col., 2001a, 2001b; Tilbrook y Clarke, 2006, Deshamps y Woodside 2003). En relación con el eje HPA, se sabe que se pierde la ritmicidad pulsátil de la secreción de CORT, además prevalece un nivel relativamente alto y estable de secreción de glucocorticoides (Stern y Voogt, 1973-1974). Como se mencionó, los glucocorticoides juegan un papel importante en la determinación de la actividad en un amplio rango de procesos homeostáticos (Lightman y col., 2001). Además, disminuye la expresión de CRH y como consecuencia hay un aumento en sus receptores, además se ha propuesto la disminución de la sensibilidad de la hipófisis a la retroalimentación negativa que generan los glucocorticoides sobre la síntesis y secreción de CRH y ACTH (Johnstone y col., 2000; Walker y col., 2001b; Douglas, 2005). Asimismo, se ha reportado la disminución de la función de las aferencias noradrenérgicas que llegan al

hipotálamo (Toufexis y Walker, 1996; Toufexis y col., 1998). Se ha sugerido que este conjunto de adaptaciones del eje HPA, podrían ser las responsables de la respuesta al estrés atenuada durante la lactancia. No obstante, una de las contribuciones más recientes, a las modificaciones que existen en el cerebro de la rata lactante, es el aumento en la expresión de las enzimas que sintetizan óxido nítrico (NO), y se ha sugerido que su expresión es dependiente del estímulo de la succión, además se ha mostrado que su inhibición altera la conducta materna (Cecatelli y Eriksson, 1993; Otukotong y col., 2000; Popeski y col., 1999; Popeski y Woodside, 2004).

2.3.1. Respuesta al estrés durante la lactancia

En condiciones fisiológicas particulares donde la respuesta al estrés se encuentra atenuada de manera natural, sin embargo, y a pesar de esta condición, el organismo mantiene la respuesta mínima necesaria que le permita responder si se pone en riesgo su homeostasis. Aunque existen varios estados fisiológicos en los que esto sucede, uno de los ejemplos más claros es el que se observa en las hembras de mamíferos durante la última fase del embarazo y la lactancia (Tilbrook y Clarke, 2006; Carter y Lightman, 1987). Las alteraciones que sufre el eje HPA que llevan a una respuesta al estrés atenuada, inician en la última fase del embarazo y continúan durante la lactancia. Así, este cambio adaptativo contribuye al establecimiento de la conducta materna para favorecer el desarrollo óptimo de la camada (Douglas, 2005; Kinsley y Lambert, 2006)

Los mecanismos celulares que subyacen a la atenuación de la respuesta al estrés durante la lactancia, no han sido bien esclarecidos, sin embargo, existe suficiente evidencia experimental que demuestra la existencia de cambios en todos los niveles del eje HPA. Es evidente que la alteración de la actividad del eje HPA, puede deberse a una serie de mecanismos que involucran la reducción en la síntesis de CRH y AVP, o bien modificaciones en la eficacia de la retroalimentación negativa de los glucocorticoides, además de cambios en la información noradrenérgica que llega al PVH, así como la reducción en la respuesta de la hipófisis a las acciones del CRH y la AVP. También, es posible que existan cambios en las señales reguladoras que llegan al PVH, así como variaciones en la respuesta a OT, PRL y

péptidos reguladores del apetito que contribuyan a la actividad reducida del eje HPA (Johnstone y col., 2000; Neumann, 2001; Neumann y Col., 2005)

En la rata lactante, la síntesis y secreción de CRH y VP está modificada, tanto en condiciones basales como ante una situación de estrés. La expresión basal del mRNA de CRH en el PVH de ratas lactantes disminuye en comparación con las no-lactantes, sin embargo, el efecto de la lactancia sobre AVP es menos clara, ya que los estudios de microdiálisis no han mostrado un incremento en el mRNA de AVP en el PVH durante la lactancia (Neumann y col., 1998; Toufexis y col., 1999; Da Costa y col., 2001; Walker y col., 2001).

Por otro lado, la atenuación de la respuesta neuroendocrina al estrés durante la lactancia se ha demostrado mediante el uso de una gran variedad de estímulos estresantes como son: el choque eléctrico (footshock), la exposición a éter, al ruido, frío, nado forzado, restricción de movimiento, poner un intruso en la jaula materna, orina de zorro, inyección peritoneal de cloruro de sodio e inyección de lipopolisacárido (LPS) (Da Costa y col., 1997; Lightman y col., 2001; Douglas, 2005; Shanks y col., 1999; Windle y col., 1997, 2006, Neumann y col., 2005, Toufexis y Walker, 1996, Brunton y col., 2006). En las ratas lactantes también se ha encontrado una respuesta atenuada a estímulos estresantes de índole psicológico en donde se observa una reducción de los niveles circulantes de OT, sin que haya incremento en el nivel de PRL, en comparación con hembras nulíparas (Higuchi y col., 1989; Douglas, 2005; Brunton y col., 2009).

Las características de estas respuestas neuroendocrinas al estrés varían significativamente durante el ciclo reproductivo, particularmente en la lactancia (Stern y Lonstein, 2001; Walker y col., 2001). A este respecto, como se mencionó previamente, durante la lactancia aumenta la secreción basal de glucocorticoides y ACTH, la cual se acompaña de una pérdida en la ritmicidad diurna de la actividad del eje HPA y por ende, disminuye la respuesta al estrés (Rivier, 2002; Walker y col., 2001; Neuman, 2001; Douglas, 2005). Como consecuencia, las ratas lactantes, a pesar de tener concentraciones basales de ACTH y CORT elevadas, tienen una expresión baja de c-Fos (proteína y mRNA) y mRNA de CRH en neuronas del PVH en respuesta a varios estímulos estresantes (Okere y col., 1999; Douglas, 2005; Walker y col., 2001; Tilbrook y Clarke, 2006), tanto físicos y metabólicos, incluyendo la inyección de salina hipertónica, estrés por nado, inhalación de éter, inyección de LPS (Walker y col.,

2001), así como a estímulos psicológicos, como el ruido, la inmovilización o estrés social. Así mismo, se ha demostrado una reducción en la actividad de las vías aferentes al PVH y la modulación diferencial de la activación de las neuronas de dicho núcleo (Douglas, 2005).

Una gran variedad de estudios han documentado una disminución en los niveles circulantes de de OT (Carter y col., 2001; Neumann, 2001), catecolaminas, PRL, ACTH y CORT (Walker y col., 2001; Windle y col., 2006; Brunton y col., 2006) inducidos por el estrés durante la lactancia, siendo un efecto contrario a lo que se reporta en las hembras vírgenes o en los machos. Estos hallazgos son atribuidos a efectos inducidos por la succión y la presencia de las crías (Douglas, 2005; Tilbrook y Clarke, 2006). Al respecto, en ratas se ha encontrado que al retirar a las crías de sus madres durante un periodo de 24 h, las mediciones de la actividad del eje HPA en hembras lactantes son similares a las no lactantes. Esto ha sido demostrado por la disminución en los niveles de mRNA de CRH y ACTH y la secreción de CORT (Banky y col., 1994; Charmandari y col., 2005; Douglas, 2005; Walker y col., 2001). Además, estudios hechos en borregas sugieren que los mecanismos de la reducción de la actividad del eje HPA inducida por la succión durante la lactancia involucra modificaciones a nivel del hipotálamo o de la hipófisis, dado el aumento en la concentración plasmática de ACTH durante aislamiento o restricción de movimiento que fueron substancialmente reducidas en borregas lactantes comparadas con las no lactantes (Tilbrook y Clarke, 2006). Esto puede deberse a la reducción en la secreción de CRH y/o de VP del hipotálamo hacia el sistema portal hipofisiario y/o a la reducción en la respuesta de la hipófisis anterior a las acciones de CRH y/o VP (Brunton y col., 2006).

Existen evidencias sobre la reducción en la síntesis de CRH y VP y alteraciones en la respuesta de la hipófisis a CRH y VP que contribuyen a la atenuación de la respuesta al estrés en hembras lactantes. Por ejemplo, los niveles de mRNA de CRH y c-Fos inducidos por estrés en neuronas del PVH de las ratas lactantes son menores en comparación con las no-lactantes (Lightman y col., 2001; Crane y col., 2005; Douglas, 2005). Incluso, las ratas vírgenes con ciclos estrales normales tienen un aumento del transcrito primario para VP después del reto inmunológico comparado con las ratas lactantes, mientras que el tratamiento con CRH provoca un aumento en la secreción de ACTH en las ratas vírgenes

en comparación con las ratas lactantes. En contraste, se ha encontrado una disminución de la respuesta a VP en la hipófisis de las ratas lactantes, lo que sugiere que las acciones de CRH y VP pueden estar alteradas de manera distinta durante la lactancia (Toufexis y col., 2001; Douglas, 2005).

Finalmente, se ha sugerido que la respuesta atenuada del eje HPA durante la lactancia resulta de la alteración de la retroalimentación negativa de los glucocorticoides y la reducción en la estimulación noradrenérgica que llega del tallo al PVH. La atenuación de la actividad del eje HPA inducida por el estrés durante la lactancia parece ser un mecanismo multifactorial que involucra la disminución de la secreción de ACTH por la hipófisis anterior. Si bien, no se ha determinado hasta que punto estos cambios se deben a la secreción de CRH y VP del hipotálamo y la falta de respuesta de la hipófisis anterior (Douglas, 2005; Lightman y col., 2001; Charmandari y col., 2005; Tilbrook y Clarke, 2006).

En conclusión, actualmente se consideran varios mecanismos potenciales para la disminución de la respuesta al estrés durante la lactancia, como el papel de la actividad central noradrenérgica disminuída (Douglas, 2005), la liberación central de PRL y OT (Toufexis y Walker, 1996; Neumann, 2002; Torner y Neumann, 2002), la acción inhibitoria de los opiodes, así como cambios en la eficacia de la retroalimentación de glucocorticoides.

2.4. Modelos experimentales de estrés

Con la ventaja que ofrece la detección de genes de respuesta temprana como c-Fos, se han realizado experimentos para explorar la respuesta del PVH ante diferentes estímulos estresantes. Esto ha permitido determinar que los diversos tipos de estímulos estresantes generan diferentes patrones de actividad neuronal y utilizan diferentes vías neurales para el establecimiento de la respuesta neuroendocrina al estrés, tal como la activación de las células que producen CRH en el PVH (Charmandari y col., 2005; Sawchenko y col., 2000). Es común que para el estudio del estrés se definan dos grandes categorías de estímulos estresantes: a) psicológico o neurogénico: estímulos que representan una situación potencialmente amenazante, como la restricción de movimiento, el choque eléctrico o el

ruido; estos estímulos al ser captados por el animal llegan y se procesan en la corteza cerebral y el sistema límbico; y b) físico o sistémico: estímulos que resultan en una alteración de los parámetros fisiológicos que son traducidos por un número reducido de receptores periféricos o centrales, y cuyo aspecto esencial no es percibido de manera consciente, tales como estrés cardiovascular, inmunológico y osmótico (Kovács y Sawchenko, 1996, Pacák y Palkovits, 2001).

Acerca de las vías aferentes implicadas en la transmisión de los estímulos estresantes al PVH prevalecen tres conceptos: a) existe una gran diversidad de vías que son específicas para el tipo de estímulo estresante que activan las neuronas CRH-positivas en el PVH, predominantemente a través de inervaciones GABAérgicas. Estas vías incluyen las aferencias aminérgicas del tallo cerebral, las cuales procesan estímulos sistémicos y psicológicos que requieren de estructuras en centros superiores. Las proyecciones GABAérgicas que provienen de regiones corticales y del sistema límbico modulan las conexiones intra-PVH, lo que proporciona a las neuronas la característica de responder específicamente a ciertos tipos de estímulos estresantes (Sawchenko y col., 2000, Herman y col., 2004). b) el PVH integra y modula una gran diversidad de señales neuroendocrinas a través de vías autonómicas y neuroendocrinas para orquestar la activación adrenal y c), las acciones promovidas por glucocorticoides tienen una gran diversidad sobre distintas áreas del cerebro, por lo que el control de los glucocorticoides depende de la fase del pulso generador de CRH, de la naturaleza y la duración del estímulo aferente, así como de los mecanismos que subyacen el procesamiento del estímulo estresante (Sapolsky y col., 2000; Rabin, 1999).

En la actualidad existen una gran variedad de datos experimentales y clínicos que ponen de manifiesto que, dependiendo de su intensidad y duración, el estrés puede producir alteraciones considerables en muchas regiones del cerebro. Estas incluyen desde modificaciones más o menos leves y reversibles, hasta situaciones en las que se produce muerte neuronal. Se sabe que el efecto perjudicial que puede producir el estrés está directamente relacionado con los niveles de glucocorticoides que son secretados durante la respuesta fisiológica al estrés (McEwen, 1998; Sapolsky y col., 2000). Aunque la presencia

de determinados niveles de estas hormonas son de gran importancia para la fisiología del organismo, el exceso de GC puede producir alteraciones a distintos niveles del organismo (Charmandari y col., 2005; Buller, 2003). Numerosos reportes han establecido que la exposición crónica o excesiva a las hormonas secretadas durante la respuesta al estrés puede causar tres tipos de efectos perjudiciales en el sistema nervioso: i) Atrofia dendrítica: es un proceso que consiste en la retracción de las prolongaciones dendríticas, producida en ciertas neuronas. Siempre y cuando termine la situación de estrés, se puede producir recuperación de la arborización dendrítica, por tanto, puede ser un proceso reversible; ii) Neuroexcitotoxicidad este proceso se presenta como consecuencia del mantenimiento sostenido de altos niveles de excitabilidad neuronal causada por un exceso de ácido glutámico (Glu) o GC, provocando la muerte neuronal, iii) Exacerbación de distintas situaciones de daño neuronal; mecanismo que se produce, si al mismo tiempo que se produce agresión neural (apoplejía, anoxia, hipoglucemia), existen altos niveles de GCs, lo que provoca la reducción en la capacidad de las neuronas para sobrevivir a dicha situación dañina (Sapolsky y col., 2000). En general, estas categorizaciones proveen un marco de referencia acerca del control central de la respuesta al estrés, sus vías de procesamiento y sus efectos específicos sobre grupos neuronales (Tsigos y Chrousos, 2002; Charmandari y col., 2005).

2.4.1. Estrés inmunológico

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

La regulación neuroendocrina de las diferentes fases de las respuestas inflamatoria e inmunológica, requiere un intercambio activo de señales entre las células del sistema inmunológico y los mecanismos que están directamente bajo el control del sistema nervioso.

Este intercambio de información es particularmente relevante en condiciones patológicas, en las que muchas de las funciones del organismo se encuentran alteradas, y a pesar de ello, el sistema inmunológico debe funcionar eficazmente. Se ha propuesto que las respuestas neuroendocrinas, mediadas por productos derivados del sistema inmunológico, son inducidas después de la activación de dicho sistema. Estas respuestas hacen que el cerebro reciba la información del sistema inmunológico para que responda adecuadamente a estas señales (McEwen, 1998; Sapolsky, 1994; Sawchenko y col., 2000; Schedlowski y Tewes, 1999; Shiltz y Sawchenko, 2003).

Durante la fase aguda de la respuesta a un reto inmunológico, las células del sistema inmunológico liberan citocinas pro-inflamatorias hacia la circulación y desencadenan la activación del sistema nervioso central, ya sea a través de la estimulación de neuronas sensoriales o por mecanismos humorales (Buller, 2003). En tanto que, en los procesos inmunológicos, las interacciones inmuno-neuroendócrinas se establecen cuando el sistema inmunológico activado libera citocinas que, estimulan al sistema nervioso y a su vez responde a través de la liberación de hormonas y la activación de redes neuronales que controlarán al mismo sistema inmunológico. El eje HPA ha sido uno de los sistemas neuroendócrinos más estudiadas en la regulación del sistema inmunológico, debido a su particular importancia en el mantenimiento de la homeostasis. En este eje, las citocinas inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- α), como productos solubles del sistema inmunológico activado, estimulan la secreción hipotalámica de CRH y VP, los cuales inducirán la liberación de ACTH.

Numerosos estudios en los que se examina la comunicación entre estos sistemas han investigado los mecanismos por los cuales la administración sistémica aguda de la IL- β , la IL-6 ó el TNF- α , estimula la liberación de ACTH a través de un mecanismo dependiente de CRH (Földes y col., 2000; Rivier, 2003). Esto se ha corroborado mediante anticuerpos específicos para CRH, los cuales anulan los efectos estimuladores de las señales inmunológicas. Incluso, los anticuerpos anti-VP también disminuyen la liberación de ACTH en respuesta a la administración de IL- β , aunque con menor intensidad que cuando se bloquea al CRH. Esto sugiere que la VP tiene un papel secundario en la respuesta del eje HPA ante un estímulo inmunológico. La activación de las neuronas del PVH, puede

generarse a partir de la información que llega a través de sus aferencias o bien como efecto de la presencia de mensajeros intermediarios de la inflamación, como las prostaglandinas (PGE2) y las catecolaminas, los cuales son inducidos por la presencia de citocinas en la circulación que afectan las células de los órganos circunventriculares, las paredes de los ventrículos y la glia (Buller, 2003). Sin embargo, por cualquiera que sea la vía de activación de las neuronas que producen VP y CRH, traerá como consecuencia la producción de glucocorticoides (GC), a partir de lo cual, se genera uno de los efectos más importantes del estrés sobre el sistema inmunológico, que es el causar una re-distribución de las células inmunológicas por el cuerpo, y movilización que es mediada en parte por GC (Buller, 2003). Las acciones de los GC sobre el sistema inmunológico son diversas. Las células del sistema inmunológico, son sensibles a la cantidad y duración del nivel circulante de GC, y una excesiva producción de éstos altera el metabolismo, la conducta, e induce inmunosupresión. Por el contrario, en dosis baja y transitoria, estimula el sistema inmunológico, como sucedería ante un estímulo estresante crónico o agudo. Las interacciones y una adecuada modulación entre estos tres sistemas es esencial para mantener la vida durante situaciones de estrés inmunológico (Sapolsky, 1994; Schedlowki y Tewes, 1999; Sapolsky y col., 2000; Besedovski y de Rey, 2002).

2.4.2. Estrés neurogénico

Los estresores neurogénicos comprenden aquellos estímulos estresantes que tienen predominantemente un componente emocional o psicológico. Entre estos se incluye el choque eléctrico, miedo condicionado, nado forzado, inmovilización o restricción de movimiento. Los estresores neurogénicos involucran una estimulación somatosensorial intensa que requiere de interpretación cognitiva o emocional. La exposición aguda a cualquiera de estos estímulos estresantes resulta en la secreción de ACTH y glucocorticoides, lo que demuestra la activación aguda del eje HPA. Este eje responde a la intensidad del estímulo, por lo que su repetición resulta en un aumento en la secreción hormonal. Sin embargo, no es posible poder hacer distinciones entre diferentes estímulos estresantes únicamente con base a la medición de los niveles circulantes de ACTH o corticosterona. Aún así, los estudios a nivel del sistema nervioso central han sido útiles para determinar la neurocircuitaría y respuestas neuroendócrinas específicas para cada tipo de estímulo estresante. Se han observado diferencias entre estresores neurogénicos a nivel del

hipotálamo. Al parecer los estresores neurogénicos, incluido el nado forzado y la restricción de movimiento sólo inducen la activación del mRNA de CRH mientras que otros estresores fisiológicos como el estrés osmótico además induce el mRNA de proencefalina A (Harbuz et al., 1991). Los estresores neurogénicos que involucran algún tipo de componente físico, como por ejemplo el electroshock también inducen la expresión del mRNA de proencefalina A (Harbuz y Lightman 1989). La estimulación neuronal provocada por un estímulo estresante específico ha sido mapeada con genes de respuesta temprana como c-fos (Chan y col., 1993). El estrés por inmovilización, un estresor neurogénico con un componente físico, induce la expresión de c-fos en el hipotálamo, específicamente en la región medial y dorsal parvocelular del PVH, donde se encuentran las neuronas positivas a CRH (Kononen y col., 1992, Sawchenko y col., 2000). Estas observaciones sugieren la existencia de un circuito específico de los estímulos estresantes neurogénicos que se activa por neuronas del mismo fenotipo que al aplicar un estresor agudo. Los estresores sistémicos, que típicamente contienen un componente físico importante, evocan un patrón de activación de fos diferente al que se ha mostrado con estresores neurogénicos. Mientras que en el PVH las neuronas parvocelulares positivas a CRH se activan, la amplia cicuitería involucrada en el procesamiento de estresores sistémicos se encuentra contenida en estructuras subcorticales, muchas de las cuales están especialmente involucradas en el integración de estímulos estresantes sistémicos. Se ha confirmado a través de marcajes dobles con tirosina hidroxilasa y c-fos que tanto el estrés sistémico como el neurogénico activan grupos catecolaminérgicos del tallo cerebral. Estas neuronas que proyectan directamente al PVH (Sawchenko y Swanson 1983) contribuyen a la robusta respuesta neuroendocrina observada después del estrés (Sawchenko y col., 2000).

2.5. Óxido nítrico (NO)

Desde la década pasada, el descubrimiento de una molécula producida por el sistema nervioso, el óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés) revolucionó el concepto clásico que se tenía sobre el efecto y mecanismo de acción de los neurotransmisores (Guix y col., 2005). El NO es un gas extremadamente inestable que se considera un neurotransmisor atípico ya que no se encuentra almacenado en vesículas de neuronas pre-sinápticas, ni se libera en el surco sináptico, sino que una vez sintetizado, difunde a través de la membrana en donde actúa en sus diferentes células blanco. Otro de los criterios que hacen al NO un

neurotransmisor atípico es que no se une a receptores membranales específicos ni se han mostrado mecanismo de recaptura. Sin embargo, el NO puede ser considerado como un neurotransmisor o neuromodulador ya que al difundirse (difusión varía entre 40 - 300 μm), puede ejercer efecto sobre sus células vecinas y generar la formación de segundos mensajeros al actuar sobre proteínas G (Rivier, 2003; Guix y col., 2005).

La regulación de la actividad del NO la provee únicamente el control de su síntesis. El NO se produce a partir de tres isoformas de la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS), dos de ellas constitutivas como; la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), así como una inducible (iNOS) (Turnbull y Rivier, 1996; Guix y col., 2005). En el sistema nervioso, las tres isoformas de la enzima están presentes, así, la eNOS se localiza en las células epiteliales que conforman los capilares, mientras que cuando se induce la expresión de iNOS, ésta se puede localizar principalmente en microglía y astrocitos, aunque, la principal isoforma presente en el sistema nervioso, es la nNOS. Todas las neuronas positivas a nNOS, también exhiben actividad para la diapasora del óxido nítrico Nicotinamida-Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH-d), la cuál se utiliza como un marcador para las neuronas que producen NO (Calka y col., 1994; Guix y col., 2005). La actividad de nNOS se regula por la concentración de calcio (Ca^{2+}) presente en el citosol, el cual estimula a la enzima a través de su interacción con la proteína cinasa Ca^{2+} /calmodulina. Al producirse un potencial de acción a la neurona NOérgica, se activan los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que provoca en la liberación de este ión desde el retículo endoplásmico liso hacia el citoplasma. Este aumento en la concentración de Ca^{2+} provoca que se pegue a la calmodulina activándola para que se induzca la fosforilación de nNOS, la cual se activará para iniciar la síntesis de NO.

Cuando la concentración de Ca^{2+} regresa a los niveles basales, se disocia nuevamente la calmodulina de nNOS, por lo que el Ca^{2+} funciona como un “switch” para nNOS (Bredt y Snyder, 1994; Rivier, 2003; Guix y col., 2005).

Todas las isoformas de NOS tienen 4 grupos prostéticos: dinucleótido flavina-adenina (FAD), mononucleótido flavina (FMN), un grupo hemo (hierro protoporfirina IX) y tetrahidrobiopterina (BH4). El FAD, el FMN y el grupo hemo son cofactores involucrados en las reacciones reductoras que llevan a la síntesis de NO. El grupo hemo y la BH4 funcionan como sustrato.

La estructura de NOS tiene dos dominios que funcionan de manera independiente. El primero consta de un dominio C-terminal con actividad reductasa que une NADPH, FAD, FMN y Ca^{2+} -calmodulina. La unión de Ca^{2+} y calmodulina desencadena la activación de la apertura de la enzima al flujo de electrones hacia el centro activo de NOS. El dominio N-terminal tiene actividad oxigenasa y contiene los sitios de unión a BH_4 , el grupo hemo y L-arginina (L-Arg). La L-Arg es utilizada por NOS para producir NO y citrulina, en un proceso que requiere NADPH y oxígeno (O_2) (Guix y col., 2005).

En el sistema nervioso central, el NO se libera en grupos neuronales que presentan receptores glutamatérgicos del tipo NMDA y kainato. La estimulación del receptor NMDA genera una corriente entrante de Ca^{2+} que incrementa la concentración de este ión en la terminal sináptica. El Ca^{2+} al unirse a nNOS la activa y así estimula la síntesis de NO. El NO producido en el citoplasma de la célula postsináptica, difunde a través de la membrana en dirección retrógrada hacia la neurona presináptica. Una vez que ha difundido en el citoplasma de la célula presináptica, se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (GCs). Las acciones que realiza la GCs tienen lugar a través de su producto que es el GMPc. El GMPc es un segundo mensajero que interviene en una gran cantidad de procesos biológicos y la especificidad de la respuesta depende de muchos factores tales como el ligando, la isoforma de la GCs ó el tejido donde se encuentre. Al presentarse un incremento en este nucleótido activará a la Proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG), la cuál podrá actuar sobre diversos sustratos y tener diversos efectos biológicos, que van desde la relajación del músculo liso hasta el neurodesarrollo (Esplugues, 2002; Guix y col., 2005).

El NO participa en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos, tanto a nivel del sistema nervioso central como del autonómico (Popeski y col., 1999), tales como excitotoxicidad enfermedades neurodegenerativas, neuroplasticidad y modulación del sistema cardiovascular (Bredt y Snyder, 1994; Guix y col., 2005).

El NO, además influye en la liberación de otros neurotransmisores, a través de la activación de proteínas quinasas dependientes de GMPc, lo que aumenta la fosforilación las proteínas de las vesículas sinápticas asociadas con la liberación del neurotransmisor. También está asociado a la liberación de neuropéptidos desde el hipotálamo y la hipófisis (Seilicovich y

col., 1995), mediando la acción inhibitoria de la dopamina (Duvilanski y col., 1995), regula la liberación de acetilcolina (Buxton y col., 1993; Guevara-Guzmán y col., 1994; Prast y col., 1994; Leonard y col., 1995), de histamina (Prast y col., 1997), de la hormona luteinizante, y de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (Luckman y col., 1997; Rettori y col., 1997). Además de regular la liberación de neurotransmisores, también controla la recaptura del glutamato y de la dopamina (Pögün y Kuhar, 1994).

A nivel del eje HPA, el NO tiene un papel importante en la regulación de las funciones neuroendocrinas, tanto a nivel del hipotálamo como de la hipófisis (Seilicovich y col., 1995; Guix y col., 2005; Rivier, 2003; McCann y col., 1996). De manera consistente con esta función, mediante técnicas de inmunohistoquímica o hibridación in situ, se ha localizado nNOS en diversos núcleos hipotalámicos incluidos el núcleo medial ventral (VMN), el área preóptica media (MPOA), el núcleo supraóptico (SON), así como en las subdivisiones parvo- y magnocelular del PVH. Con respecto a este núcleo, se ha mostrado que nNOS se colocaliza con neuronas que expresan CRH, OT, VP, angiotensina, somatostatina y tirosina hidroxilasa (TH), a estas neuronas que expresan marcadores de NO, como la nNOS o la NADPH-d, se les denomina nitrérgicas (Alonso y col., 1992; Calka y Block, 1993a, 1993b; Miyagawa y col., 1994; Turnbull y Rivier, 1996; Blanco y col., 1997; Rivier, 2002; Guix y col., 2005).

En el PVH, el NO es una de las moléculas mensajeras que se producen en respuesta al estrés, así como por cambios en la presión arterial y durante fallas cardíacas (Guix y col., 2005; Rivier, 2002; Radomski y Moncada, 1993). Sin embargo, también existen condiciones fisiológicas en las cuales se observa un aumento en los niveles de NO en el PVH, como es el caso de la lactancia (Cecatelli y Eriksson, 1993; Otukoyong y col., 2000; Popeski y col., 1999, 2003). Al respecto, evidencias recientes sugieren que el NO tiene un papel importante en la regulación neuronal durante la lactancia (Popeski y col., 2004), mismo que es dependiente del estímulo de la succión (Cecatelli y Eriksson, 1993; Otukonyong y col., 2000, Okere y col., 1999) y su inhibición interrumpe la conducta materna (Popeski y Woodside, 2004 ; Service y Woodside, 2007).

2.6. Lactancia y óxido nítrico

Las adaptaciones fisiológicas y de comportamiento que se observan durante la lactancia están asociados con cambios neuroquímicos en el cerebro materno, muchos de los cuales son dependientes del estímulo de la succión. Entre estos cambios existe un aumento en la expresión de NOS tanto en las regiones magnocelular como parvocelular del PVH (Otukonyong y col., 2000; Popeski y col., 1999; Monasterio y col., 2008), en donde prevalece una colocalización predominante con OT. La síntesis de NOS aumenta cuando el sistema oxitocinérgico se activa, como sucede durante la succión continua o bien su expresión se reactiva al reunirse la camada con la madre después de un periodo de separación (Otukonyong y col., 2000). Asimismo, se ha mostrado que después de la deshidratación se inhibe la producción de NO y aumenta la liberación de oxitocina (Kadowaki y col., 1994; Tilbrook y Clarke, 2006). Por otro lado, se ha sugerido que el NO también tiene una contribución en la conducta materna, ya que la inhibición de NOS afecta algunos aspectos de la conducta materna, como la agresión hacia un intruso o el reflejo de acarreo de las crías hacia el nido (Popeski y col., 2004; Service y Woodside, 2007). Estos resultados sugieren que existe una relación, entre NO y la liberación de OT, y se ha sugerido que el NO puede tener un papel importante en la regulación neuronal durante la lactancia (Popeski y col., 1999, 2003, Monasterio y Morales, 2011), donde el estímulo de la succión tendría un papel fundamental para mantener el nivel basal elevado de NO que prevalece en la lactancia (Cecatelli y Ericksson, 1993; Otukonyong y col., 2000; Okere y col., 1999).

2.7. Óxido nítrico y estrés

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

Evidencia experimental apoya la posible participación del NO en la regulación de la liberación de las hormonas relacionadas con el estrés, ACTH y corticosterona, y se ha encontrado que la actividad de NOS y su transcripción aumentan en el eje HPA después de estímulos estresantes (Rivier, 2002; Guix y col., 2005). También, a través de un mecanismo de retroalimentación, los glucocorticoides regulan la transcripción y activación de NOS después de la activación del eje HPA. Por otro lado, los glucocorticoides aumentan la excitotoxicidad neuronal al aumentar la expresión de receptores a Glu y la inhibición de la recaptura de Glu (Sapolsky y col., 2000).

Si bien, existen evidencias que indican que el NO tiene un importante papel en la regulación del eje HPA, hasta el presente, este papel no está bien definido. Se ha sugerido que el NO puede actuar como mensajero celular en procesos de memoria, plasticidad (Okere y col., 1999) y desarrollo (Guix y col., 2005), al facilitar la activación o liberación de otros neurotransmisores al mediar respuestas del sistema inmunológico (Rivier, 2002; Turnbull y Rivier, 1996), y como vasodilatador en la regulación del flujo sanguíneo (Guix y col., 2005).

Recientemente mostramos que la expresión de marcadores de NO permanece ante un estímulo inmunológico estresante en la rata lactante, mientras que la respuesta activacional del PVH está atenuada (Monasterio y col., 2008) en comparación con ratas vírgenes. La detección de NOS se detectó en la subdivisión parvocelular del PVH, donde se localizan neuronas neuroendocrinas y preautonómicas. Éste y otros reportes indican que el papel biológico del NO depende de numerosos factores donde se incluye a la condición fisiológica del organismo y el tipo e intensidad del estímulo.

Finalmente, el papel del NO en el cerebro de la rata lactante no está completamente entendido, pero diferentes estudios han mostrado que el nivel elevado de este gas en el cerebro de la madre es necesario para promover y mantener la lactancia y las conductas asociadas con esta función.

3. Hipótesis

El aumento en la producción del NO en el PVH durante la lactancia es un factor que contribuye a la atenuación de la respuesta al estrés durante esta fase a través de la modificación de la actividad de CRH.

4. Objetivos

4.1. General:

Caracterizar la contribución del NO en el PVH sobre la atenuación de la respuesta al estrés durante la lactancia.

4.2. Particulares:

Caracterizar la expresión y distribución de los marcadores de activación neuronal (Fos) y de NO ante diferentes estímulos estresantes en el PVH de ratas lactantes.

Determinar si existe una correlación entre la disminución del NO en el PVH de ratas lactantes y la restitución de la respuesta neuroendocrina al estrés.

Analizar la influencia del NO en el PVH durante la lactancia, sobre la expresión de CRH.

2. Materiales y métodos:

2.1. Animales.

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

2.2. Paradigmas experimentales

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

2.2.2. Estrés neurogénico por restricción de movimiento (RM). El reto neurogénico se indujo al restringir de movimiento a los animales en tubos de plexiglass durante 60 minutos. Al término del experimento los animales se regresaron a sus jaulas por 30 minutos. Los animales control fueron separados y puestos en jaulas durante 90 min. Todos los animales fueron perfundidos 90 minutos después de iniciado el experimento.

2.3. Cirugía estereotáxica

Los animales se sometieron a una cirugía estereotáxica para la administración de N ω - nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME 25 μ g/ μ l, Sigma Aldrich, USA) o solución salina isotónica en

el ventrículo lateral. Las cirugías se realizaron bajo una mezcla de xilocina y ketamina (1:3, Cheminova), los animales anestesiados se sujetaron a un aparato estereotáxico (Stoelting) con la barra de los incisivos posicionada a 3.5 mm con respecto a la línea interaural, se practicó un corte longitudinal sobre la piel, fue separada y se retiró el periostio hasta exponer el cráneo, posteriormente se realizó un orificio en las coordenadas correspondientes al ventrículo lateral derecho (AP-1.2, L-1, V-4), de acuerdo a las coordenadas del atlas estereotáxico para esta región (Swanson, 1982).

2.4. Perfusión y obtención de cortes

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

2.5. Inmunohistoquímica

Los patrones de activación neuronal se detectaron por medio de la localización inmunohistoquímica de la proteína Fos, producto de la expresión del gen temprano c-Fos. Esta técnica ha sido empleada extensivamente para el mapeo de áreas del cerebro activadas por varios estímulos estresantes, incluida la inmovilización (26). La expresión de mRNA de c-Fos e inmunoreactividad a Fos por inmovilización han sido detectados en un amplio rango de estructuras corticales, límbicas, hipotalámicas y de médula espinal, incluidos el PVH y la amígdala (Wintrip y col., 1997). La detección inmunohistoquímica de Fos se realizó con un método estándar de peroxidasa (Sawchenko y col., 1990) usando un anticuerpo policlonal (Santa Cruz; 1:5000) purificado por afinidad, inducido en conejo contra un péptido sintético correspondiente a los residuos 4-17 de la porción N-terminal de la

proteína Fos humana. Este anticuerpo no muestra actividad cruzada con cualquier antígeno identificado y relacionado con Fos.

El revelado se llevó a cabo mediante una técnica convencional de peroxidasa asociada con avidina-biotina, ya que da una mayor sensibilidad en términos de la cantidad de marca enlazada al sitio antigénico. El doble marcaje para Fos y nNOS, se realizó en secuencia, primero la localización de la inmunorreactividad a Fos con un protocolo estándar con níquel (coloración negra), seguida de la incubación en antisuero para nNOS (Chemicon, 1:5000) y la identificación de la inmunorreactividad de nNOS sin níquel (color café). Adicionalmente se realizaron detecciones inmunohistoquímicas con anticuerpos policlonales para los péptidos OT, VP y CRF (Chemicon, 1:2000) que se revelaron utilizando un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés)

2.6. Hibridación in situ

Se determinó la expresión del RNA mensajero (mRNA) de CRF mediante la técnica de hibridación *in situ*. La detección *in situ* provee una visualización directa de la localización de secuencias específicas de RNA para dilucidar la función génica, esta técnica toma como fundamento la complementariedad de los ácidos nucleicos.

La hibridación se llevó a cabo con un vector de transcripción (pBluescript SK+) el cuál contenía un inserto de EcoR1 de 1.2 kb con cDNA de CRF de rata. La sonda para el mRNA fué transcrita a partir de plásmidos linearizados con HindIII y marcada con [³⁵S]-uridina trifosfato (NEN Life Sciences Products, Boston MA, USA). El tejido se montó en laminillas previamente tratadas con polyisina, se post-fijaron en paraformaldhído al 4%, posteriormente fueron tratadas con proteinasa K en una solución que contenía 10 mg/ml en Tris 50 mM, ajustado a pH 8, y EDTA 5 mM a 37C por 20 minutos, el tejido se acetiló (anhidro acético al 0.25% en 0.1 M triethanolamine ajustado a pH 8), y se deshidrató en tren gradual de alcoholes. Se adicionaron 100 microlitros de la mezcla de hibridación (50% formamida, 0.3 M NaCl, 10 mM Tris ajustado a pH 8, 2 mM EDTA, solución de Denhardt 1x, dextran al 10%, 0.5 mg/ml de tRNA de levadura) que contenía un oligo marcado con 35S-UTP (107 d.p.m./ml) que se adicionó a las laminillas, se realizó la hibridación durante toda

la noche a 56°C. Se enjuagaron las laminillas en SSC 4x (1x SSC: 0.15 M NaCl y 15 mM citrato sódico, pH 7), fueron digeridas en ribonucleasa A (20 mg / ml, en solución amortiguadora de Tris-EDTA con 0.5 M NaCl a 37°C durante 30 minutos), se les quitaron las sales gradualmente y se lavaron en SSC 0.1x a 65–75°C durante 30 min. Las laminillas se dejaron secando durante dos horas y posteriormente se colocaron contra una pantalla de fósforo de baja energía durante cuatro días y se escanearon en un aparato que detecta las imágenes impregnadas de fósforo (Phosphoimager) (FLA-3000; Fuji PhotoFilm, Inc., Elmsford, NY, USA). Las imágenes se obtuvieron en el Phosphoimager, utilizando el software BASReader y se cuantificaron las medias y la densidad óptica integrada con el programa Advanced Image Data Analyser (AIDA 3.1, Raytest Isotopenmessgerate GmbH Straubenhardt, Germany). Las mediciones del PVH fueron hechas en cada rebanada a las que se les restó el fondo seleccionado de cada laminilla como una región de interés de la misma área. El análisis estadístico se realizó con el software Statistica version 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.7. PCR en tiempo real

El análisis semicuantitativo de los niveles de mRNA del gen de CRH, se desarrolló mediante el empleo de la técnica RT-PCR en tiempo real (Transcripción reversa – Reacción en cadena de la polimerasa). Para la reacción de RT se usaron 2,5 µg de RNA total como molde para generar el cDNA y los siguientes reactivos: 6 µL de Buffer 5X first strand tampon (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15mM MgCl, 50mM DTT) (Invitrogen, Inc), 1,6 µL MgCl₂ (Invitrogen, Inc), 0,5 µL de dNTP (Invitrogen, Inc), 1,6 µL Randon Primers (Invitrogen, Inc), 0,8 µL de inhibidor de RNasa (Invitrogen, Inc), 8 µL Transcriptasa reversa (Invitrogen, Inc) (Tabla 1). La mezcla de reacción se utilizó en las diluciones recomendadas por el fabricante, en volúmenes finales 20 µL.

La RT se incubó durante 50 minutos a 37°C y luego a 42°C durante 15 minutos. El enzima se inactivó mediante calentamiento a 96°C durante 5 minutos y posterior enfriamiento a 4°C. La RT se realizó en el termociclador iCycler BioRad con bloque dual del fabricante BioRad Laboratories. El cDNA sintetizado fue amplificado por PCR en tiempo real empleando 2,5 µL de los productos de la RT, *SYBR Green I PCR Master mix 10X (Light cycler DNA Master*

SYBR Green I Roche Applied Science), *primer* diseñado para el gen A partir de la secuencia reportada en el *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para *Rattus norvegicus* y los *primers* de ciclofilina. Para comprobar la eficiencia de la Transcripción reversa, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa para el gen de expresión constitutiva (“housekeeping”) que en este caso fue ciclofilina.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el equipo Real-Time PCR System 7500 de Industrias Applied Biosystems. Las condiciones de reacción de PCR se estandarizaron de acuerdo a las temperaturas de fusión (T_m) de los *primers* diseñados y consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 96°C durante 2 minutos seguidos por 40 ciclos de amplificación que consistieron en desnaturalización a 96°C durante 15 segundos; alineamiento a 64°C durante 15 segundos y elongación a 72°C durante 15 segundos, con medida de la fluorescencia a 80°C en cada ciclo. Finalmente, el análisis de la curva de fusión consistió en un ciclo a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 15 segundos y una elevación de la temperatura a 80°C con pendiente de $0.2^{\circ}\text{C/segundo}$ con medida continua de la fluorescencia.

La especificidad de los *primers* y la calidad del RNA extraído se establecieron por la curva de fusión de cada gen. Todas las muestras se estandarizaron contra la expresión del gen constitutivo control ciclofilina.

La identidad de los productos amplificados de la PCR se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en TAE 1X (TAE 50X: Trizma base 2M, EDTA 50mM, ácido acético glacial 8mM (Merck)) y para la visualización se utilizó Bromuro de Etidio, se cargaron 12 μl totales por carril de los cuales 10 μl correspondían al producto amplificado y 2 μl al buffer de carga (50% glicerol (Sigma), 0.25% azul de bromofenol (Merck)). La visualización de los fragmentos se realizó en el documentador de imágenes por transiluminación de luz ultravioleta *ChemiGenius2 Bio Imaging System* (Syngene) acoplado a un sistema de imagen digital, que se utilizó también para cuantificar la densidad óptica de las bandas.

2.8. Histoquímica para NADPH-diaforasa

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

2.9. Determinación de nitratos y nitritos

Después del tratamiento correspondiente, los animales fueron sacrificados por decapitación. Se disecaron los hipotálamos del resto del cerebro en fresco e inmediatamente después de su obtención las muestras fueron congeladas y conservadas a -20C° , hasta su procesamiento. La concentración total de nitratos y nitritos (NOx), se utiliza como índice de la cantidad de NO producida por medio de la conversión enzimática de nitratos a nitritos, basándose en la reacción de Griess.

Cada muestra de tejido fue homogenada en 200 μl de agua desionizada y centrifugadas a 10,000 g a 10C° durante 15 minutos, se obtuvieron 50 μl de cada sobrenadante y se mezclaron con 20 μl de una mezcla que contenía NADPH 0.86 mM, FAD 0.11 mM, y 20 mU de nitrato reductasa. Las muestras se incubaron durante una hora en la oscuridad a temperatura ambiente, posteriormente se agregó a cada muestra 5 μl de 1 M ZnSO_4 para precipitar las proteínas. Nuevamente se centrifugaron las muestras a 6,000 g a 4C° durante 5 minutos y se recuperaron los sobrenadantes. A cada 50 μl de los sobrenadantes obtenidos se agregó el reactivo de Griess (100 μl , 1:1 en una mezcla de 1% sulfanilamida en 5% de H_3PO_4 y 0.1% de N-1-naftyl ethylenediamine) y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. La placa fue leída inmediatamente después de detener la reacción a 590 nm en un lector automatizado para ELISA (Bio Rad, Hércules, CA, USA). La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford, los datos obtenidos en densidad óptica fueron corregidos por nmol $\text{NOx}/\mu\text{g}$ proteína.

2.10. Cuantificación de corticosterona

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

2.11. Cuantificación de interleucinas

Con la finalidad de conocer la respuesta del sistema inmunológico ante la inyección de ovoalbúmina, se determinaron los niveles de dos de las interleucinas que participan en procesos anafilácticos. Se cuantificó la concentración de Interleucinas 1 α y 6 en suero obtenido de los animales en las diferentes condiciones hormonales y experimentales. Se uso un kit (Rat interleukin 1 α y 6, Biosource Camarillo CA, USA.) que utiliza la técnica ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) que se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto se tiñe para ser medido espectrofotométricamente. La placa fue leída inmediatamente después de detener la reacción a 450 nm en un lector automatizado para ELISA (Bio Rad, Hércules, CA, USA).

2.12. Procesamiento de imágenes

Se determinaron los niveles relativos de expresión de Fos y NADPH-d con el uso de un microscopio y se tomaron fotomicrografías de secciones representativas de las áreas

cerebrales que muestran activación, con la ayuda del atlas del cerebro (Swanson, 1998) para la localización de las regiones de interés. Las imágenes fueron obtenidas en los microscopios marca Nikon Eclipse 600 y Zeiss LSM 510 Meta a una amplificación de 20x, capturadas con una cámara (Nikon) a nivel de microscopio y procesadas posteriormente con el programa IpLab (BD Biosciences- Bioimaging Division).

2.13. Análisis estadístico

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

6. RESULTADOS

Determinación cuantitativa de la expresión de Fos inducida por estrés por ovoalbúmina o restricción de movimiento. La cuantificación de la expresión de Fos, se realizó mediante el conteo de núcleos celulares con marca positiva. Dicho conteo se realizó en todas las rebanadas de tejido que contenían el PVH, aproximadamente 6 por animal, en una de las 5 series colectadas.

La gráfica en la Figura 2 muestra que el PVH de las ratas del grupo en diestro presenta un aumento significativo de núcleo positivos a c-Fos ante ambos tipos de estrés con respecto a sus controles ($P < 0.05$). Asimismo, se observa que el PVH de las ratas lactantes presenta una tendencia hacia el aumento ante ambos retos, misma que no es estadísticamente mayor a la observada en sus controles. Los dos estímulos estresantes estudiados producen mayor activación en el PVH de las hembras en diestro en comparación con las hembras lactantes que estuvieron expuestas al mismo estímulo ($P < 0.05$).

Los resultados de los conteos de núcleos positivos a Fos en la amígdala muestran un aumento de células activas en respuesta tanto a la inyección de ovoalbúmina como a la restricción de movimiento en las hembras en diestro con respecto a sus respectivos controles. Dicho incremento fue mayor en respuesta al reto neurogénico, en comparación con su respectivo control y con el número de células positivas en hembras lactantes que recibieron el mismo tratamiento. Las hembras lactantes sólo mostraron diferencia entre el número de células positivas después de la restricción de movimiento con respecto a su control ($P < 0.05$, Figura 2).

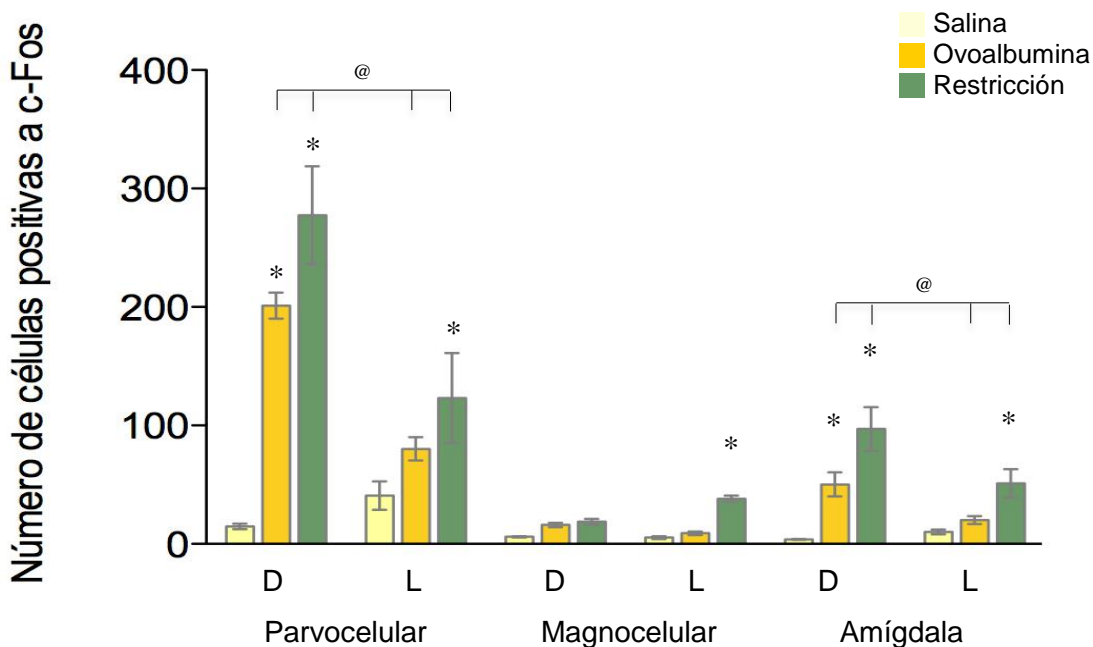


Figura 2. Número de células positivas a c-Fos en el PVH después de los estímulos estresantes. Aumento en el número de células reactivas a fos en el PVH de ratas en diestro (D) con respecto a sus controles y a las hembras lactantes (L) ante ambos estímulos y regiones. Existe un incremento en el número de células positivas en la amígdala de ratas en diestro en respuesta a los estímulos estresantes y en hembras lactantes después de la restricción de movimiento, con respecto a sus controles. Los valores expresados como media \pm E.E.M., $n = 6$ por grupo, análisis realizado por ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P < 0.05$.

Localización de la expresión de Fos inducida por la administración de ovoalbúmina o por restricción de movimiento. La inyección ip de ovoalbúmina (OVO) induce una respuesta inmunológica de tipo anafilactoide en los animales y se emplea como un modelo experimental de estrés inmune. Este tratamiento con OVO indujo una distribución de la señal de la inmunoreactividad a Fos casi exclusivamente en la región medial parvocelular del PVH, que se sabe contiene a las células que producen CRH, TRH y otros péptidos (Figura 3), tanto en ratas en diestro como lactantes, sin embargo, éstas últimas presentaron un menor número de células reactivas ante el reto. La restricción de movimiento indujo un patrón similar de activación al observado con la ovoalbúmina, los núcleos positivos se observaron casi exclusivamente en la región parvocelular del PVH de ratas en diestro y lactantes (Figura 4). Aún cuando los estímulos estresantes son de naturaleza diferente, los patrones de activación fueron similares y en ambos casos las ratas lactantes presentaron un menor número de células reactivas a Fos en comparación con el grupo de hembras en diestro.

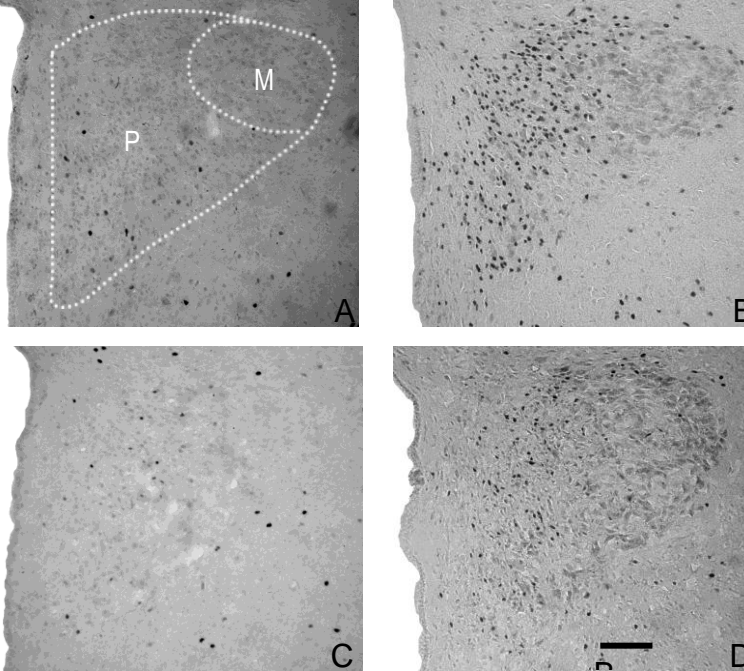


Figura 3. Localización de células reactivas a Fos en el PVH de hembras en diestro y lactantes después de la administración de ovoalbúmina. Fotomicrografías representativas del PVH de hembras que recibieron salina; A) Diestro, C) Lactantes, o ovoalbúmina B) Diestro, D) Lactantes. La inmunoreactividad se localizó principalmente en la región parvocelular del PVH en respuesta al estrés inmune. M) Región magnocelular, P) región parvocelular del PVH.

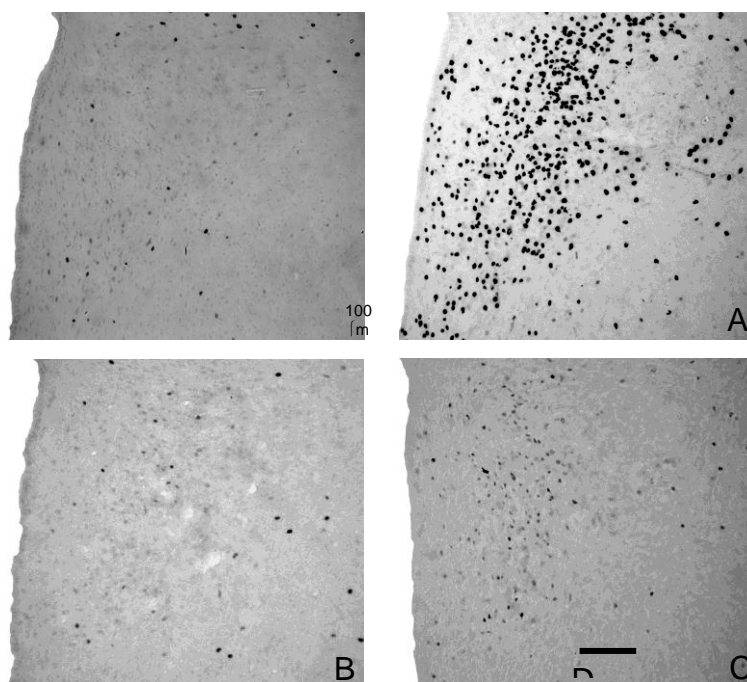


Figura 4. Localización de células reactivas a Fos en el PVH de hembras en diestro y lactantes después de restricción de movimiento. Fotomicrografías representativas del PVH de hembras que no fueron manipuladas; A) Diestro, C) Lactantes, o que se restringieron de movimiento B) Diestro, D) Lactantes. La inmunoreactividad se localizó principalmente en la región parvocelular del PVH en respuesta al estímulo estresante.

Cuantificación de células positivas a NADPH-diaforasa en el PVH en respuesta a los estímulos estresantes. El conteo de las células positivas a la enzima NADPH-d se utilizó como índice de actividad sintética de NOS. El marcaje para NADPH-d en el PVH de las hembras en diestro aumentó significativamente después de ambos estímulos estresantes con respecto a su control ($P < 0.05$, Figura 5). Además, no se observaron diferencias en el número de células entre la administración de ovoalbúmina y la restricción de movimiento. Las hembras lactantes muestran un nivel basal de células marcadas con la diaforasa mayor que el grupo en diestro correspondiente, sin embargo, no presentaron cambios en el número de células positivas a NADPH-d después de la aplicación de ninguno de los dos estímulos estresantes con respecto a su control (Figura 5).

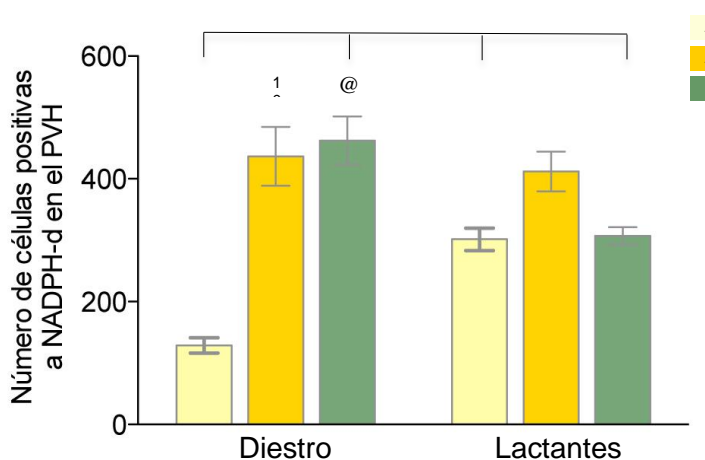


Figura 5. Número de células positivas a NADPH-d en el PVH después de los estímulos estresantes. Los estímulos estresantes aumentan el número de células marcadas con NADPH-d en el PVH de ratas en diestro con respecto a su control. En las hembras lactantes los retos aplicados no modificaron el número de células positivas a la diaforasa. Los valores expresados como media \pm E.E.M., $n = 6$ por grupo, análisis realizado por ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P < 0.05$.

Localización de NADPH-diaforasa en el PVH después de los estímulos estresantes.

Los resultados de la histoquímica para NADPH-d muestran que después del reto inmunológico (OVO), el marcaje para esta enzima se observa en las neuronas de la región parvocelular ventral del PVH de los animales en diestro. El grupo control de esta condición, mostró mínima expresión de la diaforasa dispersa en el PVH (Figuras 6-A, B). En el PVH de las ratas lactantes se observó la marca alrededor de la región magnocelular, que se sabe

contiene a las neuronas de OT y VP que proyectan a la eminencia media. Sin embargo, ésta fue más intensa en la región parvocelular dorsal y ventral. El grupo control sólo presentó marca en algunas neuronas de la región parvocelular medial (Figuras 6-C, D).

De manera similar al reto inmunológico, la restricción de movimiento provocó una densa reactividad a β -NADPH en el PVH del grupo en diestro, distribuida de manera dispersa en las diferentes regiones del PVH, y el grupo control presentó pocas células con marca (Figura 7-A, B). En el grupo de las ratas lactantes, se observa un marcaje intenso en la región parvocelular, particularmente en la porción ventral y en la región magnocelular, en el área donde se localizan las neuronas oxitocinérgicas (Figura 7-C). A un lado se muestra una imagen representativa del PVH del grupo de lactantes control (Figura 7-D), en donde sólo células de la porción parvocelular presentaron el marcaje.

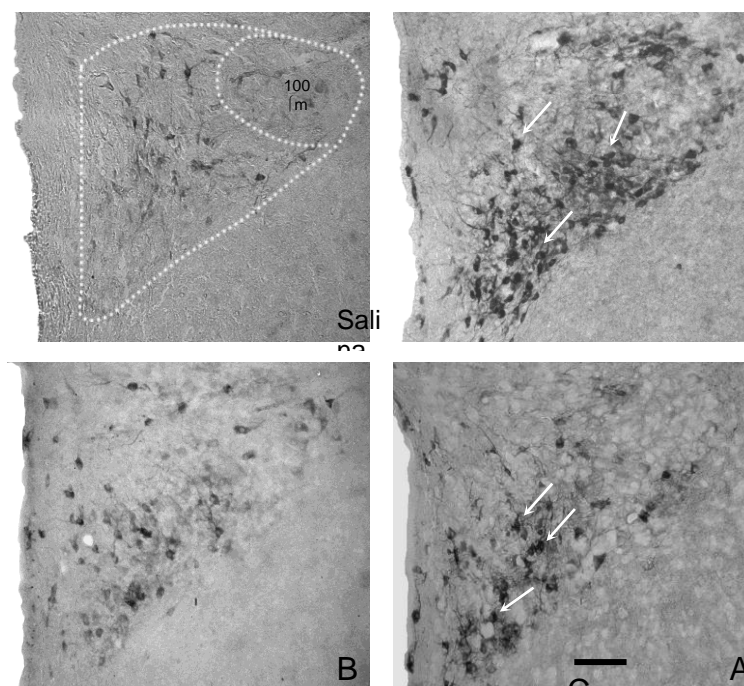


Figura 6. Efecto de la administración de ovoalbúmina sobre la localización de NADPH-diaforasa en el PVH. Fotomicrografías representativas del PVH después de la administración de salina a hembras en diestro A) o lactantes; C) o que recibieron ovoalbúmina en B) diestro y D) lactantes. M) Región magnocelular, P) región parvocelular del PVH.

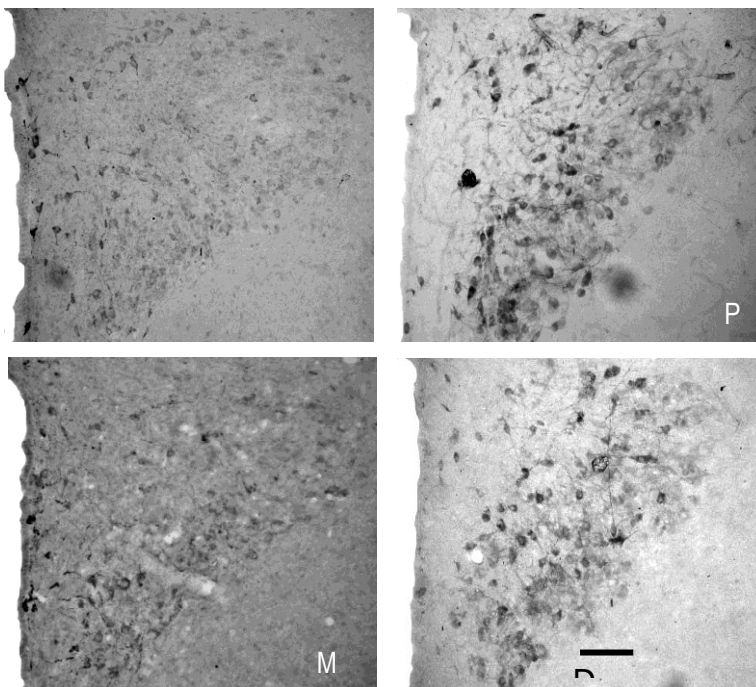


Figura 7. Efecto de la restricción de movimiento sobre la localización de NADPH-diaforasa en el PVH. Fotomicrografías representativas del PVH de hembras en diestro A) o lactantes; C) que no fueron manipuladas o después de la restricción de movimiento en B) diestro o D) lactantes.

Determinación cuantitativa de la expresión de nNOS en el PVH inducida por ovoalbúmina o restricción de movimiento. La cuantificación de las neuronas positivas para la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) se realizó en todas las rebanadas de tejido que contenían el PVH, 6 por animal, en una de las 5 series colectadas.

La gráfica en la Figura 7 muestra que las ratas del grupo en diestro presentan un aumento significativo de neuronas positivas a nNOS ante el estrés por ovoalbúmina o restricción de movimiento con respecto a sus controles ($P < 0.01$, Figura 8) y con el grupo de hembras lactantes que recibieron el mismo tratamiento ($P < 0.01$, Figura 8). Sin embargo, las hembras lactantes no mostraron un aumento en el número de neuronas positivas para la sintasa después de los retos con respecto a sus controles.

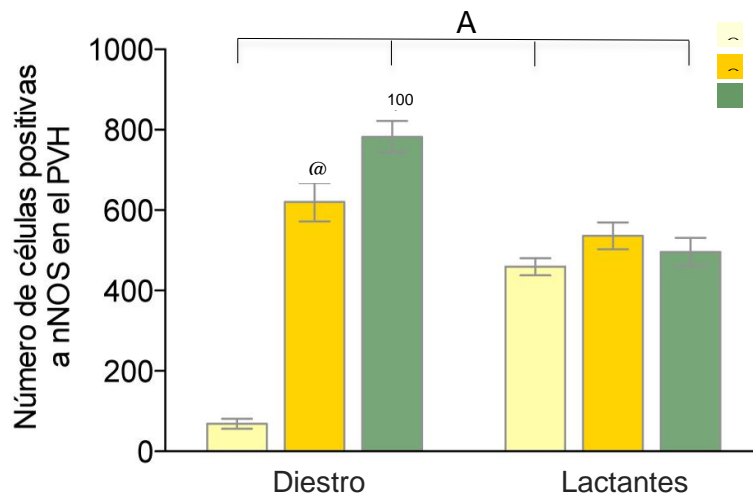


Figura 8. Número de células positivas a nNOS en el PVH después del estímulo estresante. Aumento en el número de neuronas marcadas para nNOS en el grupo de hembras en diestro después de los estímulos estresantes con respecto a sus controles, las hembras lactantes no mostraron cambios ante los estímulos. Los valores expresados como media \pm E.E.M., $n=6$ por grupo, análisis realizado por ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P < 0.01$.

Localización de nNOS en el PVH después de los estímulos estresantes. Las neuronas positivas a la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) en el PVH de las hembras en diestro control se localizaron en la región parvocelular, esta región contiene principalmente neuronas que producen CRH y TRH, y durante la lactancia también OT y VP, que proyectan hacia la eminencia media, centros autonómicos del tallo cerebral y la médula espinal. La inyección de ovoalbúmina provocó un aumento en el número de células positivas tanto en la porción parvocelular como alrededor de la región magnocelular, que por su localización se sabe que corresponde a las neuronas de OT que proyectan al lóbulo posterior de la hipófisis (Figuras 9-A, B). El estrés por restricción de movimiento provocó una distribución e incremento de neuronas marcadas para nNOS en la porción parvocelular y magnocelular (10-A, B), similar a la observada con la ovoalbúmina. La marca de nNOS coincide con la observada para NADPH-d tanto en la condición control como después del estrés inmune o neurogénico. Por otro lado, las hembras lactantes presentaron una marca positiva a nNOS predominantemente en la región parvocelular del PVH en la condición control, misma que no mostró cambios tanto en número de neuronas reactivas como en la localización ante ninguno de los retos presentados (Figuras 9-B, C, 10-B, C).

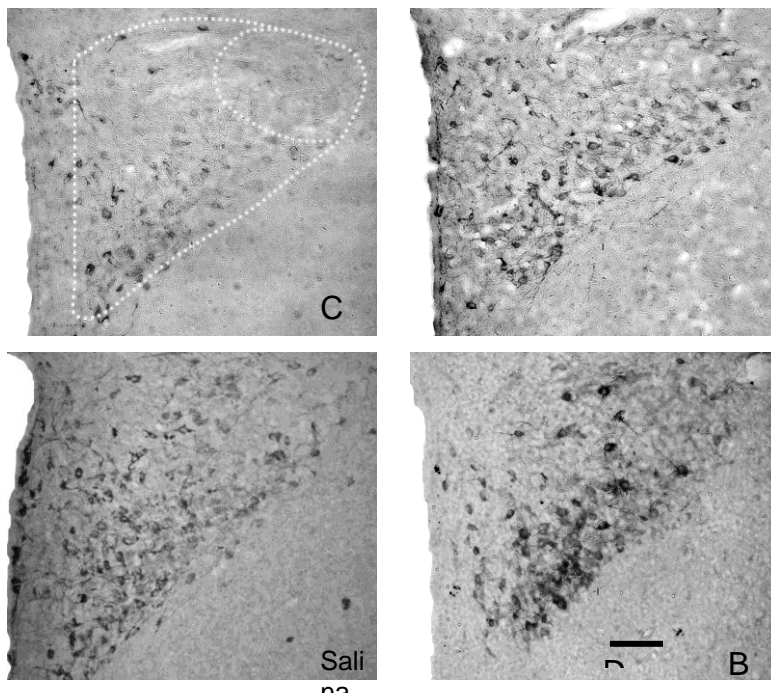


Figura 9. Efecto de la de la administración de ovoalbúmina sobre la localización de nNOS en el PVH. Fotomicrografías representativas del PVH después de la inyección de salina icv. a hembras en diestro A) o lactantes; C) o que recibieron ovoalbúmina ip. en B) diestro o D) lactantes.

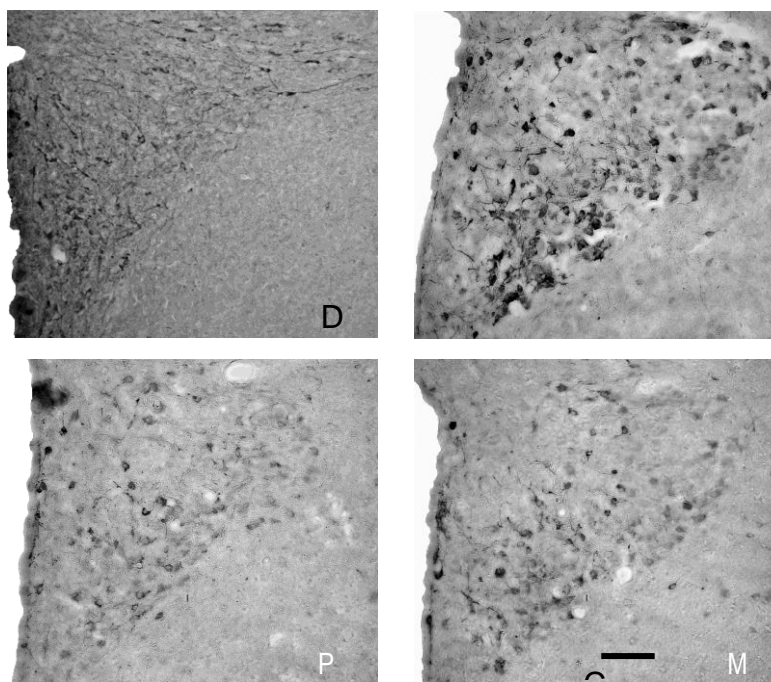


Figura 10. Efecto de la de la administración de ovoalbúmina sobre la localización de nNOS en el PVH. Fotomicrografías representativas del PVH después de la inyección de salina icv. a hembras en diestro A) o lactantes; C) o que recibieron ovoalbúmina ip. en B) diestro o D) lactantes.

Determinación de nitratos y nitritos. Para conocer la cantidad de NO total (NOx) que se

produjo en el hipotálamo usamos como como índice de producción la reducción de nitratos a nitritos, dos metabolitos estables que subyacen a la producción de NO. La determinación de estos metabolitos mostró que las hembras en diestro presentan un aumento de NOx tanto al aplicarse el estrés inmune como el neurogénico en comparación con su control que recibió salina ip. Las hembras lactantes, que muestran un nivel basal de NOx mayor al de las hembras en diestro, no se modificó al aplicarse los estímulos estresantes, así como además no se encontraron diferencias entre los dos tipos de estrés ($P < 0.05$, Figura 11).

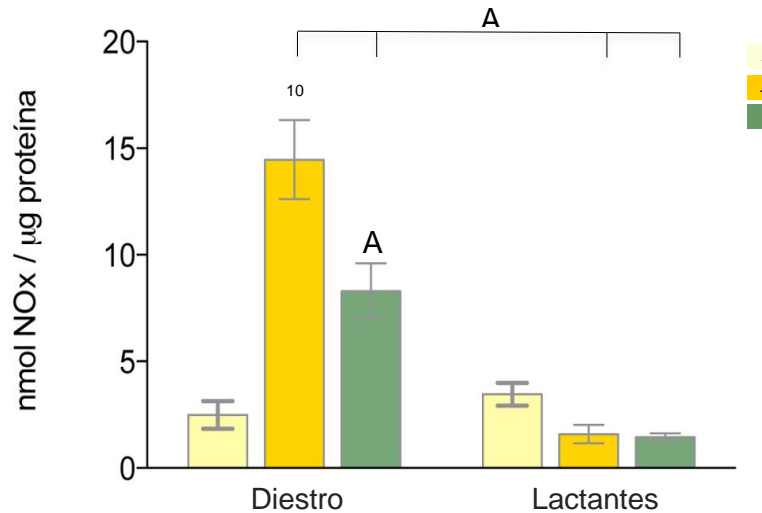


Figura 11. Determinación de nitratos y nitritos en el hipotálamo después de los estímulos estresantes. Se detectó un incremento por encima del nivel basal en la producción de NOx en el hipotálamo de las hembras en diestro al aplicarse los estímulos estresantes, dicho aumento fue diferente entre los estímulos. El grupo de lactantes no mostró modificaciones en el nivel de NOx al aplicarse los estímulos estresantes. Los valores expresados como media \pm E.E.M., $n = 6$ por grupo, análisis realizado por ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P < 0.05$.

Determinación del fenotipo neural que participa en la respuesta al estrés inducida por ovoalbúmina o restricción de movimiento. Se realizaron inmunohistoquímicas para oxitocina (OT), vasopresina (VP) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) con el fin de conocer si estos neuropéptidos, involucrados en la respuesta neuroendócrina al estrés, también participan en la respuesta de las ratas lactantes ante los estímulos utilizados en este trabajo. Además, en algunos casos se realizaron marcajes dobles para la diaforasa del óxido nítrico y estos péptidos, con el fin de conocer si existe colocalización.

El reto con ovoalbúmina produjo una distribución de la marca para neuronas oxitocinérgicas en el PVH de las ratas en diestro predominantemente en la región magnocelular, también se observan algunas neuronas en la porción parvocelular ventral con inmunoreactividad a OT. El PVH de las ratas lactantes muestran pocas neuronas marcadas, en comparación con diestro, que se localizaron en la región magnocelular (Figuras 12-A, C). En la Figura 12-B se muestra una imagen del PVH de ratas en diestro, donde se observa que la señal positiva a oxitocina se localizó en las regiones medial y ventral parvocelular, así como también en las neuronas alrededor de la región magnocelular. El PVH de las lactantes muestran la misma localización de neuronas oxitocinérgicas ante la restricción de movimiento, aunque aparentemente en menor número que las de diestro (Figura 12-D). En ambos retos, las neuronas presentaron colocalización de OT y NADPH-diaforasa únicamente en la porción parvocelular ventral del PVH.

La localización de las neuronas positivas para VP después del reto con OVO se observó principalmente en la región parvocelular y se observan pocas neuronas en la región magnocelular del PVH tanto de las hembras en diestro como de las hembras lactantes, ante este reto el número de neuronas positivas entre las dos condiciones hormonales es aparentemente similar (Figuras 13-A, C). Por otro lado, después de la restricción de movimiento se localizaron neuronas positivas para VP exclusivamente en la región magnocelular del PVH de las hembras en diestro, mientras que las ratas lactantes presentaron neuronas vasopresinérgicas en dicha región así como también dispersas por la región parvocelular del PVH (Figuras 13-B, D). Se observó colocalización escasa entre VP y NADPH-diaforasa y esta última se localizó tanto en la región magnocelular como en algunas neuronas parvocelulares ventrales.

Los dos estímulos estresantes utilizados generaron un patrón de neuronas positivas a CRH similar en el PVH de las ratas en diestro, esta se localizó en la región dorsal y medial parvocelular (Figuras 14-A, B). Sin embargo, el PVH de las hembras lactantes presentó un número limitado de neuronas marcadas para CRH que se localizaron exclusivamente en la porción dorsal parvocelular de este núcleo (Figuras 14-C, D). Se observó colocalización entre CRH y NADPH-diafosara escasa, localizada principalmente en las neuronas parvocelulares mediales del PVH de las hembras en diestro, en estos resultados preliminares no se ha

observado aún colocación en el tejido de las ratas lactantes.

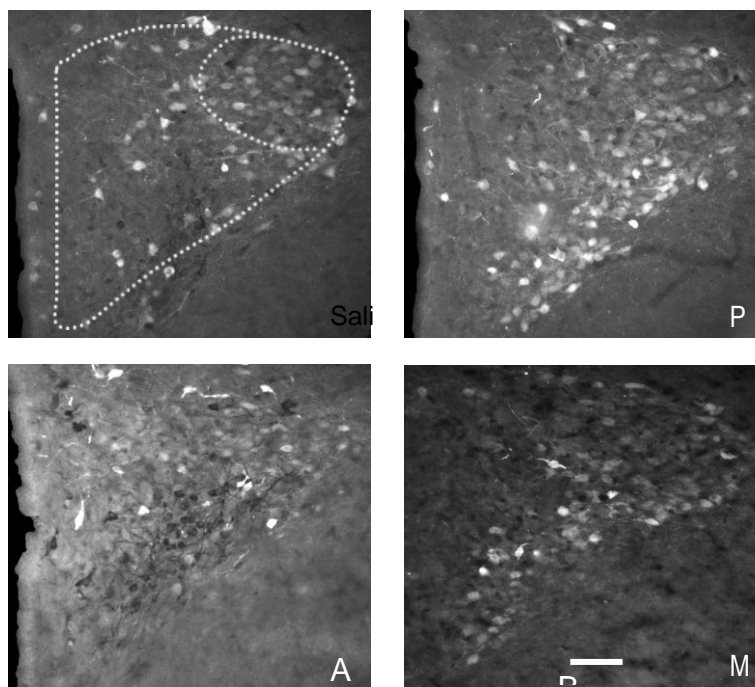


Figura 12. Distribución de células oxitocinérgicas en el PVH después de un estímulo estresante. Fotomicrografías representativas del PVH de hembras en diestro (A) o lactantes (C) que recibieron ovoalbúmina o que se sometieron a restricción de movimiento, diestro (B) y lactantes (D).

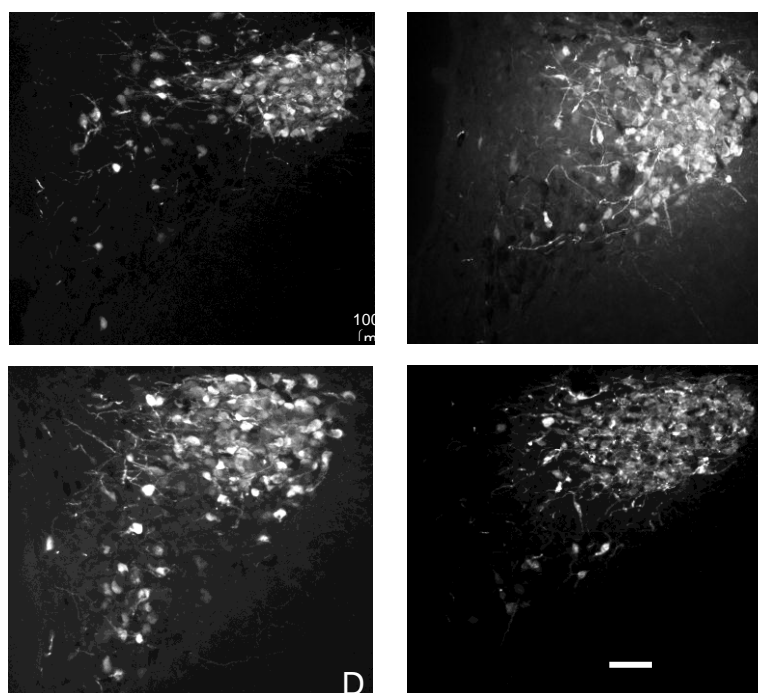


Figura 13. Distribución de las células positivas a Vasopresina en el PVH después de los estímulos estresantes. Fotomicrografías representativas del PVH de hembras en diestro A) o lactantes C) que recibieron ovoalbúmina ip. o que se sometieron a restricción de movimiento; diestro B) y lactantes D).

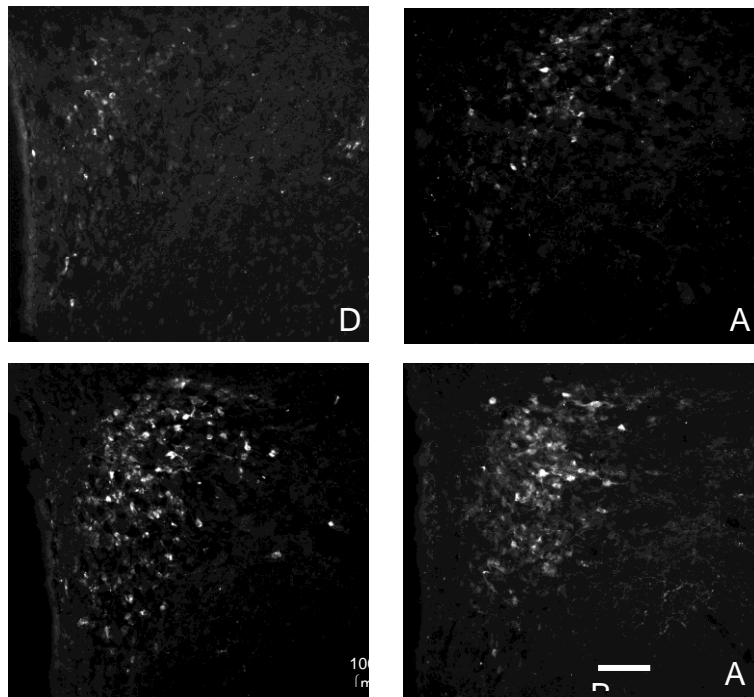


Figura 14. Localización de células reactivas a CRH en el PVH después de los estímulos estresantes. Fotomicrográficas representativas del PVH de animales que recibieron ovoalbúmina ip hembras en diestro A) y lactantes C) o que se sometieron a restricción de movimiento; en diestro B) y lactantes D).

Expresión de RNA mensajero de CRH en el PVH y la amígdala en respuesta al estrés.

Se realizó la determinación de la expresión del RNA mensajero de CRH por hibridación in situ. La cuantificación muestra un incremento en el PVH de las hembras vírgenes a las que se les administró ovoalbúmina o se les sometió a restricción de movimiento con respecto a su control ($P < 0.05$, Figura 15). Las hembras lactantes no mostraron diferencias en la expresión basal de mRNA de CRH en el PVH en comparación con las hembras vírgenes, tampoco se registraron cambios después de los estímulos estresantes en dicho núcleo. La expresión de CRH en la amígdala aumentó al aplicarse el estrés por restricción de movimiento con respecto al grupo control en ambos grupos, sin embargo no hubo diferencias entre las dos condiciones hormonales (Figura 15). No se encontraron diferencias significativas entre el nivel basal y el estimulado con ovoalbúmina en la amígdala en ambas en ninguno de las dos condiciones hormonales.



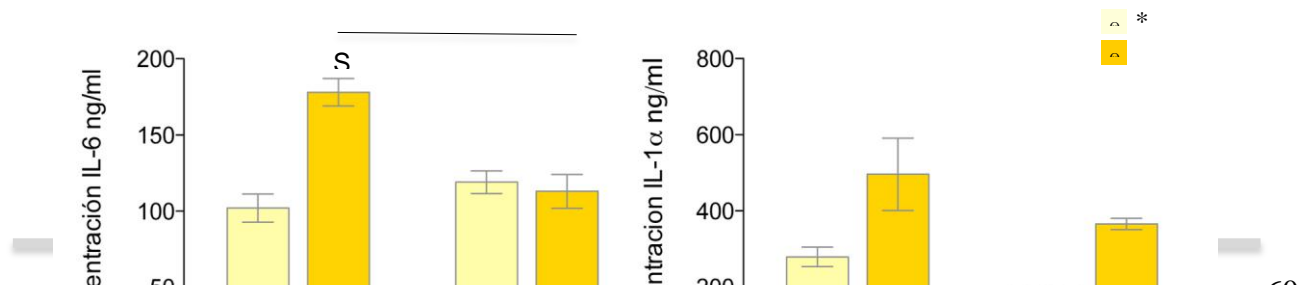
@



Diestro Lactantes Diestro Lactantes

Figura 15. Expresión de RNA mensajero de CRH en el PVH y la Amígdala en respuesta a ovoalbúmina o restricción de movimiento. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n= 4$ por grupo, análisis realizado por ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P<0.05$.

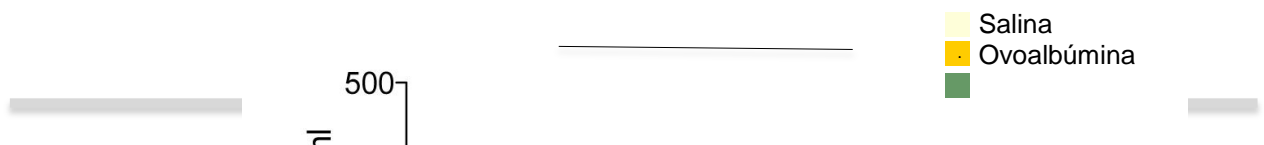
Concentración de interleucina 6 y 1 α . Se determinaron las concentraciones de interleucinas 6 y 1 α (IL-6 y IL1 α , respectivamente) en el plasma obtenido de los animales a los que se les administró ovoalbúmina para conocer si este estímulo estresante lograba la activación general del sistema inmunológico. Las determinaciones por el método de ELISA muestran un aumento significativo en la concentración de IL-6 después de la administración de ovoalbúmina tanto en las hembras en diestro como en las lactantes con respecto a sus controles (Figura 16). Además se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos después del tratamiento. La administración de ovoalbúmina provocó un aumento significativo en el nivel de IL1- α tanto en las hembras en diestro como en las lactantes con respecto a sus controles, sin embargo no se encontraron diferencias entre los dos grupos experimentales después del tratamiento con ovoalbúmina (Figura 16).



Diestro Lactantes Diestro Lactantes

Figura 16. Concentración de interleucinas en respuesta al reto inmunológico. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n= 5$ por grupo. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P<0.05$.

Concentración de Corticosterona plasmática. Se cuantificó la concentración de corticosterona (CORT) circulante en plasma de los animales en las diferentes condiciones experimentales, mediante un kit comercial que utiliza el método de inmunoensayo competitivo. Los resultados obtenidos muestran un aumento en la concentración de CORT en las hembras en diestro después de la inyección de OVO o de la restricción de movimiento con respecto a su control ($P<0.05$, Figura 17). Además se observa una mayor concentración de CORT en el grupo control de las ratas lactantes con respecto a las hembras en diestro control, lo cual concuerda con la noción previa acerca del incremento en el nivel basal de CORT durante la lactancia. En contraste, el grupo de ratas lactantes tratado con OVO o sometidas a restricción de movimiento, no presentaron un aumento en la concentración de CORT significativo ante estos estímulos en comparación con su grupos controles ($P<0.05$, Figura 17). El grupo de ratas en diestro, muestra un aumento significativo en la concentración de CORT plasmática inducido por el tratamiento con OVO en comparación con sus controles y con las hembras lactantes que recibieron el mismo tratamiento o con restricción de movimiento ($P<0.05$, Figura 17).



Diestro

Lactantes

Figura 17. Concentración de corticosterona plasmática en respuesta al reto inmunológico o neurogénico. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, n= 5 por grupo., análisis realizado por ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes P<0.05.

Efecto del inhibidor del óxido nítrico L-NAME sobre la expresión basal de c-Fos. La administración intracerebroventricular del inhibidor de NO provocó un aumento significativo en el número de células reactivas a Fos en las dos subdivisiones del PVH en hembras en diestro, sin embargo se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales en respuesta al L-NAME ($P < 0.05$, Figura 18). Esta inhibición únicamente resultó en un aumento en células activas en la región magnocelular del PVH de ratas lactantes. Con respecto a la amígdala, la inyección de L-NAME promovió un aumento en las células positivas a Fos en ambas condiciones hormonales con respecto al control, así como la respuesta de las hembras lactantes en este núcleo fue mayor que la observada en diestro ($P < 0.05$, Figura 18).

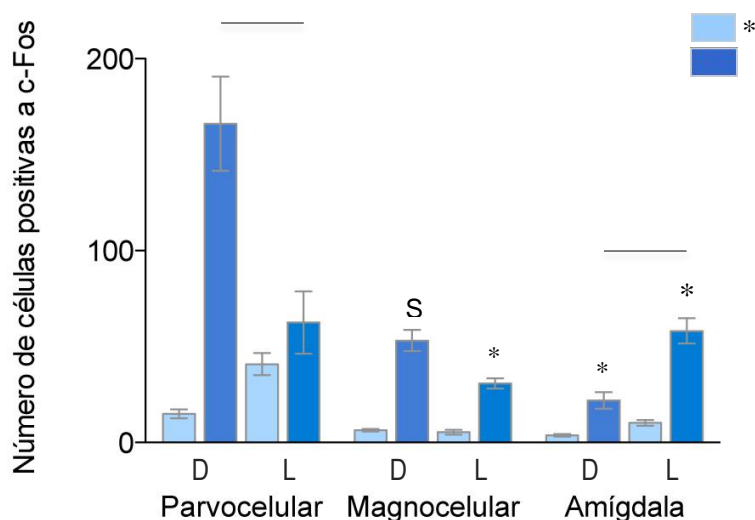


Figura 18. Efecto de la administración icv de L-NAME sobre el número de células positivas a c-Fos en el PVH y la amígdala. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n = 6$ por grupo. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P < 0.05$.

Efecto del inhibidor del óxido nítrico L-NAME sobre la expresión basal de NADPH-d y nNOS. El conteo de las células marcadas con NADPH-d en el PVH muestran que la administración icv de L-NAME en las hembras en diestro produce una disminución de células positivas a la diaforasa con respecto a su control ($P < 0.05$, Figura 19-A). En las hembras lactantes se observa también una disminución en el número de células reactivas a la diaforasa después de la administración de L-NAME con respecto a su control. El conteo de las células positivas a nNOS en el PVH muestra un aumento significativo en las hembras en diestro después de la administración de L-NAME en comparación con su control. En cambio

las hembras lactantes no presentaron modificaciones en el número de células positivas a la sintasa neuronal en respuesta al inhibidor ($P < 0.05$, Figura 19-B). La diferencia entre los dos marcadores sugiere, que el L-NAME únicamente afecta la actividad de la sintasa y no su presencia en el PVH.

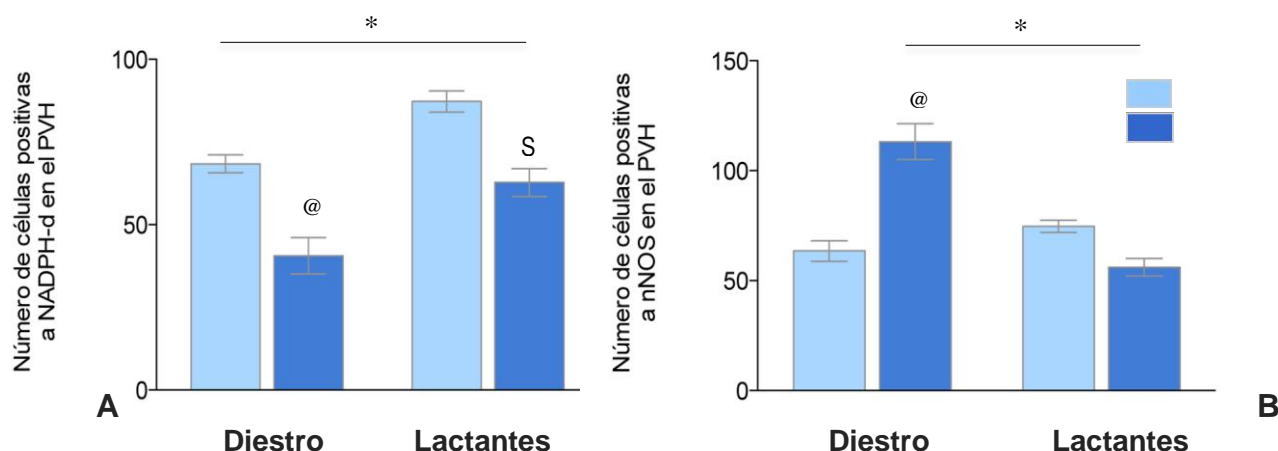


Figura 19. Efecto de la administración icv de L-NAME sobre el número de células positivas a NADPH-diaforasa y nNOS. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n = 6$ por grupo. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P < 0.05$.

Efecto del inhibidor de óxido nítrico L-NAME sobre la distribución anatómica de Fos, NADPH-diaforasa y nNOS en el PVH. Se caracterizó el efecto de la inyección icv de 25 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ del L-NAME sobre la expresión de Fos. 24 horas después de la administración del inhibidor se observa un incremento en el número de células reactivas a Fos dispersas en el PVH de las ratas en diestro en comparación con sus controles (Figuras 20-A, B). El mismo fenómeno se observó en el PVH de las ratas lactantes, aunque en menor intensidad que las hembras en diestro (Figuras 20-C, D). La histoquímica para diaforasa del óxido nítrico (NO) reveló la efectividad de la dosis y vía de administración del L-NAME como inhibidor de la síntesis *de novo* del NO. Como se observa en las Figuras 21-A y C, la administración del inhibidor 24 horas previas al sacrificio de los animales produce un menor número de células marcadas para la NADPH-diaforasa tanto en el PVH de las ratas en diestro como en las lactantes. Las células que persistieron marcadas para la diaforasa y nNOS se localizaron principalmente en la porción parvocelular ventral del PVH en ambas condiciones hormonales (Figuras 21 y 22-B, D).

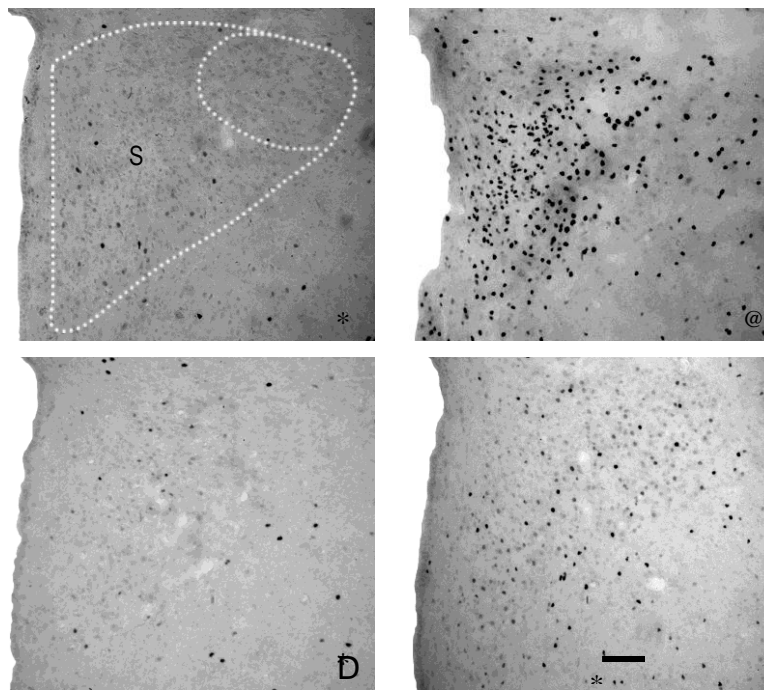


Figura 20. Efecto de la administración de L-NAME sobre la localización de c-Fos en el PVH. Fotomicrográficas representativas del PVH de hembras en diestro A) o lactantes C) después de inyección de salina icv o L-NAME, diestro B) y lactantes D)

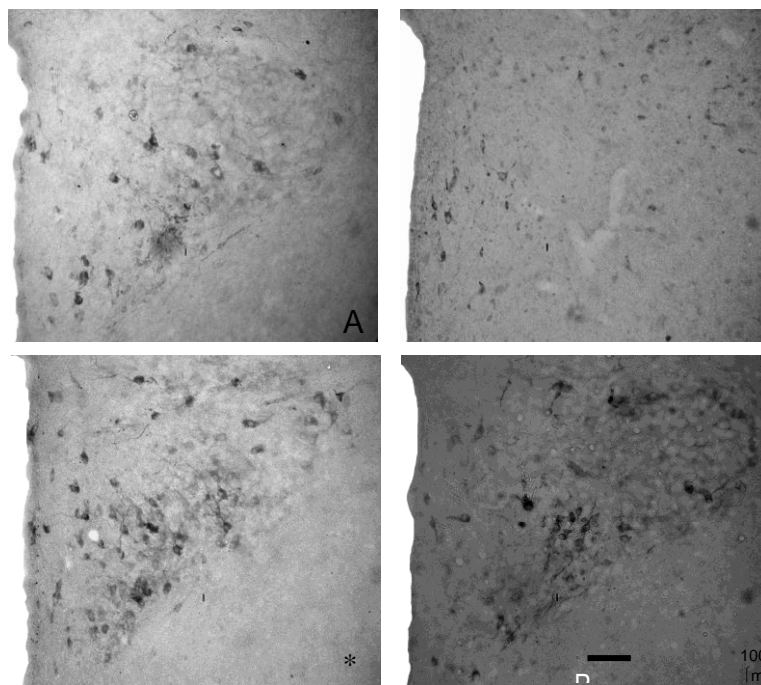


Figura 21. Efecto de la administración icv de L-NAME sobre la localización de NADPH-diaforasa en el PVH. Fotomicrográficas representativas del PVH de hembras en diestro A) o lactantes C) después de inyección de salina icv o L-NAME diestro B) y lactantes D).

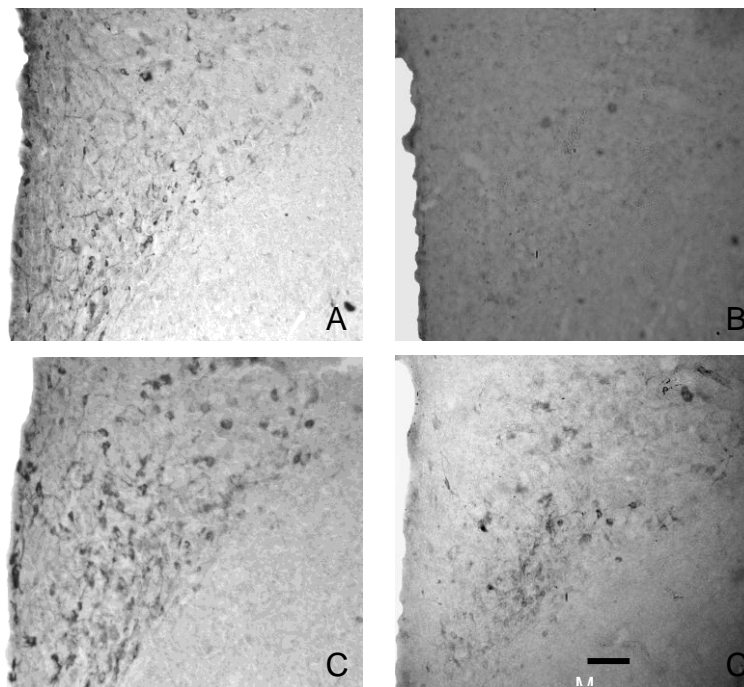


Figura 22. Efecto de la administración icv de L-NAME sobre la localización de nNOS en el PVH. Fotomicrográficas representativas del PVH de hembras en diestro A) o lactantes C) después de inyección de salina icv o L-NAME, diestro B) y lactantes D).

Efecto del inhibidor de óxido nítrico L-NAME sobre la localización de OT, VP y CRH en el PVH de ratas lactantes. La caracterización del efecto del inhibidor del NO, L-NAME administrado icv, muestra una aparente inducción sobre la expresión de OT . En el PVH de los animales que recibieron salina icv se observan neuronas oxitocinérgicas localizadas en las porciones magnocelular y pocas neuronas en la parvocelular ventral, en contraste las que recibieron el inhibidor de NO, que presentan un aparente aumento en el número de neuronas positivas principalmente en la región magnocelular (Figuras 23-A, D). El L-NAME produjo un efecto menos notorio sobre las neuronas vasopresinérgicas, como se observa en las figuras Figura 23-D la intensidad del marcaje es mayor con el inhibidor. La localización de las neuronas positivas para VP se observó principalmente en la región magnocelular y sólo un grupo de neuronas en la porción parvocelular ventral del PVH se hicieron evidentes con el marcaje. Se observa un aparente aumento en el número de las neuronas positivas para VP como efecto de la administración del L-NAME. Estas neuronas se localizaron exclusivamente en la región parvocelular dorsal del núcleo (Figuras 23-B, D).

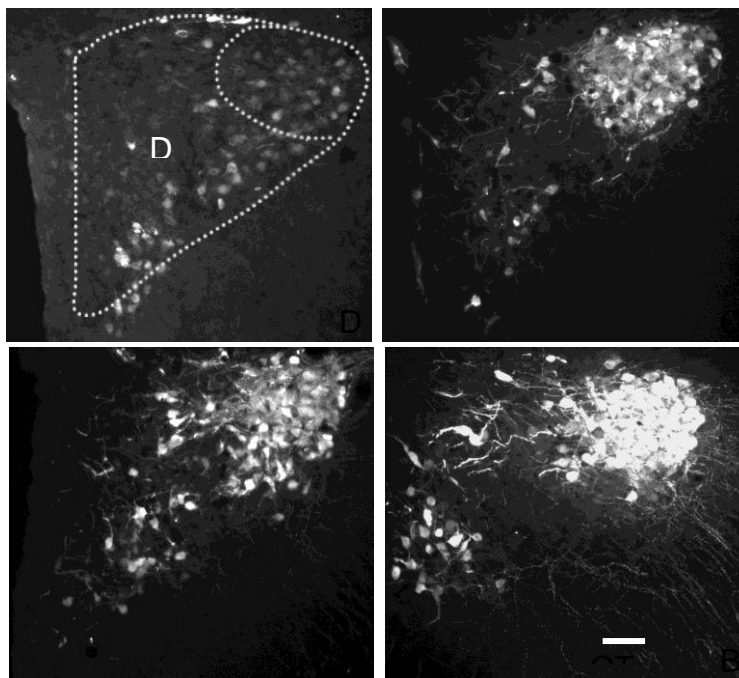


Figura 23. Efecto de la administración icv de L-NAME sobre la expresión de OT, VP en el PVH de hembras lactantes. Fotomicrografías representativas del PVH de hembras lactantes que recibieron salina (A, B) o L-NAME icv (C, D).

Efecto del inhibidor del óxido nítrico L-NAME sobre la expresión basal de CRH. La administración de L-NAME provocó un aumento en el mRNA de CRH en el PVH de hembras lactantes con respecto a su control y a las hembras en diestro que recibieron el mismo tratamiento ($P < 0.05$, Figura 24). Las hembras en diestro no mostraron modificación en la expresión de CRH después del L-NAME. No se encontraron diferencias entre las condiciones control de los grupos ($P < 0.05$, Figura 24).

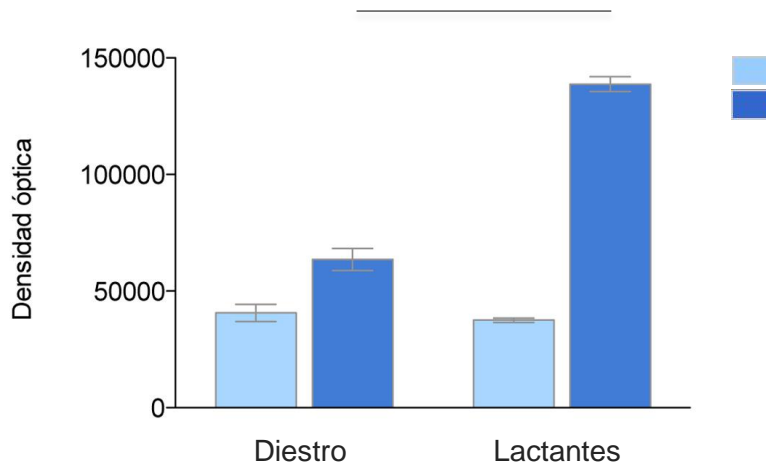


Figura 24. Efecto de la administración de L-NAME sobre la expresión basal de CRH. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n=6$ por grupo. *Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P<0.05$.

Efecto de la administración icv de L-NAME sobre la expresión de CRH en el PVH y la amígdala. La inhibición de la producción de NO mediante la inyección icv de L-NAME provocó mayor marca a CRH tanto en el PVH de hembras en diestro como lactantes (Figura 25-A-D). Sin embargo la diferencia fue más evidente entre el grupo tratado y su control en las ratas lactantes, ya que la presencia de células positivas a CRH en este núcleo durante la lactancia es casi nula (Figura 25-C, D). En la amígdala, la inyección de L-NAME no indujo cambios evidentes en el marcaje de neuronas positivas a CRH en diestro (Figura 25-a, b). En la amígdala de las lactantes en condiciones control se observan pocas neuronas positivas a CRH, sin embargo después del tratamiento se deja de observar la presencia de somas y únicamente se aprecian fibras (Figura 25-c, d).

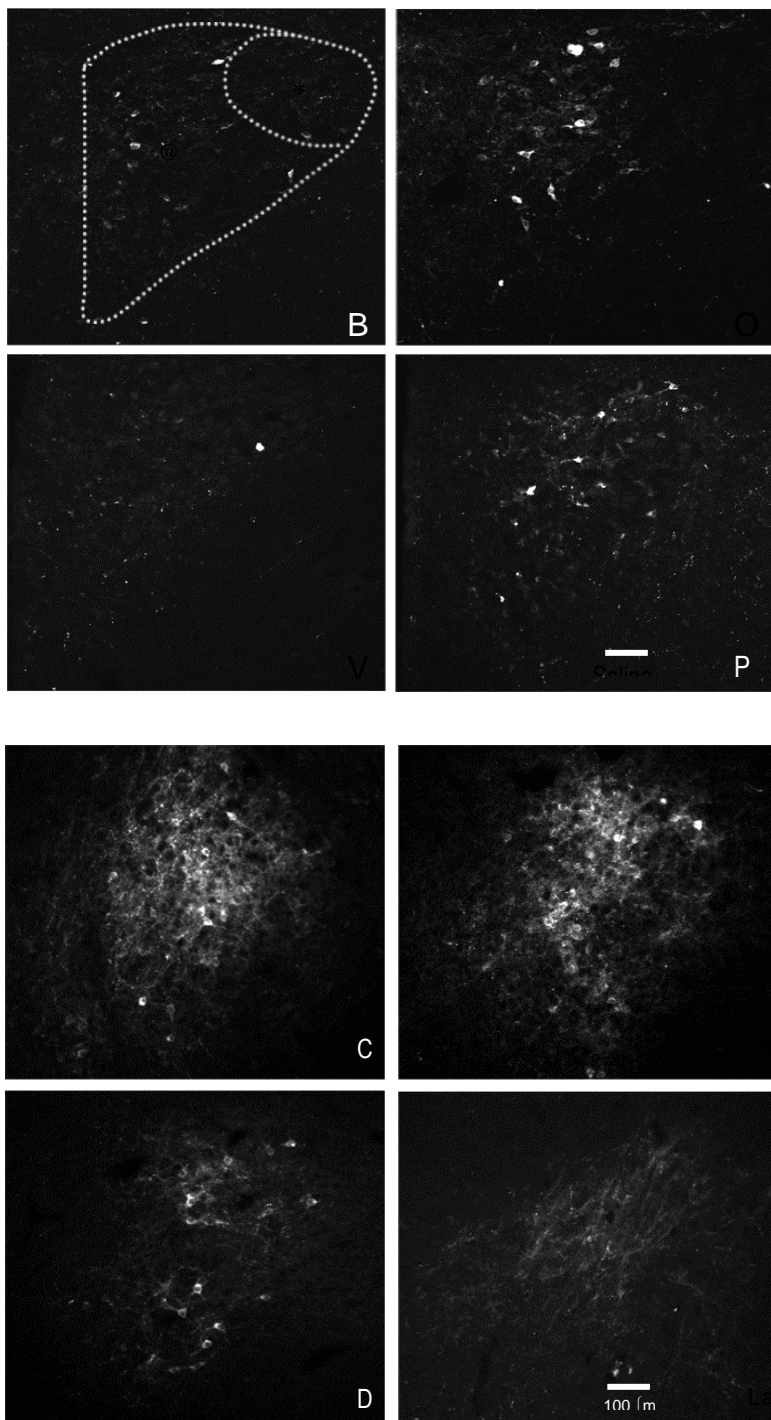


Figura 25. Efecto de la administración icv de L-NAME sobre la expresión de CRH en el PVH y la amígdala. Fotomicrografías representativas del PVH de ratas en diestro o lactantes que recibieron salina (A, C, a, c) o L-NAME (B, D, b, d).

Efecto de la inhibición del óxido nítrico sobre la concentración de corticosterona plasmática. Se realizó la cuantificación de corticosterona circulante 24 horas después de la

administración icv del inhibidor del óxido nítrico L-NAME. La determinación por el método de ensayo competitivo mostró un aumento significativo de corticosterona circulante en el grupo de hembras en diestro como en las lactantes con respecto a sus grupos control ($P < 0.05$, Figura 26). No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales, únicamente entre los dos grupos controles ($P < 0.05$, Figura 26), lo que concuerda con reportes previos donde se describe un aumento en la secreción basal y pérdida del ritmo circadiano de corticosterona en las hembras lactantes, ($P < 0.05$, Figura 26)

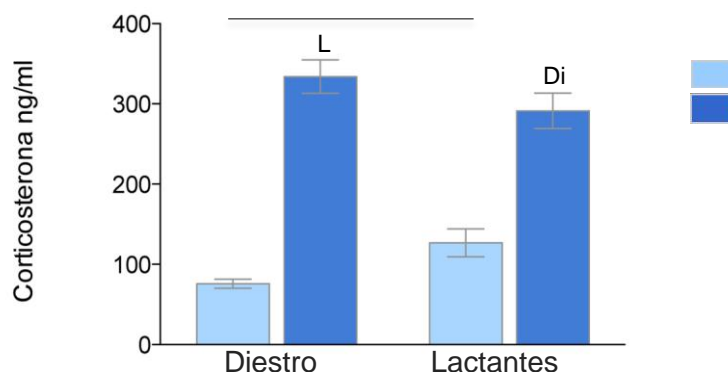


Figura 26. Efecto de la administración icv de L-NAME sobre la concentración de corticosterona. . La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n = 5$ por grupo. $*P < 0.05$.

Efecto de la inhibición del óxido nítrico sobre la expresión de c-Fos en el PVH ante la restricción de movimiento. La cuantificación de los núcleos positivos a c-Fos en el PVH de hembras en diestro y lactantes después de la administración de L-NAME 24 horas previas al estrés por restricción de movimiento mostró un aumento significativo de núcleos positivos a c-fos en el PVH de hembras en diestro y lactantes con respecto a sus controles que sólo se sometieron a restricción. Las hembras lactantes mantuvieron un mayor número de células reactivas a c-fos cuando se les administró L-NAME 48 horas antes del estrés por restricción. El grupo de ratas en diestro que únicamente se sometieron a la restricción de movimiento presentó un aumento en el número de células reactivas a c-fos con respecto a las hembras lactantes que recibieron el mismo tratamiento ($P < 0.05$, Figura 27). Se determinó el periodo de 24 hrs como el tiempo idóneo para mostrar los efectos de la inhibición del NO.

Una vez administrado el L-NAME se procedió a aplicar los paradigmas de estrés por administración de ovoalbúmina o por restricción de movimiento. La cuantificación de los

núcleos positivos a Fos reveló un aumento significativo en el número de células activas en el PVH de las hembras en diestro al someterse a restricción de movimiento después del L-NAME, sin embargo, la respuesta ante el estrés por ovoalbúmina muestra una disminución de núcleos positivos a Fos en comparación con los animales que sólo recibieron L-NAME o ovoalbúmina sin previa manipulación ($P < 0.05$, Figura 28). Las hembras lactantes que se sometieron a restricción de movimiento después de la administración icv del inhibidor mostraron un aumento en la cantidad de células positivas a Fos en comparación con el grupo que sólo recibió L-NAME. Sin embargo, no se registraron cambios en cuanto a la cantidad de núcleos positivos a Fos en el grupo de lactantes que recibieron únicamente L-NAME en comparación de las que recibieron el fármaco previa la exposición a ovoalbúmina ($P < 0.05$, Figura 28), lo cual sugiere un efecto diferencial del NO dependiente del tipo de estrés que se aplique.

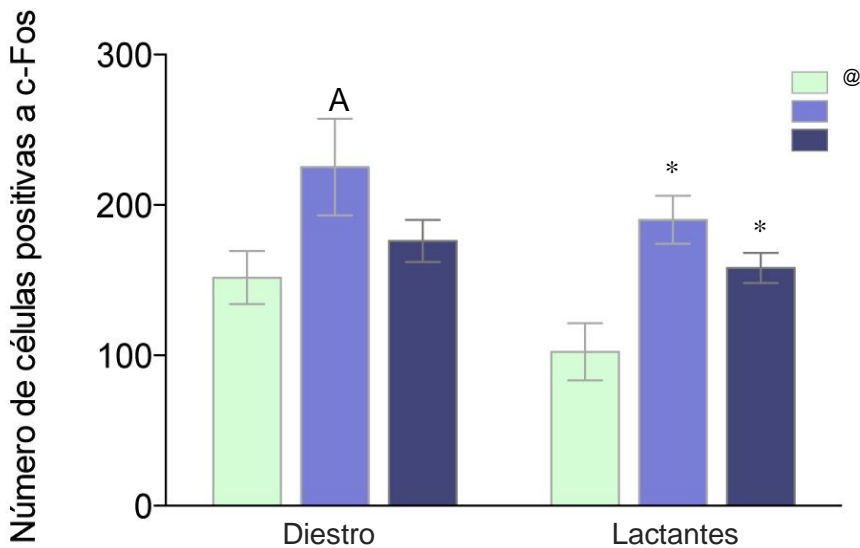


Figura 27. Número de células positivas a c-Fos después de la inhibición del óxido nítrico en respuesta a restricción de movimiento. Aumento en el número de células reactivas a fos en el grupo de hembras en diestro que recibieron L-NAME icv 24 y 48 hrs. antes de la restricción con respecto a sus controles que recibieron salina icv 24 hrs. antes del reto. Aumento del número de células positivas en las hembras lactantes después de la administración del inhibidor 24 o 48 hrs. antes del estímulo con respecto al control. Los valores expresados como media \pm E.E.M., $n = 6$ por grupo, análisis realizado por ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey. * $P < 0.05$.



Diestro

Lactantes

Figura 28. Efecto de la administración de L-NAME previa al estímulo estresante sobre el número de células positivas a c-fos en el PVH. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n=6$ por grupo. * Estrés vs control, @ diestro vs lactantes $P<0.05$.

Efecto de la administración de L-NAME sobre la respuesta a la exposición de estímulos estresantes. La inhibición de la producción de NO mediante la inyección de L-NAME, previa al estrés por administración de ovoalbúmina, indujo un aumento de células positivas a fos en la región parvocelular del PVH de las hembras en diestro, por encima de las hembras lactantes que recibieron el mismo tratamiento y de su propio control ($P<0.05$, Figura 29). Además, se observó un incremento de células reactivas en la región magnocelular de ambas condiciones hormonales con respecto a sus controles que recibieron solución salina, sin embargo el aumento fue similar al observado al aplicarse únicamente L-NAME ($P<0.05$, Figura 29). Cuando se estresó por restricción de movimiento después de la administración de L-NAME, se observa un aumento de células positivas a c-Fos en la porción parvocelular del PVH en ambas condiciones hormonales, en comparación con sus respectivos controles que recibieron salina e incluso con los que recibieron



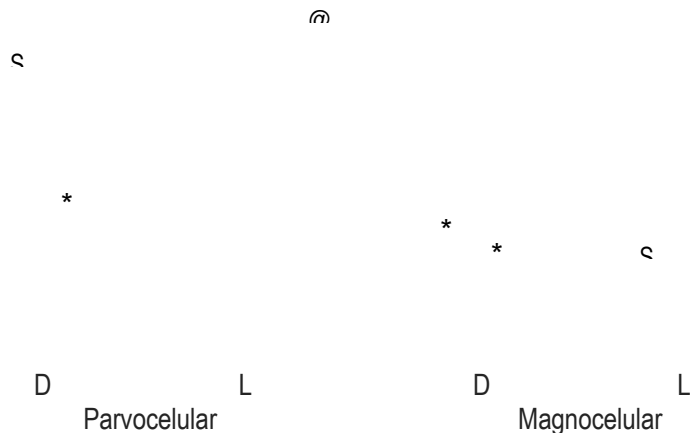
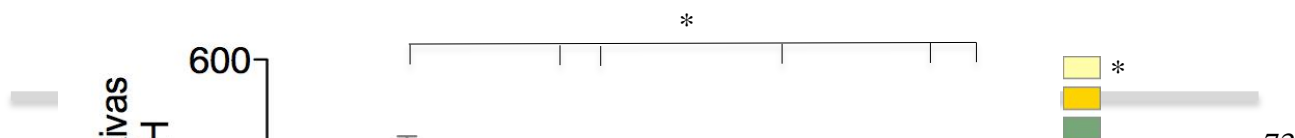


Figura 29. Efecto de la administración de L-NAME previa al estímulo estresante sobre la expresión de c-Fos en el PVH. Los valores expresados como media \pm E.E.M., $n=6$ por grupo, análisis realizado por ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey. * $P < 0.05$.

Efecto de la inhibición del óxido nítrico sobre la expresión de NADPH-diaforasa en el PVH de ratas lactantes ante la restricción de movimiento. La cuantificación de las neuronas positivas a la diaforasa en el PVH de hembras en diestro mostró un aumento significativo al aplicarse cualquiera de los estresores, en comparación con su control ($P < 0.05$, Figura 30). Sin embargo, la administración del L-NAME previo al estrés produjo en las ratas en diestro una disminución en neuronas positivas a NADPH-d, ante ambos tipos de estresores ($P < 0.05$, Figura 30), resultados que se asemejan con lo reportado previamente en la literatura para este grupo de animales. El conteo de neuronas marcadas con NADPH-d en el PVH de ratas lactantes no muestra diferencias al aplicarse los estímulos estresantes con respecto a sus controles. Al administrarse el inhibidor de NO se observa una disminución en el número de células marcadas para la diaforasa con respecto al control ($P < 0.05$, Figura 30). Por otro lado, cuando se administra el L-NAME previo a la restricción de movimiento se presenta un aumento del número de células marcadas a NADPH-d en comparación con los animales que únicamente se someten al estrés ($P < 0.05$, Figura 30).



Diestro

Lactantes

Figura 30. Efecto de la administración de L-NAME previa al estímulo estresante sobre el número de células positivas a NADPH-d en el PVH. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n= 5$ por grupo. * Estrés vs control, @ diestro vs lactantes, # Estrés vs L-NAME+ Estrés $P<0.05$.

Efecto de la inhibición del óxido nítrico sobre la localización anatómica de NADPH-diaforasa en el PVH de ratas lactantes ante la restricción de movimiento. Se caracterizó el efecto de la disminución de NO sobre la respuesta neuroendócrina a la restricción de movimiento en ratas lactantes. La producción de NO, se limitó mediante la administración del inhibidor L-NAME, 24 o 48 horas, después los animales se sometieron al reto de restricción de movimiento previamente descrito. No se observaron cambios evidentes en el número o en la distribución de células marcadas con NADPH-d en el PVH entre las ratas lactantes que se sometieron a restricción de movimiento y las que se les administró L-NAME en cualquier periodo antes del reto. En todos los casos, las células marcadas se localizaron principalmente en la región parvocelular ventral del PVH (Figura 31).

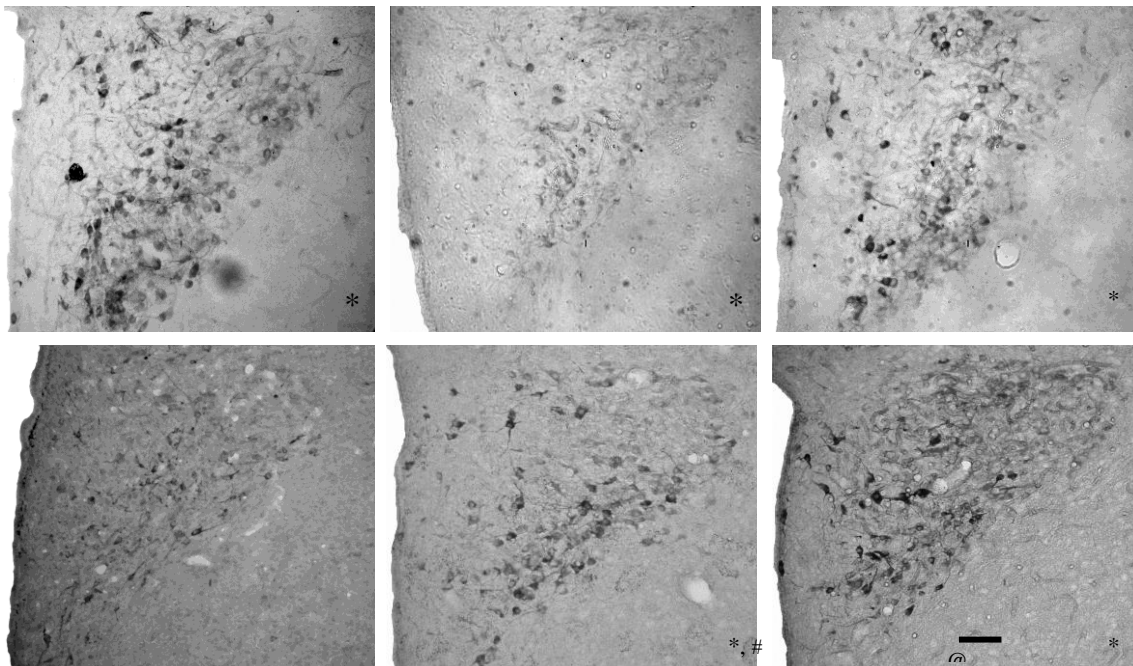


Figura 31. Efecto de la administración de L-NAME sobre la expresión de NADPH-diaforasa en el PVH. Fotomicrografías representativas del PVH de hembras en diestro A) o lactantes D) que se sometieron a restricción de movimiento, a las que se les administró L-NAME icv 24 en diestro B) y lactantes E) o 48 horas en diestro C) y lactantes F) previas a la restricción de movimiento.

Efecto de la administración de L-NAME sobre la producción de nitratos y nitritos ante dos estímulos estresantes. Se determinó la producción total de óxido nítrico (NOx) mediante la cuantificación de nitratos y nitritos en el hipotálamo completo. Se observó que las ratas en diestro producen más óxido nítrico en el hipotálamo al aplicarse cualquiera de los dos estímulos estresantes, mientras que en las ratas lactantes disminuye el nivel de nitratos y nitritos en el hipotálamo al exponer a los animales a los estresores ($P < 0.05$, Figura 32). Sin embargo, al administrarse el inhibidor de óxido nítrico L-NAME, el nivel de NOx en el hipotálamo de ratas en diestro disminuye en comparación con sus respectivos controles ($P < 0.05$, Figura 32). Al administrar L-NAME previo al estrés se observa que las ratas en diestro, tienen una producción de NOx menor en respuesta a cualquiera de los estresores, en comparación con los animales que sólo se estresaron ($P < 0.05$, Figura 32). En las ratas lactantes, el nivel de NOx en el hipotálamo cuando se les había administrado L-NAME previo a los estresores aumentó por encima del nivel de NOx detectado en respuesta a los mismos estresores sin el inhibidor ($P < 0.05$, Figura 32), sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos tratados con L-NAME antes del estresor y el grupo control.

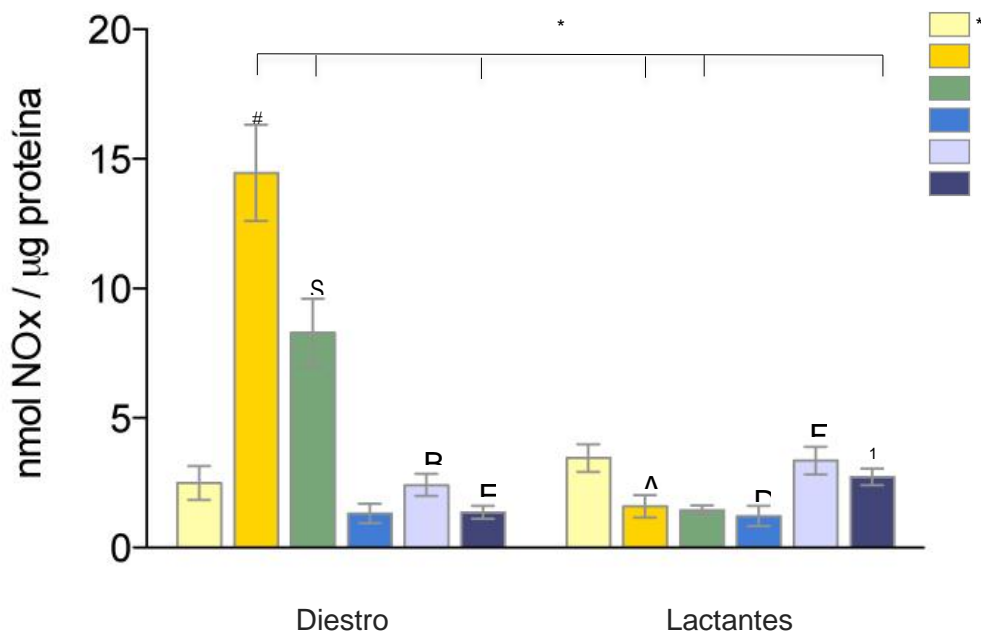


Figura 32. Efecto de la administración de L-NAME previa al estímulo estresante sobre la producción de nitratos y nitritos. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n=5$ por grupo. * Estrés vs control, @ diestro vs lactantes, # Estrés vs L-NAME+ Estrés $P<0.05$.

Efecto de la inhibición del óxido nítrico sobre la expresión de VP y CRH en el PVH de ratas lactantes ante dos estímulos estresantes diferentes. Se realizaron detecciones inunohistoquímicas para conocer si la expresión de VP y CRH se modificaba al inhibir la producción de NO previo un estímulo estresante. La restricción de movimiento se aplicó a dos diferentes tiempos después de la administración de L-NAME para determinar el tiempo óptimo para realizar los experimentos. Se observó una aparente disminución de neuronas que presentan la marca para VP en el PVH de las hembras lactantes al administrarles L-NAME previo el estrés (Figura 33-B, C). Por otro lado, se observan más neuronas positivas para CRH en el PVH de las ratas que 24 horas antes se les administró el inhibidor de NO, que a las 48 horas (Figura 33-E, F). El efecto se observa aún a las 48 horas después de la inyección, aunque queda por determinar si existe cambio en el número de neuronas de CRH entre estos dos intervalos de tiempo.

Salin

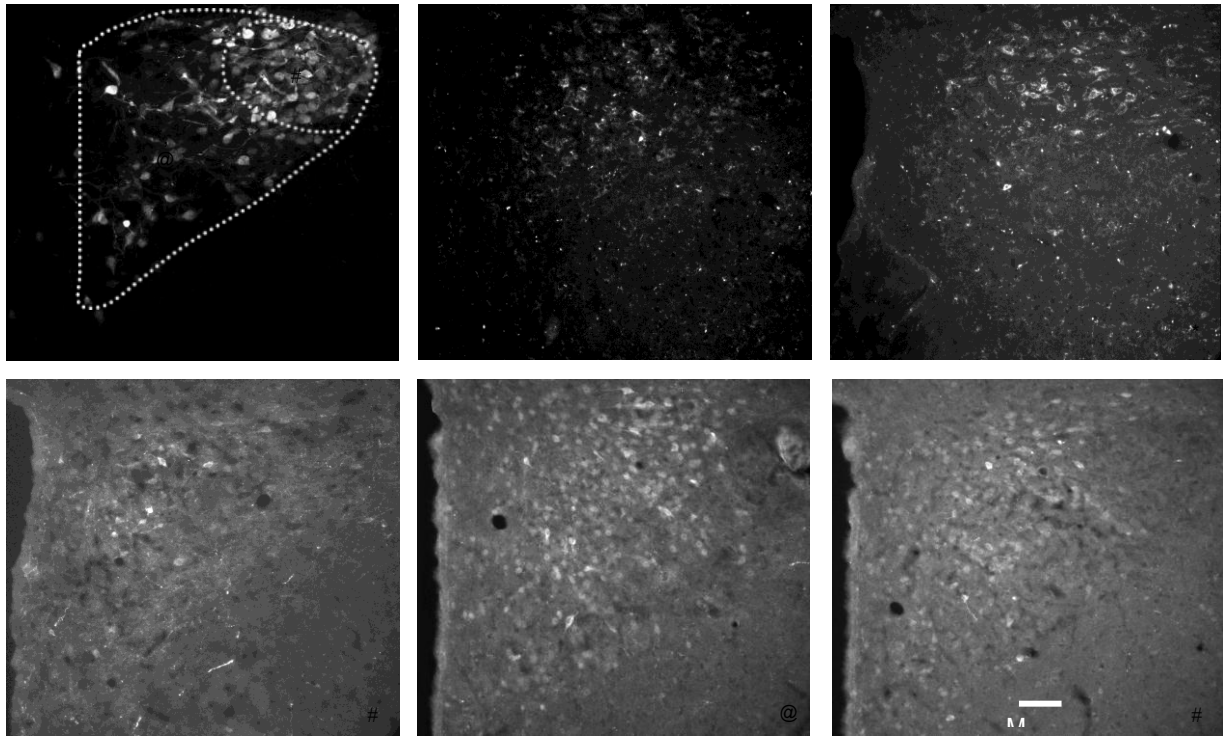


Figura 33. Efecto de la administración de L-NAME previa a la restricción de movimiento sobre la expresión de CRH y VP en el PVH de ratas lactantes. Fotomicrográficas representativas del PVH de hembras lactantes que se sometieron a restricción de movimiento (A, D), a las que se les administró L-NAME icv 24 (B, E) o 48 horas (C, F) previas a la restricción de movimiento, VP (A-C), CRH (D-F).

Efecto de la inhibición del óxido nítrico sobre los niveles de expresión del RNA mensajero de CRH en el hipotálamo completo ante los estímulos estresantes. La figura 34 muestra que la exposición a cualquiera de los dos estímulos estresantes induce la expresión del mRNA de CRH en el hipotálamo de hembras en diestro, en comparación con el control que recibió salina ip ($P < 0.05$). Asimismo, se observa que la administración icv del inhibidor de NO, L-NAME, al aplicarse solo o antes de la inyección de ovoalbúmina, promueve el aumento significativo de CRH en comparación con el grupo sham del mismo grupo hormonal. La exposición al estrés por restricción de movimiento posterior a la administración del L-NAME no produjo diferencias con respecto a su control, sin embargo, se presenta una reducción significativa en la expresión de CRH en el hipotálamo de ratas en diestro al compararse con el grupo tratado únicamente con L-NAME. ($P < 0.05$).

Por otro lado, la inyección de ovoalbúmina a hembras lactantes no modificó la expresión del mRNA de CRH en el hipotálamo al comparlas con su grupo control, pero se observa menor expresión que las hembras en diestro con el mismo tratamiento ($P < 0.05$). En contraste, la exposición al estrés por restricción de movimiento condujo al aumento de CRH por encima de su control y la administración de ovoalbúmina ($P < 0.05$). La administración a hembras lactantes del inhibidor del NO, L-NAME, incrementó la expresión de CRH en el hipotálamo de las hembras lactantes con respecto al grupo sham, este aumento también se observa en el grupo al que se le administró L-NAME previo al estrés por restricción de movimiento ($P < 0.05$), no obstante, el estrés por ovoalbúmina después del inhibidor presenta una disminución en el nivel del mRNA de CRH ($P < 0.05$).

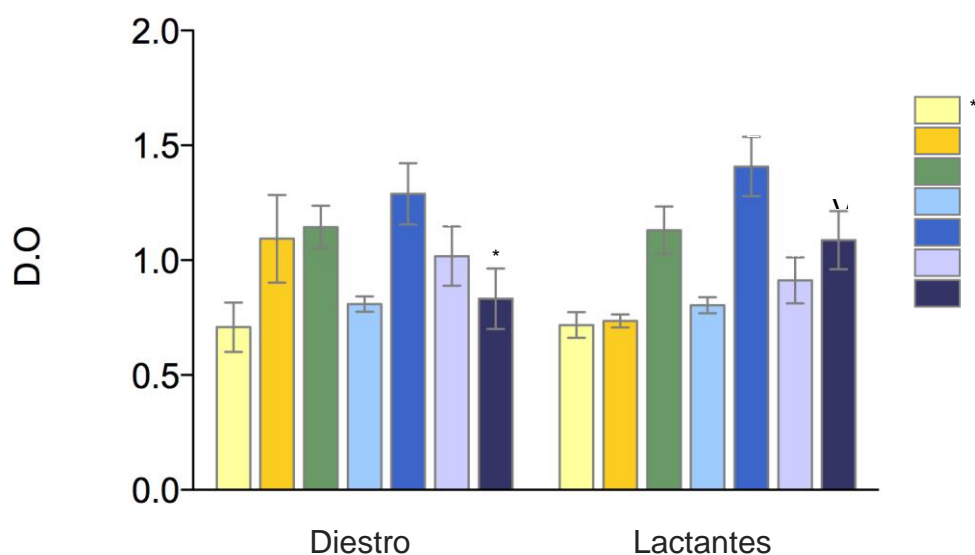


Figura 34. Análisis de los niveles de expresión relativa del mRNA de CRH en hipotálamo completo, mediante RT-PCR. Los valores son normalizados usando ciclofilina como control interno y son expresados en unidades arbitrarias. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n = 5$ por grupo. * Estrés vs control, @ diestro vs lactantes, # Estrés vs L-NAME+ Estrés $P < 0.05$.

Efecto de la inhibición del óxido nítrico sobre la expresión del RNA mensajero de CRH en el PVH y la amígdala ante la restricción de movimiento. La cuantificación de la hibridación in situ muestra una mayor expresión de mRNA de CRH en el PVH de las hembras en diestro en respuesta al estrés por ovoalbúmina o restricción de movimiento y a la administración de L-NAME por 24 horas en comparación con el control que recibió salina icv ($P < 0.05$, Figura 35). También se observa un incremento de la expresión del mensajero in situ al administrar el inhibidor de NO L-NAME 24 horas antes de la inyección de ovoalbúmina

o la restricción de movimiento en comparación con el control e incluso con los animales que sólo fueron estresados ($P < 0.05$, Figura 35). Las hembras lactantes no presentaron diferencias entre el nivel de expresión basal de CRH en el PVH y el estimulado por la inyección de ovoalbúmina o la restricción de movimiento. Sin embargo, la administración de L-NAME indujo el aumento de la expresión de CRH por encima de la observada en el control. Así mismo, se encontraron diferencias significativas entre el grupo de ratas lactantes que recibieron L-NAME y las que recibieron L-NAME previo al estrés por inyección de ovoalbúmina o por restricción de movimiento ($P < 0.05$, Figura 35). Además se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos de hembras en diestro en comparación con las lactantes, con excepción de las que se les administró el inhibidor de NO antes de la inyección de ovoalbúmina ($P < 0.05$, Figura 35).

El análisis de la expresión de CRH en la amígdala muestra un aumento cuando se aplicó la restricción de movimiento tanto en hembras en diestro como hembras lactantes, con respecto a sus respectivos controles ($P < 0.05$, Figura 36). Además se registró una mayor expresión de CRH en las hembras lactantes que recibieron L-NAME antes de la restricción de movimiento ($P < 0.05$, Figura 36). No se encontraron diferencias entre la expresión basal de CRH en la amígdala de las ratas en diestro y las lactantes ($P < 0.05$, Figura 36).

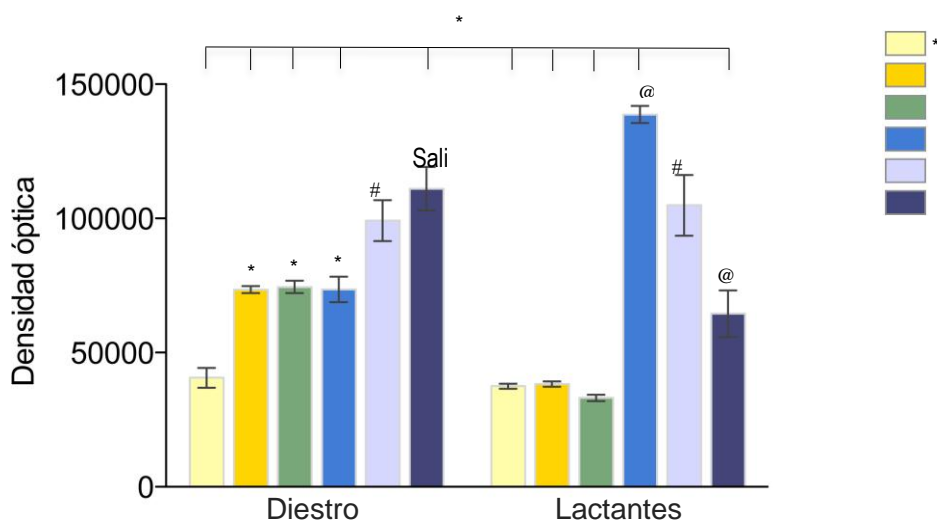


Figura 35. Cuantificación de la expresión del mRNA CRH en el PVH de hembras en diestro y lactantes en respuesta a la la inhibición de óxido nítrico y la restricción de movimiento. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n = 6$ por grupo. * Estrés vs control, @ diestro vs lactantes, # Estrés vs L-NAME+ Estrés $P < 0.05$.

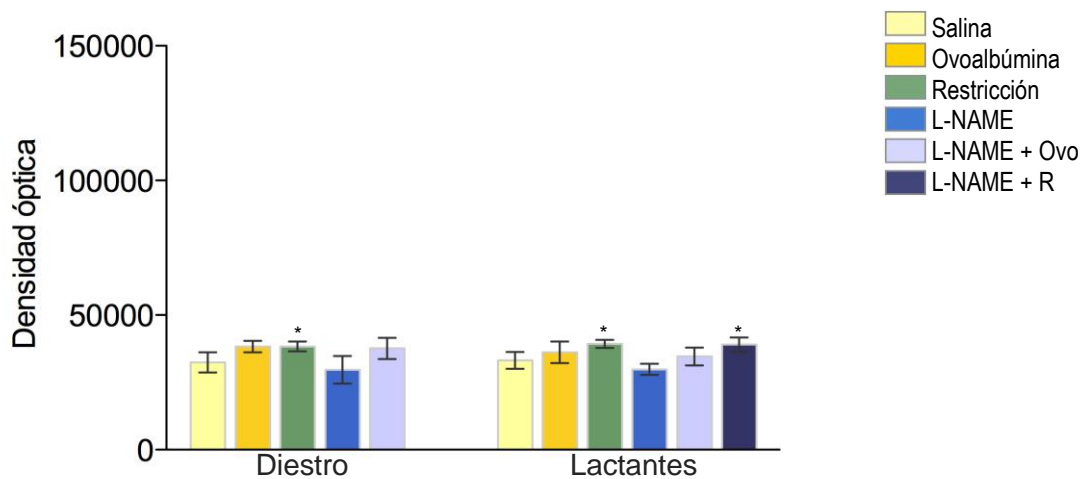


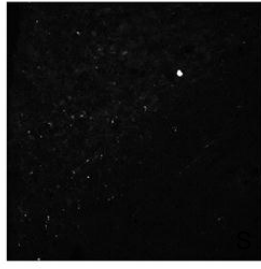
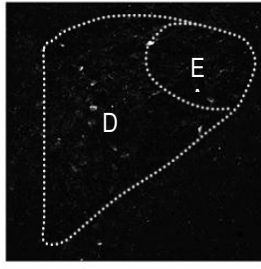
Figura 36. Cuantificación de la expresión del mRNA de CRH en la amígdala de hembras en diestro y lactantes en respuesta a la inhibición de óxido nítrico y la restricción de movimiento. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, $n=6$ por grupo. * $P<0.05$.

Efecto del inhibidor de óxido nítrico L-NAME sobre la expresión de CRH en el PVH y la amígdala en respuesta a dos diferentes estímulos estresantes. Se detectó la presencia de la proteína de CRH mediante inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos muestran una mayor cantidad de neuronas positivas a CRH en el PVH de las ratas en diestro que fueron estresadas, ya fuera por inyección de ovoalbúmina o bien, por restricción de movimiento (Figura 37-A, C, E), resultados que concuerdan con lo que previamente se ha descrito para ratas ciclantes, no se observaron diferencias entre los dos estímulos estresantes (Figura 37-C, E). En las ratas lactantes los estímulos estresantes no modificaron el marcaje de neuronas de CRH en comparación con su control, este resultado también concuerda con lo descrito en la literatura acerca de la atenuación de la respuesta al estrés durante esta fase, sin embargo en el presente trabajo no se ha logrado encontrar una respuesta diferencial en función de la naturaleza del estímulo como previamente se ha publicado (Figura 37-B, D, F). Al administrar L-NAME las ratas en diestro mostraron un ligero aumento en el marcaje para CRH en el PVH con respecto a su control, sin embargo no alcanzó a ser similar a la respuesta observada con cualquiera de los estímulos estresantes (Figura 37-G). En las hembras lactantes se observó el fenómeno opuesto, la administración de inhibidor generó un aumento en las neuronas marcadas con respecto a su control e incluso por encima de la respuesta al estrés (Figura 37-H). Para investigar si la presencia del NO durante la lactancia es uno de los factores que contribuyen a la atenuación de la

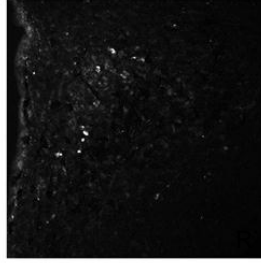
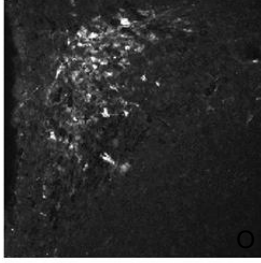
respuesta al estrés se procedió a administrar L-NAME previo al estrés. Las ratas en diestro que recibieron ovoalbúmina después del L-NAME muestran un marcaje de neuronas positivas a CRH en el PVH similar al observado cuando se administró únicamente ovoalbúmina (Figura 37-C, I), sin embargo en las lactantes se observó un aumento de neuronas positivas con respecto al grupo de ovoalbúmina (Figura 37-D, J). Por otro lado, cuando los animales se sometieron al estrés por restricción de movimiento, después de la inyección del inhibidor de NO, se observa una cantidad de neuronas positivas a CRH en el PVH similar al estrés sin L-NAME en las ratas en diestro y las hembras lactantes muestran el mayor número de neuronas positivas, superior al observado con cualquiera de las manipulaciones previas (Figura 37-K, L).

En la amígdala la marca para CRH fue diferente a la del PVH, ya que en el grupo control de las ratas en diestro se observa una cantidad de somas y fibras, mayor a las lactantes (Figura 37-a, b). Al aplicar los estímulos estresantes los dos grupos experimentales presentaron una respuesta similar en cuanto al número de neuronas positivas en la amígdala, sin embargo en las lactantes la respuesta ante el estrés sí fue mayor en comparación con su control (Figura 37-c-f). Al administrar L-NAME no se observaron cambios evidentes en la densidad de neuronas positivas con respecto a su control o en respuesta al estrés en la amígdala de las ratas en diestro (Figura 37-g). En las ratas lactantes únicamente se aprecian fibras positivas después de la administración del inhibidor (Figura 37-h), en comparación con su control o con los tratamientos experimentales disminuye el número de neuronas de CRH. Al administrar L-NAME previo a los estímulos estresantes se observa una mayor densidad de fibras y somas positivos a CRH en ambas condiciones experimentales en respuesta a los dos tipos de estrés (Figura 37-i-l).

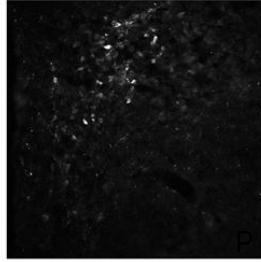
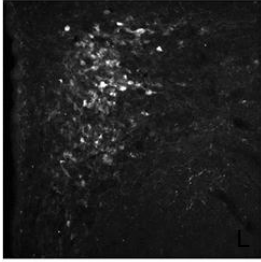
*



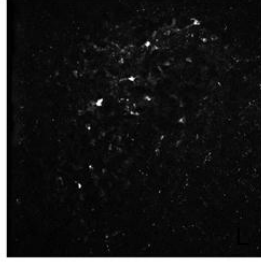
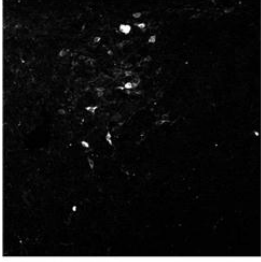
* #



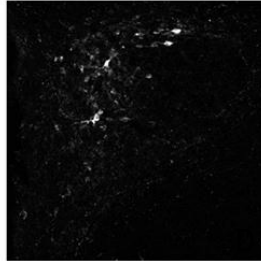
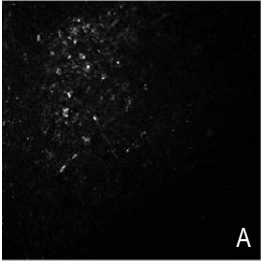
* #



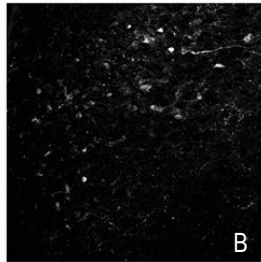
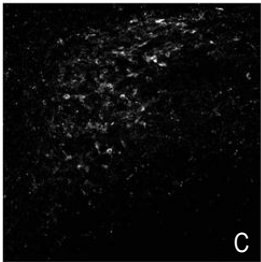
* #



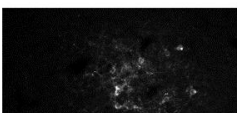
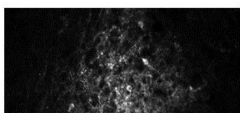
* #



Salina



*



A S
O L
L R
L

Figura 37. Efecto de la administración de L-NAME previa al estrés sobre la localización de la marca de CRH en el PVH y la amígdala. Fotomicrografías representativas del PVH y la amígdala de ratas en diestro y lactantes que recibieron alguno de los tratamientos utilizados en este trabajo.

Efecto del inhibidor de óxido nítrico L-NAME sobre la localización de la marca de VP en el PVH en respuesta a dos diferentes estímulos estresantes. Se detectó la presencia de la proteína de VP mediante inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos muestran una marca mayor de neuronas positivas a VP en el PVH de las ratas en diestro que fueron estresadas, ya fuera por inyección de ovoalbúmina o bien, por restricción de movimiento (Figura 38-A, C, E), no se observaron diferencias entre los dos estímulos estresantes (Figura 38-C-F). En las ratas lactantes los estímulos estresantes no modificaron el marcaje de neuronas de VP en comparación con su control, este resultado también concuerda con lo descrito en la literatura acerca de la atenuación de la respuesta al estrés durante esta fase (Figura 38-B, D, F). Al administrar L-NAME las ratas en diestro no mostraron diferencia en el marcaje para VP en el PVH con respecto a su control (Figura 38-G). En las hembras lactantes se observó el fenómeno opuesto, la administración de inhibidor generó un aumento en las neuronas marcadas con respecto a su control e incluso por encima de la respuesta al estrés (Figura 38-H). Al administrar L-NAME previo al estrés, ambos grupos hormonales que se estresaron por inyección de ovoalbúmina mostraron un marcaje de neuronas positivas a VP en el PVH mayor al observado cuando se administró únicamente ovoalbúmina (Figura 38-C, D, I, J). Por otro lado, cuando los animales se sometieron al estrés por restricción de movimiento, después de la inyección del inhibidor de NO, se observa una cantidad de neuronas positivas a VP en el PVH menor al estrés sin L-NAME en las ratas en diestro y las hembras lactantes (Figura 38-K, L).

PVH

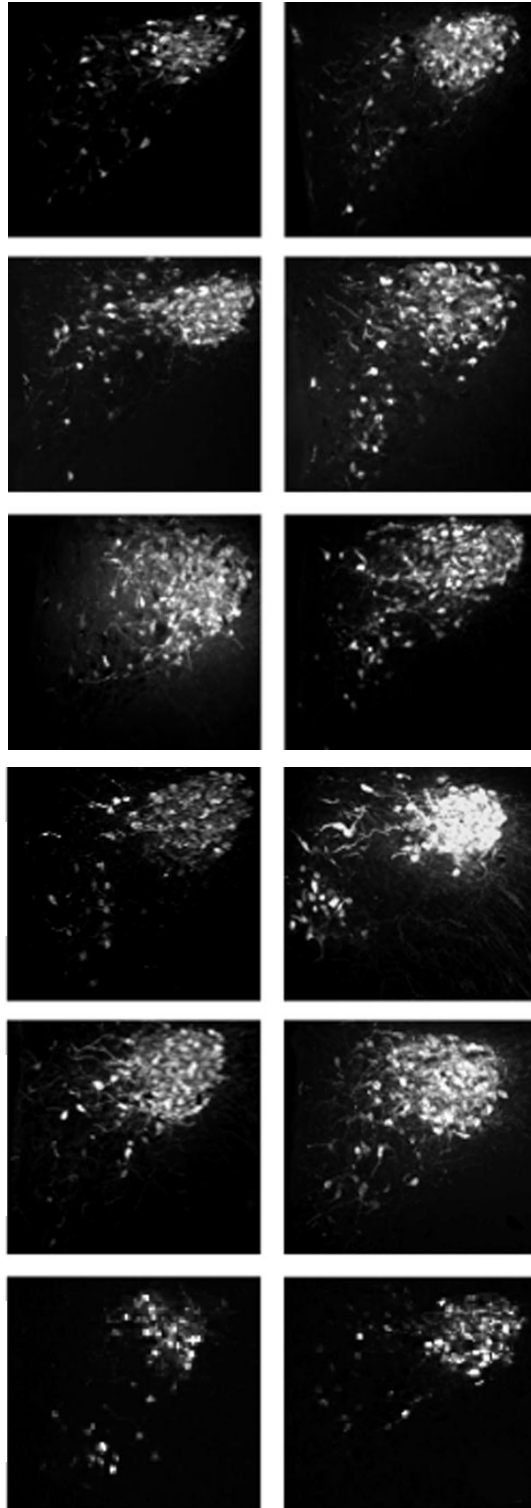


Figura 38. Efecto de la administración de L-NAME previa al estrés sobre la localización de la marca de VP en el PVH. Fotomicrografías representativas del PVH y la amígdala de ratas en diestro y lactantes que recibieron alguno de los tratamientos utilizados en este trabajo.

Efecto de la administración de L-NAME sobre la concentración de corticosterona plasmática en respuesta a dos diferentes estímulos estresantes. Se determinó el nivel de corticosterona plasmática en los diferentes grupos experimentales que se sometieron a la administración de ovoalbúmina (Ovo), restricción de movimiento (R), inyección de L-NAME y L-NAME antes de alguno de los dos estímulos estresantes. Los resultados muestran un aumento significativo en el grupo de hembras en diestro en todos los grupos experimentales con respecto a su control ($P < 0.05$, Figura 39). El grupo de hembras lactantes presentó un aumento significativo en la concentración de corticosterona por encima de su nivel basal con los tratamientos L-NAME y L-NAME+restricción de movimiento (Figura 39). Los grupos de las hembras en diestro control, R y L-NAME mostraron diferencias significativas en la concentración de corticosterona con respecto a los grupos con los mismos tratamientos de hembras lactantes ($P < 0.05$, Figura 39). Como anteriormente se había descrito, las hembras lactantes presentan un nivel basal de corticosterona circulante más alto que el grupo control de las hembras en diestro (Figura 39)

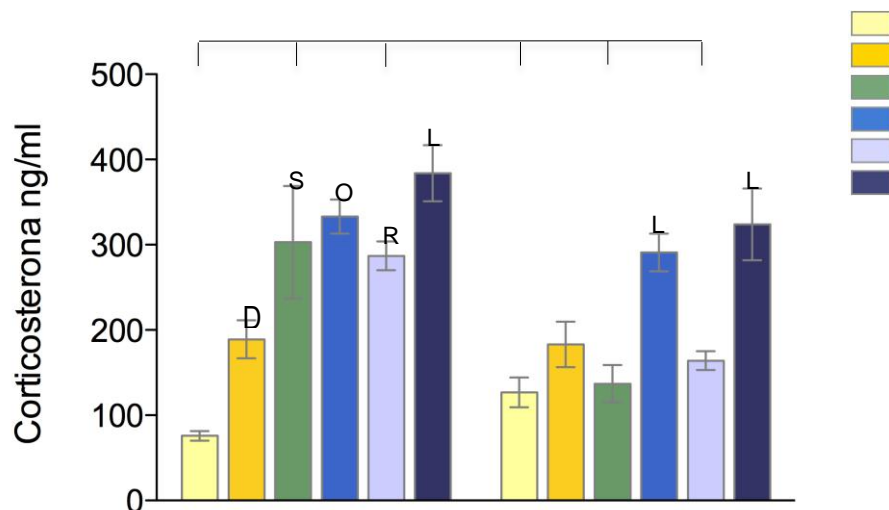


Figura 39. Concentración de corticosterona plasmática en respuesta al reto neurogénico después de la administración de L-NAME. La gráfica muestra las medias \pm E.E.M. de cada grupo, n= 6 por grupo. * Diferente a su control, @ diferente entre diestro y lactantes P<0.05.

7.- DISCUSIÓN

Durante la lactancia, ocurren adaptaciones funcionales específicas del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), que se reflejan en la pérdida de la secreción circádica de corticosterona y en la disminución de las respuestas neuroendocrinas inducidas por una variedad de estímulos estresantes (Walker y col., 2001, Douglas, 2005, Brunton y col., 2009). Al respecto se ha propuesto que la falta de respuesta ante estímulos estresantes durante la lactancia, es el resultado de mecanismos adaptativos que ocurren en diferentes regiones cerebrales, entre ellas, la reducción de la actividad de las vías aferentes al PVH y una modulación diferencial de la activación del PVH (Russel y col., 2001; Kinsley y Lambert, 2006).

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue el comparar la respuesta ante dos estímulos estresantes de diferente naturaleza, ya que existen múltiples reportes en los que se sugiere que durante la lactancia el sistema inmune estaría deprimido (Windle y col., 1997a, 1997b; Shanks y col., 1997; Walker y col., 2001a, 2001b; Tilbrook y Clarke, 2006) y esto se vería reflejado en una hiper-reacción al presentar un estresor inmunológico. Por el otro lado, muchos estudios han mostrado resultados contradictorios sobre la respuesta a estresores neurogénicos, en los que existen diferencias importantes dependiendo principalmente del tiempo de aplicación del estrés y el tiempo de separación madre-crías (Stern y Levine, 1972; Da Costa y col., 1997; Lightman y col., 2001; Douglas, 2005; Shanks y col., 1999; Windle y col., 1997, 2006, Neumann y col., 2005, Toufexis y Walker, 1996, Brunton y col., 2006; Tilbrook y col., 2006). Sin embargo no existen estudios comparativos entre dos tipos de estresores en la rata lactante, que ilustren de qué manera la madre lactante logra contender con el estrés independientemente de la naturaleza de éste.

En este trabajo se analizó el efecto de la inyección de ovoalbúmina, como estrés inmune, y la restricción de movimiento, como estrés neurogénico, sobre la respuesta activacional del PVH en dos condiciones hormonales diferentes: ratas en diestro y a la mitad del periodo de lactancia. Como índice de activación neuronal se utilizó la detección inmunohistoquímica del

producto proteínico del gen de respuesta inmediata c-Fos. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada como una herramienta de mapeo para identificar células y circuitos que son activados en respuesta a diversos estímulos. En las neuronas, el nivel de expresión basal de este gen es baja y su expresión puede ser inducida por un estímulo en un intervalo de tiempo relativamente corto (a partir de 30 minutos después del estímulo), por lo que ha sido utilizado en diversos estudios en el campo del estrés (da Costa y col., 1996 y 1997; Kovács y Sawchenko, 1996; Kovács,1998; Földes y col., 2000).

Para cada tratamiento se determinaron diferentes tiempos de experimentación, dado que en estudios anteriores se ha mostrado que la máxima expresión de c-Fos en respuesta a la inyección de ovoalbúmina intravenosa es de 2 horas después del tratamiento (Földes y col, 2000). Sin embargo, ya que el estudio fue realizado en machos y por una vía de acceso directo al sistema inmunológico, se determinaron 3 horas como el tiempo adecuado para la inducción de la respuesta por vía intraperitoneal para las hembras. Los resultados obtenidos con este reto muestran un mayor número de células positivas a Fos en la porción parvocelular del PVH de ratas en diestro, con respecto a sus controles que recibieron salina y con las lactantes que reciben ovoalbúmina. Este aumento concuerda con resultados previos que muestran que la administración de LPS no incrementa significativamente el nivel de activación de las neuronas del PVH de ratas lactantes (Shanks y col., 1999). Por otro lado, la región magnocelular del PVH no presentó diferencias significativas en respuesta al reto en comparación con los controles de ambas condiciones hormonales, así como entre grupos. De manera similar, el conteo de núcleos positivos a fos en la amígdala no reflejaron diferencias al aplicarse el reto en ninguno de los dos estados hormonales. Estos resultados eran esperados, ya que las neuronas magnocelulares del PVH, que contienen principalmente OT y VP, son poco responsivas al estrés inmunológico como el que se aplicó en este estudio (F), por otro lado, la amígdala, que es rica en neuronas de CRF, no muestra diferencias de actividad entre los animales control y los estresados, ya que este núcleo como parte del sistema límbico, no tiene una participación importante en el procesamiento del estrés inmunológico (Földes y col., 2000, Buller, 2003). Además, resulta importante resaltar el hecho de que los autores que han utilizado la administración de ovoalbúmina como estrés inmunológico, reportan una activación principalmente en la región magnocelular del PVH de

ratas macho, co-localizada con neuronas de VP y OT (Földes y col., 2000), lo cual sugiere que las hormonas gonadales ejercen un papel fundamental en la regulación de la actividad del PVH, ya que en el estudio citado se usan ratas macho.

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

El estrés por restricción de movimiento provocó un aumento significativo en la expresión de Fos en las dos regiones del PVH de ratas en diestro con respecto a sus controles y a las madres lactantes. Lo cual coincide con estudios previos en los que se ha reportado que la respuesta del PVH de ratas macho ante un reto con LPS o restricción de movimiento, independiente a la vía de señalización que provocan ambos estímulos, la información que llega al PVH provoca una activación similar (Reyes y col., 2003).

Sin embargo el estrés por restricción de movimiento sí logró modificar el número de células positivas a c-Fos en ambas porciones del PVH, así como en la amígdala, de las ratas lactantes. Dichos resultados están en contradicción con lo previamente descrito para un paradigma de estrés similar en ratas lactantes (Da Costa y col., 1996; Wintrip y col., 1997). La diferencia en los resultados puede radicar en la temporalidad del estudio, ya que los estudios mencionados utilizan un paradigma de estrés por restricción por un tiempo más prolongado, lo cual pudo haber significado la diferencia entre ambos estudios. Por otra parte, es importante mencionar que en nuestro estudio, el conteo se realizó en el PVH como un núcleo parcelado en región magno y parvocelular, dadas las características morfofuncionales de cada porción ya que es importante denotar la actividad de cada una de las divisiones. Así mismo, la amígdala desplegó un aumento en el número de células positivas, que dado su papel en la integración y procesamiento de estímulos, en respuesta conductuales

Con la cuantificación del número de células positivas a Fos en el PVH, se determinó que las ratas en diestro muestran la mayor respuesta a ambos retos, en mucho menor grado que las lactantes. No obstante que el nivel basal de Fos en los grupos control de lactantes es más alto que el de los otros grupos control, se observó un aumento en respuesta a los dos estímulos. Este resultado sugiere que, la respuesta del PVH es diferente dependiendo del tipo de estrés aplicado.

Si bien, la producción de NO se requiere en una amplia variedad de procesos y su síntesis está finamente regulada, existen condiciones fisiológicas y patológicas en las que éste se sintetiza de manera exacerbada (Esplugues, 2000). Sin embargo, al ser un gas con una vida media muy corta cuantificar su producción de manera directa aún no es posible, por lo que se utilizan métodos indirectos como la detección de metabolitos estables o bien la expresión de sus enzimas de síntesis.

Con la finalidad de conocer si existen diferencias en la cantidad y distribución inicial y la inducida por los diferentes tratamientos de las neuronas que sintetizan NO en el PVH de ratas en las diferentes condiciones hormonales utilizadas, se realizó la detección histoquímica para la diaforasa del óxido nítrico (NADPH-d) como índice de actividad sintética de nNOS. En nuestros resultados se observa que el marcaje para NADPH-d en el PVH de las hembras en diestro aumentó significativamente después de ambos estímulos estresantes con respecto a su control, como previamente se había demostrado para hembras y machos en respuesta a retos similares, sin embargo no se encontraron diferencias en el número de células positivas entre los dos estímulos, únicamente en la distribución de las células positivas. En las ratas lactantes se observó un gran cantidad de células teñidas en el PVH de animales lactantes del grupo control, resultados que coinciden con experimentos previos en los que se reporta que durante la lactancia existe un aumento en el nivel basal de la diaforasa (Otukonyong y col., 2000; Popeski y col., 2001). En estos estudios se ha mostrado que el incremento de células positivas a NADPH-d durante esta fase es dependiente del estímulo continuo de la succión.

Con la finalidad de conocer la distribución de la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) en el PVH así como sus posibles modificaciones en respuesta a los estímulos estresantes se realizó una detección inmunohistoquímica para esta enzima. La expresión de nNOS se ha relacionado con una gran variedad de mecanismos, que van desde los asociados con el envejecimiento natural, las patologías neurodegenerativas, procesos de memoria, neurodesarrollo hasta neuroprotección. En los presentes resultados, se encontró una mayor expresión de nNOS durante la lactancia, incluidas las regiones magnocelular y parvocelular del PVH, lo cual concuerda con reportes previos en los que se registra un incremento en el mRNA y la proteína de nNOS en el PVH durante la lactancia (Cecatelli y col., 1996a, 1996b).

Una de las modificaciones que se observan en la expresión de nNOS en el PVH en respuesta a los estímulos estresantes, fue el aumento en el número de células positivas en las ratas en diestro, sin existir diferencia entre los dos estímulos, las neuronas positivas a nNOS, en general, se concentran en las regiones ventral y medial parvocelular del PVH. De manera similar a lo observado para la NADPH-diaforasa, no se observan diferencias en el número o localización de células positivas a nNOS con respecto a su control o entre los estímulos estresantes.

La NADPH-diaforasa se ha empleado como un marcador histoquímico para nNOS, sin embargo, al hacer una comparación entre los mapas de distribución en el cerebro de las neuronas que son positivas para nNOS y las que muestran actividad para la NADPH-d, la correlación de ambas no es tan clara (Vincent y Kimura, 1992; Rodrigo y col., 1994). En muchos núcleos, tal como se ha señalado (Hope y col., 1991), todas las neuronas que contienen actividad NADPH-d también son positivas para nNOS, haciendo posible que la actividad NADPH-d esté presente en neuronas activamente productoras de NO y que las técnicas tanto inmunocitoquímicas como histoquímicas den resultados semejantes. No obstante, también existen núcleos y neuronas concretas que sólo muestran inmunoreactividad para nNOS y no la actividad NADPH-d, lo que ha llevado a pensar en la posibilidad de que este tipo de núcleos o neuronas inmunopositivas, cuando carecen de

actividad NADPH-d podrían ser consideradas como neuronas silentes en cuanto a la producción de NO (Rodrigo y col., 1994). En la actualidad estos datos continúan confirmándose en diferentes situaciones experimentales, demostrándose que existen neuronas que tienen nNOS que no muestran actividad NADPH-d, tal como se observó en las neuronas del PVH de las hembras lactantes y como se ha reportado que ocurre en la corteza cerebral de ratas viejas o sometidas a hipoxia/isquemia-reperfusión, donde se observa que aparecen un número elevado de neuronas que expresan nNOS pero que son negativas para la actividad NADPH-d (Rodrigo y col., 2001).

En este trabajo se plantea la posibilidad de que el óxido nítrico que se está activamente produciendo por el estímulo de la succión en el PVH de la hembra lactante, sea un factor que contribuya a la atenuación de la respuesta al estrés durante dicha etapa. Para comprobar esta hipótesis recurrimos a la inhibición farmacológica por L-NAME de la síntesis de NO. Previamente se ha demostrado que la inhibición central de la síntesis de NO durante la lactancia lleva a perder algunos de los aspectos de la conducta materna (Service y Woodside, 2008) sin embargo, no se ha explorado si además de intervenir en la conducta materna el NO ejerce alguna función en la respuesta al estrés durante la lactancia, tal como ha sido ampliamente documentado en ratas vírgenes o machos (Uribe y col., 1999; Calza y col., 1993; Grange-Messet y col., 2004; Kadowaki y col., 1994; Moro y col., 1998; Okamura y col 1994). Los resultados del presente trabajo muestran que la expresión del RNA mensajero así como la proteína de CRF no se modifica en el PVH de las madres lactantes en respuesta a ninguno de los estímulos estresantes utilizados, como previamente se ha demostrado con una variedad de otros estímulos estresantes. Como previamente se ha demostrado, nuestros resultados de las inmunohistoquímicas y las mediciones de corticosterona circulante coinciden en una diferencia entre el nivel basal de células positivas a CRF y el nivel de CORT diferente entre hembras vírgenes y lactantes, sin embargo los resultados de la expresión del mensajero de CRF no muestran diferencias entre las dos condiciones hormonales, lo cual puede sugerir una diferencia importante en la sensibilidad de la métodos utilizados o bien que la traducción de RNA mensajero maduro a la proteína esté siendo interrumpida. En este sentido no se ha reportado ningún tipo de interacción directa del NO sobre la traducción de proteínas, en específico de CRF. No obstante, los datos obtenidos de

las hembras en diestro y lactantes después de la inyección de L-NAME, muestran que el efecto de la inhibición del NO en las hembras en diestro promueve una disminución de la expresión de CRF en el PVH con respecto al grupo que se sometió a restricción de movimiento y en las hembras lactantes el mismo tratamiento incrementa la expresión de CRF lo cual sugiere, como previamente ha sido demostrado por Gadek-Michalska y Bugajski en 2008, que el resultado de la inhibición del NO sobre la actividad del eje HPA, y en este caso en particular la expresión de CRF, va a estar definida de manera importante por la cantidad de NO que se esté produciendo. En este sentido, se sabe que el NO tiene la capacidad de autoregular su producción desactivando a su sintasa neuronal. En nuestros resultados observamos que después de la aplicación de L-NAME y someter a los animales a restricción de movimiento hay aparentemente más neuronas positivas a CRF, aumento en la expresión de CRF y en el nivel de corticosterona circulante con respecto al control. Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento no ha sido posible dilucidar si hay un efecto aditivo de la inhibición del NO y el estrés o es únicamente el efecto de la inhibición del NO o que incluso la cirugía para administrar las soluciones icv tenga un efecto como el que se observa al inyectar solución salina antes de la restricción antes de la restricción en hembras en diestro y lactantes.

Aun cuando esta tesis se centra en analizar la actividad del eje HPA y en particular la del PVH, resultan también de gran interés núcleos que lo inervan y que están íntimamente relacionados con las respuestas límbicas durante la lactancia y ante un estímulo estresante como es la amígdala. Parte de los resultados que se han obtenido y analizado hasta el momento en relación con éste núcleo muestran que no hay una expresión de CRF basal diferente entre las dos condiciones hormonales, ni tampoco una respuesta diferente ante los estímulos estresantes aplicados, ya que tanto hembras en diestro como lactantes incrementan su expresión de mRNA de CRF ante el estrés por restricción y la respuesta no es diferente entre los grupos experimentales. Al administrar el inhibidor de NO nuevamente encontramos una respuesta diferencial entre hembras en diestro y lactantes, ya que en diestro disminuye la expresión de CRF y en las lactantes aumenta, incluso al aplicar estrés por restricción se observó un incremento en la expresión de CRF. Estos resultados, resultan de gran interés considerando que previamente se ha demostrado la pérdida de la agresión ante un intruso como parte de la conducta materna al aplicar L-NAME icv, que coincide con

nuestros resultados en los que se observa una recuperación de la expresión a la restricción de movimiento en la amígdala (Popeski y Woodside, 2004).

Estos resultados muestran que la lactancia afecta los mecanismos de regulación del NO ante un estímulo estresante, y que el NO participa en la atenuación de la respuesta del PVH al estrés durante esta etapa reproductiva.

8. CONCLUSION

Conclusiones

- La respuesta neuroendócrina al estrés durante la lactancia se encuentra atenuada, independientemente de la naturaleza del estrés aplicado.
- La inhibición de la síntesis del NO, produce la activación del eje HPA, en términos de todos los parámetros medidos en este trabajo, y en ambas condiciones hormonales.
- Al inhibirse la producción de NO previa a la exposición del estrés, se observa una respuesta diferencial en función de: la condición hormonal de las ratas y la naturaleza del estímulo.

A continuación, se resumen las principales diferencias observadas al administrarse el inhibidor del NO, L-NAME, previo a los estímulo estresantes:

Ovoalbúmina

- Indujo actividad en la subdivisión Parvocelular las ratas en diestro y en la magnocelular del PVH de ambas condiciones hormonales.
- Aumenta el marcaje para VP, en ambos grupos hormonales
- En el PVH de ambos grupos experimentales, la marca para CRH no se modifica en comparación de los animales que no reciben L-NAME, previo al estrés.
- El nivel de CORT aumenta en las ratas en diestro
- No se modifica el nivel de CORT, en las hembras lactantes

Restricción

- Promovió la actividad en la subdivisión Parvocelular del PVH de ambos grupos hormonales.
- Disminuyó VP y CRF en el PVH de hembras en diestro
- Indujo CRF en el PVH y la amígdala de hembras lactantes

-
- Se mantuvo elevado el nivel de CORT, inducido por L-NAME en ratas

Estos resultados sugieren que, independientemente de la naturaleza del estrés que se aplique durante el periodo de lactancia, el NO tiene un papel fundamental en la atenuación de la respuesta neuroendócrina al estrés. Dicha disminución de la respuesta al estrés puede ser revertida, al inhibir la producción de NO previo al estrés.

El siguiente esquema ilustra la señalización que se propone subyace al efecto inhibitor del óxido nítrico sobre la respuesta neuroendócrina al estrés durante la lactancia. En este periodo, la producción elevada y constante de NO que promueve la succión, va a mantener la excitación de las interneuronas GABAérgicas que se encuentran en la región periventricular y envían sus proyecciones al PVH. Lo que resultará en una liberación de GABA exacerbada en las neuronas de CRH y por ende, la inhibición de su secreción, contribuyendo así a la atenuación de la respuesta neuroendócrina al estrés.

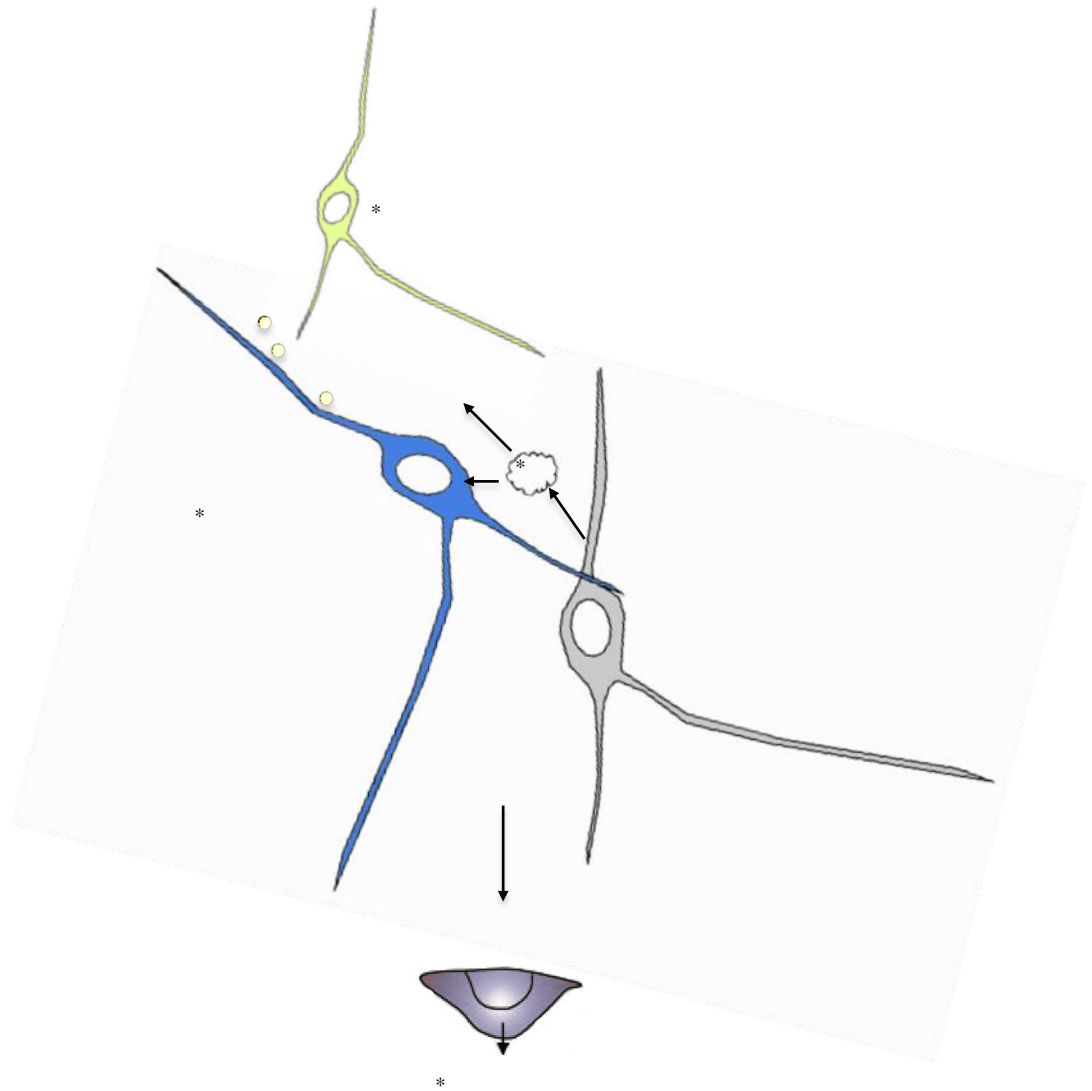


Figura 40. Esquema ilustrativo de las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo durante la lactancia. La imagen muestra una representación de las neuronas producen NO y estimulan a las interneuronas para la liberación GABA sobre las neuronas del PVH y promover su inhibición.



- Alonso JR, Sanchez F, Arevalo R, Carretero J, Vazquez R, Aijon J. Partial coexistence of NADPH-diaphorase and somatostatin in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci. Lett.* (1992) 14:101-104.
- Armstrong WE, Hatton GI. The puzzle of pulsatile oxytocin secretion during lactation: some new pieces. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* (2006) 291:R26-28.
- Banky Z, Nagy GM, Halasz B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology.* (1994) 59:63-71.
- Besedovsky HO, del Rey A. Introduction: immune-neuroendocrine network. *Front Horm Res.* (2002) 29:1-14.
- Blanco E, Jirikowski GF, Riesco JM, Juanes JA, Vazquez R. Coexistence of NADPH-diaphorase with tyrosine hydroxylase in hypothalamic magnocellular neurons of the rat. *Neuropeptides* (1997) 31:227-230.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* (1994) 63:175-195.
- Brunton PJ, Sabatier N, Leng G, Russell JA. Suppressed oxytocin neuron responses to immune challenge in late pregnant rats: a role for endogenous opioids. *Eur. J. Neurosc.* (2006) 23:1241-1247.
- Buller KM. Neuroimmune Stress Responses: Reciprocal connections between the hypothalamus and the brainstem. *Stress* (2003) 6:11-17.
- Buxton IL, Cheek DJ, Eckman D, Westfall DP, Sanders KM, Keef KD. Nw-nitro-l-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res* (1993) 72: 387-395.
- Calka J, Block CH. Relationship of vasopressin with NADPH-diaphorase in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res. Bull.* (1993) 32:207-210.
- Calka J, Block CH. Angiotensin-(1-7) and nitric oxide synthase in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res. Bull.* (1993) 30:677-685.
- Calka J, Wolf G, Brosz M. Ultrastructural demonstration of NADPH-diaphorase histochemical activity in the supraoptic nucleus of normal and dehydrated rats. *Brain Res. Bull.* (1994) 34:301-308.
- Calza L, Giardino L, Cecatelli S. NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *NeuroReport* (1993) 4:627-630.
- Carter DA, Lightman SL. Oxytocin responses to stress in lactating and hyperprolactinaemic rats. *Neuroendo.* (1987) 46:532-537.

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

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

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

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

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

Connor JR, Davis HN. Postpartum estrus in norway rats. II. Physiology. *Biology of Reproduction* (1980) 23:1000-1006.

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

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

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

da Costa AP, Ma X, Ingram CD, Lightman SL, Aguilera G. Hypothalamic and amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH receptor-1 mRNA expression in the stress-hyporesponsive late pregnant and early lactating rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 91: 119–130.

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

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

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

Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Díaz MC. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohipophysis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 170-174.

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

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

Guevara-Guzmán R, Emson PC, Kendrick KM. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J. Neurochem.* (1994) 62: 807-810.

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

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

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

Herman JP, Mueller NK, Figueiredo H. Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1018: 35–45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leonard TO, Lydic R. Nitric oxide synthase inhibition decreases pontine acetylcholine release. *Neuroreport* (1995) 6: 1525-1529.

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

Luckman SM, Hockett L, Bicknell RJ, Voisin DL, Herbison AE. Up-regulation of nitric oxide synthase messenger RNA in an integrated forebrain circuit involved in oxytocin secretion. *Neuroscience* (1997) 77: 37-48.

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

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

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

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

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

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

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

Monasterio N, Ramos E, Morales T. Changes in c-Fos and NOS expression in the PVH of lactating rats in response to excitotoxicity and stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec;1148:161-4.

Monasterio N, Morales T. Nitric oxide has a role in attenuating the neuroendocrine response to anaphylactoid stress during lactation. *Brain Res.* 2011 Jul 21;1402:54-66

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

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

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

Neumann ID, Johnstone HA, Hatzinger M, Liebsch G, Shipston M, Russell JA, Landgraf R, Douglas AJ. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *J Physiol* 1998; 508: 289–300.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pögün S, Kuhar MJ. Regulation of neurotransmitter reuptake by nitric oxide. *Ann. NY. Acad. Sci.* (1994) 738: 305-315.

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

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

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

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

Prast H, Fischer HP, Prast M, Philippu A. In vivo modulation of histamine release by autoreceptors and muscarinic acetylcholine receptors in the rat anterior hypothalamus. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* (1994) 350: 599-604.

Prast H, Lamberti C, Fischer H, Philippu A. Modulation of histamine release in the hypothalamus by nitric oxide. *Inflamm. Res.* (1997) 46: S41-42

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

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

Rettori V, Canteros G, Renoso R, Gimeno M, McCann SM. Oxytocin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamic explants by releasing nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94: 2741-2744.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Seilicovich A, Duvilanski BH, Pisera D, Theas S, Gimeno M, Rettori V. Nitric oxide inhibits hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release by releasing gamma-aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 3421-3424.

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

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

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

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

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

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

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

Stern JM, Voogt JL. Comparison of plasma corticosterone and prolactin levels in cycling

and lactating rats. *Neuroendocrinology*. (1973-1974) 13:173-181.

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

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

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

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

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

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

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

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

Toufexis DJ, Walker CD. Noradrenergic facilitation of the adrenocortico- tropin response to Da Costa y col., 1997; Lightman y col., 2001; Douglas, 2005; Shanks y col., 1999; Windle y col., 1997, 2006, Neumann y col., 2005, Toufexis y Walker, 1996, Brunton y col., 2006 is absent during lactation in the rat. *Brain Res* 1996; 737: 71–77.

Toufexis DJ, Thirvikraman KV, Plotsky PM, Morilak DA, Huang N, Walker CD. Reduced noradrenergic tone to the hypothalamic paraventricular nucleus contributes to the stress hyporesponsiveness of lactation. *J Neuroendocrinol* 1998; 10: 417–427.

Toufexis DJ, Tesolin S, Huang N, Walker C. Altered pituitary sensitivity to corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin participates in the stress hyporesponsiveness of lactation in the rat. *J Neuroendo- crinol* 1999; 11: 757–764.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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