



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
POSGRADO DE MEDICINA**

Efecto de la Prolactina Sobre la Alteración del Aprendizaje Dependiente de Hipocampo Causada por el Estrés en Ratas Macho.

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias de la Salud**

**PRESENTA
Eréndira Tinajero Juárez**

Directores de Tesis:

**D. C Ma. De La Luz Torner Aguilar
D.C José Miguel Cervantes Alfaro**

2010

ÍNDICE

	Pág.
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes Generales	6
3.1. Estrés agudo	¡Error! No
se encuentra el origen de la referencia.6	
3.2. Estrés crónico	8
3.3. Inhibición a Glucocorticoides	10
3.4. Receptores a Glucocorticoides	11
3.5. Sistemas de memoria	12
3.6. Circuito Trisinaptico	15
3.7. Aprendizaje espacial e hipocampo	16
3.8 Aprendizaje Hipocampo y Estrés	18
3.9 Prolactina	18
3.10 Fuentes de producción de prolactina	20
3.11Receptores prolactina	21
3.12 fuentes biológicas de la prolactina	23
3.13 Prolactina y sistema nervioso central	25
IV Hipótesis	29
V Objetivos	29
VI. Materiales y métodos	30
VII. Resultados	40

VIII.	Discusión	51
IX.	Conclusión	59
X.	Referencias bibliográficas	

I. **RESUMEN**

El estrés fue definido por Selye en 1936 como una respuesta adaptativa del organismo ante eventos amenazantes, que involucran una alteración en la homeostasis corporal. Ante un evento estresante se activa el eje HPA (por sus siglas en ingles Hipotálamo, Hipófisis, Suprarrenales) en donde el hipotálamo libera la hormona liberadora de Corticotropina (CRH), esta a su vez estimula la pituitaria y se secreta la Hormona adrenocorticotropa (ACTH) la que a su vez estimula la liberación de glucocorticoides (GCs). Se sabe que los GCs ejercen sus acciones a través de receptores específicos del tipo mineralocorticoide (MR) o glucocorticoide (GR), en áreas como el hipocampo que es una estructura neural relacionada con procesos conductuales como el aprendizaje y la memoria. Se sabe que dependiendo de la concentración, los GCs ejercen acciones distintas mejorando o dañando procesos de aprendizaje y memoria en las estructuras que gobiernan estos procesos. Otro tipo de hormonas también ejercen acciones sobre las estructuras neurales relacionadas con la cognición como son los estrógenos, la progesterona, y la prolactina (PRL). Esta última ejerce efectos también como neuromodulador en diversas conductas tales como la ansiedad, la conducta maternal y la conducta aversiva. Recientemente se demostró que la PRL administrada en el ventrículo cerebral disminuye la activación neuronal bajo condiciones sin estrés en áreas tales como la amígdala central, y la región CA1 hipocampal; bajo condiciones de estrés, la PRL disminuye la activación de los núcleos paraventriculares del hipotálamo, el giro dentado y la región CA3 dorsal hipocampal, pero activa las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo ventral. El hipocampo además expresa a los receptores de PRL. Ahora bien, se conoce que la exposición crónica al estrés altera en forma negativa el aprendizaje espacial y esto se ha relacionado con una reducción en la plasticidad hipocampal. La administración diaria de PRL en ratones crónicamente estresados contrarresta la reducción en la neurogenesis hipocampal. Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la presencia de altas concentraciones de PRL en ratas macho (Hiperprolactinémicas) facilitan el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, comparadas con animales control (Sham). Dicho aprendizaje esta regulado por las áreas CA1 y CA3 del hipocampo. Estos datos sugieren que la PRL modula el aprendizaje de tipo espacial bajo condiciones sin estrés. Por todo lo anterior, y dado que la PRL parece tener un papel neuroprotector proponemos que la PRL mejorara el aprendizaje dependiente de hipocampo bajo condiciones de estrés.

Para ello utilizamos ratas macho de la cepa Sprage- Dawley de 2 y medio- 4 meses de edad con un peso de 225 – 500gr. A un grupo (Hiperprolactinémicos) se les trasplantaron 2 hipófisis a la capsula renal para generar Hiperprolactinemia, y otro grupo de animales fueron operados sin efectuar el trasplante (Sham). Ambos grupos tuvieron 7 días de recuperación. Posteriormente los animales fueron sometidos durante 14 días consecutivos a estrés por inmovilización o permanecieron sin perturbar; al término de este periodo los animales se sometieron en forma consecutiva a las siguientes pruebas

conductuales: laberinto elevado en cruz, campo abierto, laberinto de morris, y reconocimiento de objetos. Los sujetos continuaron con el paradigma de estrés por inmovilización aun durante las pruebas conductuales. Al término de las pruebas los animales fueron sacrificados y sus muestras de suero se analizaron mediante ensayos de ELISA, para determinar la concentración de prolactina. Únicamente los animales con concentraciones altas de prolactina fueron incluidos en el análisis de los resultados

Las curvas de aprendizaje en el laberinto acuático de morris mostraron una reducción progresiva en todos los grupos: Sham Control (SC), Hiperprolactinémicos Control (HC), Sham estrés (SE), e Hiperprolactinémicos Estresados (HE). Si bien no hubo diferencias significativas intergrupales, la distancia recorrida por el grupo HC fue significativamente menor ($p < 0.001$) a partir del tercer día comparado con la distancia recorrida por el grupo Sham, lo que indica un efecto facilitatorio del aprendizaje espacial por la PRL. El grupo SE mostro una mejor curva de aprendizaje al igual que el HE reduciendo significativamente sus distancias desde el día 2 coincidiendo con sus latencias. Esto sugiere que el estrés no parece estar causando daño en el aprendizaje de tipo espacial, al contrario parece mejorar el aprendizaje. En la prueba del reconocimiento de objetos el grupo SC disminuyó significativamente el tiempo de exploración del objeto conocido versus el objeto novedoso. En contraste el grupo HC no mostró diferencias en el tiempo de exploración entre ambos objetos, lo que indica que la prolactina altera el reconocimiento de un objeto nuevo. En los grupos SE y HE esta alterado el reconocimiento de un objeto nuevo ya que no hubo diferencias en el tiempo de exploración de ambos objetos. Esto sugiere que el estrés altera en forma selectiva el reconocimiento de objetos, el cual depende del giro dentado del hipocampo. En el laberinto en cruz, los animales HC parecen ser menos ansiosos por tener mayor numero de entradas a los brazos abiertos ($p = 0.0204$) y tener una tendencia a pasar mas tiempo en los brazos abiertos ($p = 0.08$), sin embargo mostraron una mayor locomoción ($p < 0.01$) que los SC. Y los SE presentan una tendencia a ser menos ansiosos con un mayor número de entradas al brazo abierto ($p = 0.064$). En el campo abierto el SE realizo un mayor número de cruces al centro y mostró una tendencia a pasar mas tiempo en el centro, también el grupo HE mostró una tendencia a pasar mas tiempo en el centro. Y el grupo SC presenta una mayor latencia al centro. Estos resultados nos indican que el estrés no causa daño o que los animales tenían una mayor manipulación que nuestros controles, la PRL parece ser ansiolítico y causar mayor locomoción.

En conclusión, confirmamos que la prolactina facilita el aprendizaje espacial, pero disminuye el reconocimiento de un objeto novedoso. El tipo de estrés sufrido por los animales parece no causar daño en el aprendizaje de tipo espacial que depende de las áreas CA1 y CA3, pero si causa daño en el reconocimiento de un objeto nuevo, dependiente de giro dentado. En las pruebas de ansiedad los animales estresados no resultaron mas ansiosos tal vez porque interfiera la manipulación experimental de los animales estresados, sin embargo se confirmó el efecto del estrés en las otras pruebas conductuales y en la hiperplasia vista en las suprarrenales. Estos resultados confirman

que la prolactina ejerce efectos diferentes sobre el aprendizaje dependiendo del área cerebral implicada.

II. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos mantienen un equilibrio dinámico complejo conocido con el término de homeostasis, la cual es constantemente amenazada por fuerzas adversas externas e internas llamadas estresores. El estrés ocurre cuando la homeostasis es amenazada por eventos o circunstancias reales o percibidas como amenazantes, y es restablecida por varias respuestas adaptativas fisiológicas y conductuales (Chrousos, 2009). Los seres vivos desde el momento de su existencia perciben al medio ambiente en indudable hostilidad donde a lo largo de la vida se van enfrentando a diferentes situaciones estresantes que pueden ser un escaparate para enfrentar el mundo dependiendo del lugar en donde habiten. Por ejemplo en el medio ambiente de un antílope su integridad se ve amenazada cuando va a ser cazado por un león, por lo que es necesario que el antílope para lograr su supervivencia cuente con la respuesta fisiológica adecuada para huir del peligro. Para ilustrar los mecanismos internos que se manifiestan en este ejemplo que citamos mencionaremos que es necesario que se active el sistema nervioso simpático, el cual mantiene alerta al individuo para reaccionar ante el peligro y de esta manera decidir huir o confrontar el peligro. Este mecanismo se manifiesta como un beneficio evolutivo para mantener la permanencia de las especies, pero en el caso del humano las situaciones estresantes que se viven actualmente por ejemplo cuando hay problemas en el trabajo, el tráfico a diario, problemas socioeconómicos etc., en estas situaciones no es gratificante por lo contrario este tipo de estrés puede causar grandes daños a la salud de los humanos. Se han utilizado modelos en animales de laboratorio para estudiar los efectos fisiológicos y cognitivos causados por el estrés. Se sabe que los tipos de estresores conocidos

como psicológicos y psicosociales son los más dañinos entre los miembros de la misma especie (Chrousos, 2009).

El estrés se ha definido como una respuesta adaptativa del organismo ante eventos amenazantes; Selye en 1936 fue el primero que acuñó este término. Se dice que el estrés es uno de los estímulos externos que amenaza la homeostasis corporal- el equilibrio normal de las funciones del cuerpo-. El estrés se ha dividido en dos tipos: estrés agudo y estrés crónico, el primero causa una activación metabólica rápida para mantener al individuo en un estado alerta, en este sentido es un beneficio para el individuo, y el segundo tipo es un estrés prolongado en el cual se ha reportado que causa alteraciones dañando el estado físico y mental del individuo, causando enfermedades tales como la obesidad, artritis, depresión y daño en la capacidad cognitiva como el aprendizaje. Las alteraciones que se dan a nivel fisiológico con el estrés ocurren en parte por la activación del eje HPA (hipotálamo-hipófisis-adrenales) que da como consecuencia la liberación de hormonas, las cuales se conoce que contribuyen con una gran diversidad de funciones para mantener la homeostasis corporal. Las hormonas son mensajeros químicos producidos en glándulas de secreción interna o glándulas endócrinas (Baulieu EE y Kelly PA. 1990). Dichos mensajeros están especializados en la regulación general del organismo así como también en la autorregulación de un órgano o tejido. Actualmente se conoce que en su mayoría las hormonas constituyen familias de variantes moleculares estructuralmente relacionadas, que se producen tanto por células endocrinas como por otros tipos celulares. De tal forma, estos mensajeros químicos pueden ejercer efectos a distancia vía la circulación sistémica (efectos endócrinos) pero también efectos locales ya sea sobre la misma célula que las produce (efectos autócrinos), como sobre otros tipos celulares (efectos parácrinos) (Baulieu EE y Kelly PA. 1990). Un ejemplo de estas son la liberación de hormonas Glucocorticoides (GCs) (corticosterona en ratas y cortisol en humanos) que se liberan en respuesta a la estimulación de este eje HPA, y se sabe que la presencia de estas en el cerebro causan alteraciones

dependiendo de las concentraciones: pueden ser beneficiosas en el caso de un estrés agudo o causar un daño cuando se presenta estrés crónico. Se ha encontrado que como consecuencia del estrés, ya sea agudo o crónico, existen alteraciones en procesos cognitivos en áreas relacionadas con procesos de aprendizaje y memoria. A consecuencia de la presencia de los Gcs, se modifica la morfología neural del sistema nervioso central (SNC) específicamente en áreas ubicadas en el lóbulo temporal medial como el hipocampo. que es un área esencial para los procesos que regulan el aprendizaje y la memoria. El hipocampo se ha dividido en áreas CA1, CA2, CA3,CA4 y Giro dentado. Se sabe que la arborización dendrítica del área CA3 del hipocampo es una estructura cerebral relacionada con el aprendizaje de tipo espacial y los ambientes novedosos (Eichenbaum, 2004; Scoville & Milner, 1957), muy vulnerable al estrés, el cual causa mayor o menor arborización dendrítica según sea la magnitud del evento estresante y/o su frecuencia (McEwen y Sapolsky, 1995). Asimismo, el estrés causa alteraciones en el aprendizaje espacial en roedores actuando sobre los receptores a GCs que se encuentran en esta estructura que modula las respuestas de aprendizaje y memoria.

La hormona Prolactina (PRL) existe en todos los vertebrados estudiados, y se le conocen más de 100 funciones biológicas distintas (Nicoll, 1974, Bern, y cols. 1968). Sus acciones incluyen efectos osmorreguladores, regulación de la reproducción, de la respuesta inmune, de la proliferación, y la diferenciación celular. El principal sitio de producción de la PRL es la adenohipófisis, sin embargo a la fecha se han identificado diversas fuentes extrahipofisarias de producción de PRL tales como la decidua uterina, el sistema inmune y recientemente se ha encontrado su presencia en el SNC. (Baulieu EE y Kelly PA. 1990).

Dentro de las diversas acciones de la prolactina (PRL), se le ha identificado como un regulador de diversas conductas tales como la conducta maternal, la ingesta de alimentos, la conducta sexual, el ciclo sueño vigilia y la ansiedad, actuando a través de sus receptores presentes en diversas estructuras cerebrales. En

particular, hay indicios de que diferentes zonas del hipocampo, modifican su estado de activación en respuesta a la administración intracerebral aguda de PRL. (Crume rolle-Arias y cols., 1993). Recientemente se demostró que la prolactina (PRL) administrada en el ventrículo cerebral disminuye la activación neuronal bajo condiciones basales en áreas tales como la amígdala central, el giro dentado y la región CA3 hipocampal; y bajo condiciones de estrés disminuye la activación de los núcleos paraventriculares del hipotálamo y además expresa a los receptores de PRL. Ahora bien, se conoce que la exposición crónica al estrés altera en forma negativa el aprendizaje espacial y esto se ha relacionado con una reducción en la plasticidad hipocampal. Por otra parte se observó que la administración diaria de PRL en ratones crónicamente estresados previene la disminución de la neurogénesis hipocampal. Estos antecedentes sugerían que la PRL pudiera tener algún efecto sobre las funciones del hipocampo. Así, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la presencia de altas concentraciones de PRL en ratas macho (Hiperprolactinémicas) facilita el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, comparadas con animales control (Sham). Dicho aprendizaje está regulado por las áreas CA1 y CA3 del hipocampo. Por otra parte el reconocimiento de un objeto nuevo, dependiente de otra área hipocampal como es el giro dentado, se vio alterado en los animales Hiperprolactinémicos. Estos datos sugieren que la PRL modula el aprendizaje de tipo espacial bajo condiciones sin estrés. En este trabajo evaluamos el efecto de la prolactina sobre el aprendizaje dependiente de hipocampo bajo condiciones de estrés crónico.

III. ANTECEDENTES GENERALES

3.1 ESTRÉS AGUDO.

El estrés es definido como un estado en el cual la homeostasis es actualmente amenazada o percibida como tal; la homeostasis del organismo es re-establecida

por un complejo repertorio de respuestas adaptativas fisiológicas y conductuales (Chrousos G. 2009). Cuando el organismo se enfrenta a una amenaza se requiere un cambio fisiológico crucial apropiado para que se den las respuestas al estrés que controlan y proveen de un esfuerzo extra que es la energía necesaria para hacer frente o huir de la situación que confronte el individuo. Estos cambios que ocurren en el individuo toman lugar en el sistema nervioso central (SNC) y en órganos y tejidos periféricos. En el SNC las respuestas que se dan en torno a una situación estresante es la activación neural que incluyen el mantenerse despierto, alerta, vigilante y la atención enfocada, y por otro lado la inhibición en funciones no necesarias en ese momento tales como la alimentación, crecimiento y reproducción. Dichos cambios ocurren internamente y están a cargo de tres diferentes sistemas que son los principales sistemas de comunicación en el cerebro que regulan las funciones del cuerpo: El primero es el sistema nervioso voluntario el cual envía mensajes a los músculos para permitir responder a la información sensorial. El segundo sistema de comunicación es el sistema nervioso autónomo que está dividido por el sistema simpático y parasimpático; el simpático va a contender a las emergencias mientras que el sistema nervioso parasimpático mantiene el sistema de conservación del cuerpo, como la digestión para ordenar y equilibrar las respuestas del cuerpo ante la emergencia (Chrousos, 2009) Cada uno de estos sistemas tienen una tarea específica, el simpático por su parte tiene como tarea que las arterias suministren sangre a los músculos para relajar y liberar más fluido para continuar y tener una gran capacidad para actuar. Al mismo momento el fluido sanguíneo va hacia la piel, riñón, y otros sistemas se mantienen disminuidos como es el tracto digestivo para poder suplir y tener un incremento en músculo. En contraste el sistema parasimpático ayuda a regular las funciones y calmar al cuerpo cuando el evento de estrés ha pasado, y previene al cuerpo para mantener un largo estado de movilización. Además también los cambios relacionados con el estrés guían a un incremento en la oxigenación y nutrición del cerebro, corazón y músculo esquelético los cuales son todos los órganos cruciales

para la coordinación central de las respuestas al estrés y para la reacción de pelea o huida. (Chrousos G. 2009). El tercer proceso de comunicación del cerebro es el sistema neuroendocrino el cual mantiene las funciones internas del cuerpo, estas funciones están a cargo de la hormonas que viajan a través de la circulación y estimulan la liberación de otras hormonas los cuales afectan los procesos corporales, tal como el metabolismo y la función sexual. Las principales hormonas del estrés son epinefrina (mejor conocida como adrenalina) y glucocorticoides (GCs) (corticosterona en ratas y cortisol en Humanos). Cuando el cuerpo es expuesto a estresores, la epinefrina es rápidamente liberada dentro de la circulación sistémica, y pone al cuerpo en un estado general de alerta y capacidad para hacer frente al desafío. También la glándula adrenal secreta los GCs los cuales son hormonas que se producen en respuesta al estrés, estos tienen la función de movilizar la energía en la circulación sanguínea de los sitios de almacén del cuerpo. Esto es incrementando del tono muscular y retrasando otros procesos del cuerpo que no son esenciales en el momento de la crisis, tal como alimentación, digestión, crecimiento y reproducción. El estrés agudo también se ha sugerido que aumenta la capacidad de memoria en situaciones amenazantes. Es sabido que una exposición breve de estrés aumenta la adquisición en respuesta a condicionamiento clásico (shors y cols., 1992; Shors y Servatius, 1995). También en exposiciones breves de estrés se incrementa la actividad del sistema inmune ayudando a proteger el cuerpo de patógenos. Así, decimos que los GCs que se liberan en respuesta al estrés son una parte integral de la vida diaria y la adaptación a los cambios del medio ambiente.

3.2 ESTRÉS CRÓNICO

Está claro que la activación del eje HPA en respuesta a la estimulación aguda es adaptativo y esencial para la supervivencia de los organismos; sin embargo, el estrés crónico puede guiar a alteraciones específicas en la actividad de estos circuitos que pueden ser considerados como patológicos (López JF, Akil H, y

Watson SJ, 1999). La exposición a eventos estresantes de manera prolongada desemboca en lo que denominamos estrés crónico, y se manifiesta tanto en animales como en humanos. Con la presencia de estresores se evoca la secreción de hormonas la cual inicia con la activación del eje hipotálamo- pituitaria- adrenales (HPA). Dicha activación propicia la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por los núcleos paraventriculares del hipotálamo hacia el sistema portal hipofisiario. El CRH estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) por las células de la pituitaria anterior lo que estimula a su vez la secreción de Glucocorticoides (GC) por las suprarrenales. Existen estresores tanto externos como internos que activan el eje HPA, cuando los GCs son secretados en respuesta a un estrés psicológico prolongado que es uno de los estresores más perjudiciales. Este tipo de estrés es actualmente común en la vida de los humanos y sus consecuencias no son nada favorables, por el contrario se ha visto que causa varios tipos de patologías. En particular las hormonas del estrés la corticosterona o cortisol se sabe que tiene estructuras blanco en el cerebro, tales como el hipocampo (de kloet E.R, 2000), y este descubrimiento es particularmente importante para entender la influencia del estrés en el cerebro. Como se ha señalado normalmente los sistemas corporales que se encuentran bajo la influencia de las hormonas del estrés, y sobre todo en estructuras que participan en la cognición como el hipocampo se ha encontrado que mejoran la memoria, pero si se tiene un estrés prolongado los sistemas se están estimulando continuamente, la liberación de hormonas se mantiene continua y esta situación se conoce como estrés crónico, cuyas consecuencias son diferentes: la memoria es dañada, la función inmune esta suprimida, y la energía es almacenada en grasa. Los niveles elevados de epinefrina aumentan la presión sanguínea y con niveles elevados de epinefrina y corticosterona o cortisol en el caso de los humanos puede contribuir a enfermedades metabólicas como hipertensión crónica (presión arterial alta), obesidad abdominal y aterosclerosis. El estrés crónico con niveles elevados de GCs puede retrasar el inicio de sueño o contribuir

a la pérdida del mismo, además se han identificado una variedad de padecimientos a causa del estrés crónico, como colitis, presión arterial alta, impotencia sexual en machos e irregularidades en el ciclo menstrual en hembras, y diabetes en adultos. Así como las hormonas del estrés tienen órganos blanco a nivel periférico, también se han reportado acciones dañinas en la función neuronal en el hipocampo que es el área importante para el aprendizaje, memoria y cognición (de Kloet et al., 1999), esto como consecuencia de los niveles elevados de GCs. Así, como también la exposición crónica al estrés altera en forma negativa el aprendizaje espacial y esto se ha relacionado con una reducción en la plasticidad hipocampal, (Wolf OT, 2003). Se ha observado que la exposición crónica a estresores, o la administración prolongada de GCs reduce la generación de nuevas neuronas en giro dentado del hipocampo y modula la densidad de espinas sinápticas en la región CA1 del hipocampo, y causan una atrofia de las dendritas apicales de la región CA3 (Wolf OT, 2003).

Existen diversos estudios que han demostrado que la exposición crónica a estresores en forma diaria por 3 semanas puede inducir deficiencias en el aprendizaje de tareas dependientes del hipocampo (McEwen, 2000). Como ejemplo, se ha demostrado que una exposición prolongada al estrés puede dañar la discriminación del aprendizaje espacial en ratas (Luine y cols, 1994; Bodnoff y cols, 1995). La exposición de un periodo largo de estrés en ratas aumenta las concentraciones de corticosterona y por lo tanto se atenúa el desempeño cognitivo (Dachir y cols. 1993; Luine y cols, 1993).

3.3 INHIBICIÓN A GLUCOCORTICOIDES

Un mecanismo importante de este sistema neuroendocrino es la inhibición de la secreción de GCs, que se manifiesta principalmente por la unión de la circulación de GCs a sus receptores citoplásmicos en el hipotálamo donde inhiben la liberación de CRH y consecuentemente la secreción de ACTH en la pituitaria. Se conocen tres diferentes tipos de mecanismos independientes: un sistema de

retroalimentación rápido que se da en cuestión de minutos, un sistema de retroalimentación intermedio y un sistema de retroalimentación con retraso donde se da un sistema absoluto que es monitoreado e inhibido por la unión de GCs a sitios específicos del receptor en el hipotálamo y estructuras límbicas incluyendo el hipocampo, y que se desarrolla en un curso de horas a días (Keller-Wood and Dallman 1984). Sin embargo es un hecho complejo la translocación de receptor-GCs a nivel transcripcional en donde se requiere la supresión de CRH y la expresión de genes. La acción inhibitoria de las neuronas CRH por los GCs que tiene lugar en las conexiones neurales del hipocampo a las neuronas CRH hipotalámicas (Dallman et al 1987), y parece jugar un rol critico en la inhibición de la secreción de ACTH. El hipocampo es un importante regulador de la respuesta al estrés ya que se ha demostrado que lesiones en esta estructura causa una desregulación del eje y por lo tanto una continua secreción de GCs. Con niveles elevados de GCs el control inhibitorio en la subregión hipocampal CA1 pueden ser dañada y sus elementos de retroalimentación perdidos (de Kloet y cols., 1998) Además, el hipocampo es el componente central del circuito límbico para controlar los aspectos de las funciones conductuales y cognitivas, un punto clave en la integración de ambas respuestas psicológicas y fisiológicas ante el estrés (López JF, Akil H, and Watson SJ, 1999).

3.4 RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES

Los receptores a GCs han sido descritos en el cerebro basados en sus características bioquímicas y funcionales (de Kloet et al 1998; Reul and de Kloet 1985). Existen dos tipos de receptores a Gcs, el tipo I que es el receptor Mineralocorticoide (RM) y el tipo II receptor a Glucocorticoide (RG); estos receptores tienen distinta afinidad por los GCs ya que el RM es de mayor afinidad y por esta razón se encuentra unido a concentraciones bajas de Gcs. El receptor a

GCs tipo II es de menor afinidad por lo que cuando se encuentra unido es cuando existen altas concentraciones de GCs. El hipocampo contiene a ambos tipos de receptores (López et al, 1999). Esta estructura también se conoce que actúa como un sistema de retroalimentación negativa sobre el eje HPA, ya que se sabe que el hipocampo contiene una alta densidad de ambos tipos receptores RM y RG y por su afinidad están actuando a través del RG sobre la pituitaria y sobre el núcleo paraventricular del hipotálamo.

Se ha encontrado su participación de ambos receptores en el hipocampo tanto de ratas como de humanos y parecen participar en las funciones distintas dentro del hipocampo. Se ha documentado que los RM con diferencias en las neuronas en donde se encuentre para el almacén de información aprendizaje o recuerdo de la información almacenada (memoria). El hipocampo es una estructura ubicada en el lóbulo temporal medial y contiene una alta densidad de receptores a GCs y es particularmente vulnerable a la influencia de los mismos, esta estructura esta involucrada en la regulación de eje HPA, y en aspectos de memoria y aprendizaje. (Hibberd C y cols., 2000).

3.5 SISTEMAS DE MEMORIA

La propiedad fundamental de la conducta adaptativa es la habilidad para usar eficientemente la representación que se encuentra almacenada para lograr predicciones futuras y de esta manera rápidamente responder para actualizar nuestro conocimiento del mundo en una fase de cambio. (Sokolov, 1963; O'Keefe and Nadel, 1978; Gray, 1982). Una parte importante de este tipo de conducta adaptativa se manifiesta en la capacidad de aprendizaje.

Desde hace más de 20 años se han descrito los procesos de aprendizaje y memoria en el laboratorio con animales de experimentación. Con base a estos estudios se han descubierto la existencia de diversos sistemas de aprendizaje y memoria, como las evidencias que ha presentado Brenda Milner con un paciente

que por sus siglas fue llamado paciente HM en los años 50s. Esta persona desde niño sufría epilepsia, y fue intervenido quirúrgicamente en donde le fue extirpado un tumor en el lóbulo temporal medial y el problema fue aliviado. Sin embargo después de la cirugía el paciente presento una severa amnesia, el podía recordar eventos recientes por tan solo pocos minutos y era incapaz de formar memorias explicitas de nuevas experiencias, por ejemplo cuando hablaba con él, su medico o cualquier persona al día siguiente que lo veían él no recordaba haberlo visto antes. Se observo que este paciente presentaba distintos patrones de conducta en donde el podía perfectamente realizar una tarea en donde al darle a recordar un numero lo podía retener pero al darle el numero y darle un retraso de 15 minutos no podía recordarlo, además el paciente HM podía perfectamente realizar tareas de procedimientos, con estos datos se apoyó la observación de los distintos patrones de conducta, y con ello el descubrimiento de que existen diferentes sistemas de memoria. Después de un estudio post mortem se encontró que este paciente tenía lesiones en el lóbulo temporal medial (LTM) específicamente en el sistema límbico - hipocampo, parahipocampo, y amígdala. Las regiones del LTM establecen conexiones con áreas de la corteza cerebral incluyendo regiones del pensamiento y el lenguaje. Donde la región del LTM es importante para la formación, organización, consolidación y recuperación de la memoria, estas áreas son críticas para el almacén a largo plazo y el conocimiento alrededor de hechos y eventos, el cual es usado para situaciones de nuestra vida diaria.

TIPOS DE MEMORIA IMPLICITA, EXPLICITA Y LA DE TRABAJO

El aprendizaje lo han descrito la mayoría de los neurofisiologos como el proceso por el cual adquirimos nuevos conocimientos acerca de los eventos de mundo, y la memoria se refiere a los procesos mediante los cuales retenemos y evocamos dichos conocimientos (Squire LR, 1987). Llamamos aprendizaje al hecho de que la experiencia produce cambios en el sistema nervioso (SN) que pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento de los organismos. La memoria,

un fenómeno generalmente inferido a partir de esos cambios, da a nuestras vidas un sentido de continuidad (Morgado I, 2005).

Memoria Implícita.- También llamada procedimental aplicable a la información inconsciente; se refiere a la información que nos permite ejercer hábitos cognitivos y motores. Es la memoria que nos permite hacer cosas mecánicas, en gran medida automática, se adquiere gradualmente y se puede perfeccionar con la práctica. Como por ejemplo las habilidades que se adquieren en la práctica de un deporte, aprender a manejar y al mismo tiempo hablar por teléfono. Su principal lugar de almacenamiento radica en estructuras subcorticales, como el neocórtex (caudado y putamen) (Morgado I, 2005)

Memoria explícita.- También conocida como memoria declarativa (semántica) Es aquella en donde el individuo es consciente y se basa en la utilización de hechos (memoria semántica) y eventos (memoria episódica), y se requiere el lóbulo temporal medial. La capacidad de la recolección consciente alrededor de hechos y eventos (Milner et al 1998) resulta del aprendizaje relacional, que consiste en analizar, comparar y contrastar diferentes tipos de información (Morgado I, 2005). Este tipo de memoria puede adquirirse en uno o en pocos ensayos, su adquisición se relaciona con el sistema hipocámpal y otras estructuras del lóbulo temporal medial del cerebro, pero su almacenamiento definitivo parece radicar en diferentes áreas de la corteza cerebral. La Memoria Explícita resulta del aprendizaje relacional, una forma de aprendizaje complejo y filogenéticamente nueva, que consiste en analizar, comparar y contrastar diferentes tipos de información. Un buen ejemplo es el aprendizaje que nos permite orientarnos en el espacio circundante (Morgado I, 2005)

La clasificación que se ha manejado en memoria de dos tipos; memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. La memoria a corto plazo es definida como la capacidad para almacenar información en forma temporal (en orden de segundos) antes de su consolidación en memoria a largo plazo. En contraste, la memoria a

largo plazo se define como la capacidad para aprender y para evocarla algún tiempo después (D'Esposito, 2008).

Memoria de Trabajo.-

Consiste en la representación consciente y manipulación temporal de la información necesaria para realizar operaciones cognitivas complejas, como el aprendizaje, la comprensión del lenguaje o el razonamiento. Su relevancia se acrecienta por su contribución a la memoria a largo plazo y por su relación con la inteligencia fluida, es decir, con la capacidad de razonamiento general y de resolución de problemas. La Memoria de Trabajo se ha estudiado preferentemente en tareas de respuesta demorada, donde el sujeto tiene que memorizar temporalmente la información que le permitirá responder más tarde adecuadamente (Morgado I, 2005). Se postula que la corteza prefrontal podría ser sede de este tipo de memoria de trabajo.

3.6 CIRCUITO TRISINAPTICO

El Hipocampo esta estructurado por un circuito conocido como circuito trisinaptico que esta conformado por el área CA (CA1, CA2, CA3 Y CA4) y el giro dentado.

Las áreas de CA principalmente contienen neuronas piramidales y la del giro dentado contiene neuronas granulares. El hipocampo es típicamente descrito en el contexto de circuito trisinaptico, un camino que lleva información por dos caminos: uno de ellos directo que va de la capa 3 de la corteza entorrinal hacia CA1 vía perforante, y una entrada indirecta que va de la capa 2 de la corteza entorrinal hacia el giro dentado, y de giro dentado hacia el área CA3, y de CA3 vía colaterales de schaffer hacia el área CA1(Kumaran & Maguire, 2007).

Durante la década de los setenta John O' Keefe demostró la existencia de células de lugar dentro del hipocampo empleando registros unicelulares en ratas (O'Keefe J, y Speakman A, 1987). La activación de dichas células no dependía de la orientación del animal, ni de la actividad que estuviese desarrollando en ese

momento, ni tampoco de la trayectoria, sino del lugar en el que se encontraba. La capacidad de codificar un lugar se establecía en pocos minutos y podía durar varias semanas. Además, aunque la activación neuronal era dependiente de los estímulos ambientales, si se eliminaban éstos, la actividad unicelular todavía se mantenía siempre y cuando el animal tuviese constancia del lugar del espacio en el que se encontraba. Anatómicamente, estas neuronas son células piramidales de CA1 Y CA3 (Balderas I., Ramirez –Anaya V., y Bermúdez-Rattoni F., 2004).

3.7 APRENDIZAJE ESPACIAL E HIPOCAMPO

El aprendizaje y la memoria son capacidades indispensables para la supervivencia de los individuos y sus mecanismos neurales que regulan estas capacidades, se basan en el recuerdo de eventos que fueron relevantes en algún momento de su vida como parte de mantener la integridad de los organismos que conlleva a preservar las especies. El éxito de estos mecanismos se enfoca en codificar información y recordar esta información, ya que la memoria demanda continuas comparaciones del medio ambiente y las representaciones internas del medio ambiente para determinar un modo apropiado de una red de operación (por ejemplo la codificación de información contra el recuerdo de información). Históricamente el hipocampo se ha visto que actúa como un comparador, en un principio fue involucrado en procesos de novedad conceptual (Knight, 1996; Strange and Dolan, 2000). El hipocampo también funciona como un integrador de información compleja que integra tanto espacio como tiempo, dentro de un contexto que involucra la experiencia. Se ha sugerido que el hipocampo actúa como un sustrato neural clave en los procesos de emparejamiento-error entre representaciones internas e información sensorial del medio ambiente. (Chun, 2000; Gothard, Skaggs, y McNaughton, 1996; Hampson, Simeral, y Deadwyler, 1999; Honey, Watt y Good, 1998) de Michel R. Hunsaker and Raymond P. Kesner (2005). Todos los individuos necesitan de estos mecanismos para lograr persistir, y

es necesario disponer de un buen sistema de orientación espacial para organizar las conductas en el entorno en el que habitan. Numerosas conductas como las alimenticias y reproductivas dependen de este conocimiento del entorno. Por ejemplo en condiciones naturales los roedores encuentran habitualmente el alimento y el agua en determinados lugares del espacio y, por ello, han de emplear algún tipo de estrategia de navegación que les permita localizar y recordar el lugar donde se encuentra la comida. (Santin L.J., y cols 2000). Una ventaja adicional es la manipulación que se sigue en los protocolos de investigación que se basan en el estudio de los procesos conductuales y con estas estrategias funcionales para la utilización de animales de experimentación, para semejar lo que pasa en los humanos con lesiones en estructuras neuronales del lóbulo temporal medial, como el hipocampo se ha visto tienen importantes deficiencias cognitivas, que les impiden realizar tareas espaciales como la ubicación de un lugar.

Diversas evidencias han indicado que el hipocampo es necesario para la adquisición y recuperación de la información espacial así como para su consolidación y almacenamiento. Desde 1975 fue demostrado que la lesión del hipocampo producía un profundo déficit en la orientación espacial en ratas. (O'Keefe y cols., 1975). Esto fue confirmado posteriormente mediante estudios con lesiones dañando al hipocampo o estructuras asociadas, como fimbria- fornix, septum, corteza entorrinal y complejo subicular, lo que provoca graves y permanentes déficits en numerosas habilidades espaciales como la navegación en la piscina circular de Morris y la ejecución en el laberinto radial. Las lesiones hipocámpales también provocan déficit en la exploración normal de las ratas y estas no presentan patrones normales de habituación, sin que se trate de un deterioro secundario a la afectación primaria de las habilidades de discriminación sensorial simple (Santin LJ y cols., 2000).

Actualmente numerosos estudios han sugerido dos funciones generales del hipocampo en la memoria animal (Santin L J y cols., 2000):

- 1) La función del hipocampo en la memoria animal se restringe a la formación y utilización de representaciones espaciales.
- 2) La función del hipocampo en la memoria animal es más general, centrada en la formación y uso de representaciones relacionales.

3.8 APRENDIZAJE, HIPOCAMPO Y ESTRÉS

La exposición a eventos estresantes, tanto en animales como en humanos, evoca la secreción de hormonas la cual se inicia con la activación del eje hipotálamo-pituitaria- adrenales (HPA). Dicha activación propicia la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por los núcleos paraventriculares del hipotálamo hacia el sistema portal hipofisiario. El CRH estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) por las células de la pituitaria anterior lo que estimula a su vez la secreción de Glucocorticoides (GC) por las suprarrenales.

Existen diversos reportes que sugieren que los GC -tanto inducidos por el estrés agudo como por la administración farmacológica-, pueden mejorar el aprendizaje de tipo espacial, además de que se ha reportado la presencia de receptores a GCs en numerosas áreas del cerebro las cuales son relevantes para la cognición, tales como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (Wolf O.T, 2003). Como ya se mencionó, el hipocampo está relacionado con el aprendizaje de tipo espacial, la amígdala participa en la modulación de las emociones y otros tipos de memoria y la corteza prefrontal es crucial para la memoria de trabajo. Estas regiones del cerebro no son solo blanco de acción por parte de los GCs sino que también están siendo regulados por el eje HPA (Wolf O.T, 2003).

3.9 PROLACTINA

ESTRUCTURA

La estructura química de la prolactina (PRL) Es una cadena de polipéptidos de 23 kDa, la que consiste en una cadena polipeptídica de 197-199 aminoácidos (aa) según la especie (Fig. 1a). En su forma nativa contiene 6 residuos de cisterna que se unen entre si para formar puentes disulfuro intramoleculares entre los residuos 4-11, 58-174, y 191-199. (Fig. 1b; los cuales dan lugar a dos asas pequeñas: una amino y otra carboxilo Terminal, y un asa mayor intermedia. (Parlow y cols. 1976, Cooke y cols. 1980).

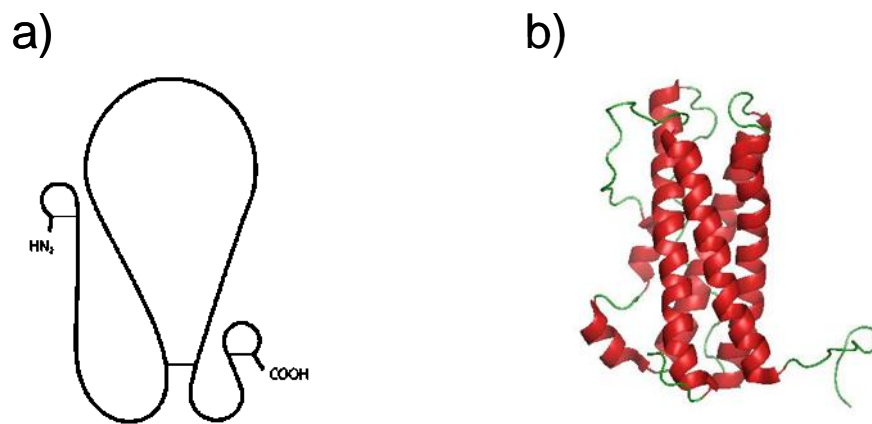


Figura 1: Estructura de la PRL. a) esquema que muestra la cadena polipeptídica con los puentes disulfuro. b) estructura tridimensional de la PRL humana.

3.10 FUENTES DE PRODUCCION DE PROLACTINA

Hipófisis Anterior

Las células de la hipófisis anterior, denominadas lactotropos, son las principales productoras de la PRL la cual es secretada a la circulación sanguínea (Freeman y cols., 2000). Estas células comprenden del 20-50 % de la población celular de la hipófisis anterior dependiendo del sexo y el estado fisiológico del animal.

La PRL es sintetizada también por sitios extrahipofisarios los cuales comprenden órganos reproductores, sistema inmune, el cerebro, y otros órganos.

De acuerdo a nuestro objetivo nos enfocaremos a la síntesis de PRL y la presencia de sus receptores en el cerebro. Demostrado con varios trabajos con distintas técnica, ya sea por administración o por inhibición de PRL que se activan áreas en el cerebro como respuesta a la presencia de esta hormona.

Cerebro.

Fuxe y cols (1977) fueron los primeros en observar inmunoreactividad tipo prolactina (PRL) en axones del hipotálamo. Posteriormente se ha encontrado inmunoreactividad a PRL en la corteza cerebral, el Hipocampo, la amígdala, el septum, el caudado putamen, el tallo cerebral, el cerebelo, el cordón espinal, los plexos coroides y los órganos circunventriculares (Crumeyroлле- Arias y cols 1993)

La PRL en el cerebro participa en la regulación de neurotransmisores y neuropéptidos. Uno de los mejores establecidos son las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares en los núcleos arqueados. La regulación de la concentración

de PRL en la circulación tiene lugar mediante la síntesis de dopamina y su liberación dentro de la circulación portal hipofisiaria, ya que este neurotransmisor ejerce una inhibición tónica sobre la síntesis y secreción de la PRL.(Rillemala y cols.,1987)

Hipotálamo

Se ha descrito la presencia del ARN mensajero de la PRL en el hipotálamo (Emanuele y cols., 1992) incluyendo los núcleos paraventriculares (Clapp y cols., 1994) mediante la amplificación de su ADN complementario por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además se ha reportado la presencia de neuronas con inmunorreactividad tipo PRL en núcleos hipotalámicos tales como núcleo arcuato, supraóptico, dorsomedial, ventromedial. También se observó la existencia de numerosas fibras inmunorreactivas a PRL en áreas hipotalámicas y límbicas (Toubeau y cols., 1979; Hansen y cols., 1982; Harlan y cols., 1989; Paut-Pagano y cols., 1993).

3.11 RECEPTORES PROLACTINA

Las acciones fisiológicas de la PRL son mediadas por su unión a receptores específicos (PRL-R) localizados en la membrana plasmática de sus células blanco. El PRL-R pertenece a la superfamilia de tipo 1 de los receptores a citocinas, y está constituida por una proteína asociada a la membrana celular. Así, el PRL-R contiene una porción extracelular, un dominio transmembranal y tiene

también un dominio intracelular. Se han descrito varias isoformas de los PRL-R. Las tres principales son la forma corta 291 aminoácidos (aa), la intermedia 393 aminoácidos (aa) y la forma larga 591 aminoácidos (aa); (Bole-Feysot y cols., 1998). Las isoformas varían en el largo y composición de sus dominios citoplasmáticos, pero sus dominios extracelulares son idénticos (Bole-Feysot y cols., 1998).

Los PRL-R se han localizado en la mayoría de los tejidos de la rata, como hipófisis, ovarios, glándula mamaria, timo, pulmones, corazón, bazo, hígado, útero, piel y músculo esquelético (Freeman y cols., 2000). En el cerebro se ha determinado la presencia de los PRL-R mediante su unión a ligandos radiactivos, inmunocitoquímica o hibridación *in situ* tanto en áreas hipotalámicas, tales como el núcleo paraventricular, el supraóptico, el arcuato, el ventromedial, el área preóptica media, y en estructuras límbicas como la amígdala, hipocampo. (Crumevolle- Arias y cols., 1993; Bakowska y Morrell 1997; Chiu y Wise 1994; Torner y cols., 2002). Por otra parte, se ha descrito un sistema de transporte activo para la PRL mediado por receptores específicos localizados en los plexos coroides (Walsh y cols., 1987). De esta manera, la PRL en la circulación es capaz de ingresar al cerebro, alcanzando las áreas cerebrales que expresan a sus receptores.

La distribución de ARN mensajero para la forma larga del receptor a PRL ha sido caracterizada en el cerebro de rata (Bakowska y Morrell, 1997). Se ha encontrado

abundancia del ARN mensajero en los plexos coroides, el núcleo del lecho de la estra terminal, la amígdala, el gris central del cerebro medio, el tálamo, el hipotálamo, la corteza cerebral, y el bulbo olfatorio (Bakowska y Morrell, 1997). También se han descrito sitios de unión a la PRL en el área postrema que es una de las áreas del cerebro que carecen de barrera hemato-encefálica (Mangurian y cols., 1999). Por último existen reportes sobre la presencia del receptor a PRL en el hipocampo (Rocky y cols., 1994; Mustafa y cols., 1994), y recientemente se observó que esta estructura cerebral se activa en respuesta a la administración de PRL al ventrículo cerebral (Donner y cols., 2007).

3.12 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA PRL

La PRL afecta un gran número de procesos fisiológicos. A continuación describimos algunos de sus efectos más representativos.

Efectos Periféricos

a) Dentro de sus acciones sobre la reproducción, destaca la estimulación del crecimiento, diferenciación y actividad secretora de la glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia. La PRL es parte esencial del complejo hormonal que determina el inicio y mantenimiento de la lactancia. Esta actúa en conjunto con los estrógenos, la progesterona y la hormona de crecimiento (GH) para estimular el crecimiento y diferenciación del tejido lóbulo alveolar mamario (Clapp y cols., 1987).

b) La PRL promueve la síntesis y secreción de los componentes específicos (caseína, lactosa, lípidos) y no específicos (agua, iones) de la leche, en el tejido epitelial mamario (Shiu y cols., 1980). Asimismo, la PRL mantiene las diferencias entre la composición iónica de la leche y las del plasma mediante la regulación del transporte activo de iones en la membrana basal del epitelio mamario (Shiu y cols., 1980).

c) La PRL estimula la función gonadal tanto en machos como en hembras. En el macho, la PRL incrementa y mantiene el número de receptores de la hormona luteinizante (LH) en las células de Leydig, y en consecuencia sostiene la secreción de testosterona por el testículo (Aragona y cols, 1977). En el ovario la PRL contribuye al mantenimiento del cuerpo lúteo estimulando su proliferación, y regulando la cantidad de receptores a la LH y consecuentemente la secreción de progesterona (Richards y cols, 1976 y Albarracin y cols, 1991).

d) Las acciones osmoreguladoras de la PRL resultan esenciales para la vida de ciertos vertebrados acuáticos (Nicoll, 1974). Por ejemplo mediante la migración de los peces del agua salada hacia el agua dulce, la PRL contribuye a mantener el balance hídrico y electrolítico estimulando la retención de Na^+ en los fluidos corporales y evitando constantemente la disolución del medio interno (Nicoll, 1980).

e) La PRL juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune celular y humoral, tanto en condiciones normales como en estados patológicos, tales como las enfermedades auto inmunes (Freeman y cols., 2000). La PRL

estimula la mitogénesis de los linfocitos T normales, así como la línea celular de linfoma Nb2. Además tanto los timocitos y los linfocitos T, y en menor proporción los B, expresan el gen de la PRL (Montgomery y cols; 1990). En linfocitos T la PRL induce la expresión del factor activador de interferon-1 (IRF-1), la secreción de interleucina 2 (IL-2) y la expresión de sus receptores (Clevenger y cols; 1991).

3.13 PROLACTINA Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La prolactina (PRL) participa en la regulación de diversas conductas, algunas de las cuales se encuentran dentro de la esfera reproductiva. Estos efectos son mediados por PRL-R presentes en diversas estructuras cerebrales, principalmente en los núcleos hipotalámicos descritos anteriormente.

Conducta maternal.

La PRL estimula la conducta maternal en diversas especies de vertebrados (Bridges,1985). La administración de PRL a ratas hembra vírgenes en el área preóptica media reduce significativamente la latencia a desarrollar la conducta maternal con crías ajenas (Bridges y cols., 1990). Este efecto fue confirmado posteriormente mediante estudios realizados con ratones transgénicos que no expresan los PRL-R, y en los cuales se observó una conducta maternal alterada (Lucas y cols., 1998). Asimismo, el empleo de sondas antisentido para impedir la expresión de PRL-R en el cerebro de ratas lactando también resultó en una conducta maternal alterada, confirmando los resultados anteriores (Torner y cols., 2002).

Conducta de acicalamiento.

Otros efectos de la PRL son la participación en la regulación de la conducta de acicalamiento. Inicialmente se reportó que en ratas Hiperprolactinémicas presentaban un incremento marcado en la conducta de acicalamiento, y que esta conducta era inhibida al inyectarse suero anti-PRL en los ventrículos cerebrales (Drago, y cols., 1986). Mas adelante, se observó que esta conducta es estimulada después de la inyección subcutánea de PRL de dosis entre 5 y 10 microgramos / Kg, mientras que dosis mas altas no producen este efecto. (Drago y Lissandrello, 2000).

Ingesta de alimento.

Evidencias recientes muestran que la PRL modula el balance de energía mediante diversos mecanismos, incluyendo el control de la ingesta de alimentos. Las infusiones crónicas de PRL en los ventrículos laterales aumentan la ingestión de alimento en ratas hembra vírgenes, sin alterar su ciclo estral. (Noel y Woodside, 1993)

Ciclo sueño-vigilia.

Basados en la inyección intracerebroventricular de PRL y la administración de suero anti PRL, Rocky y cols., (1994) sugirieron que la PRL hipotalámica promueve el ciclo de sueño de movimientos oculares rápidos o MOR durante la fase de luz y lo suprime durante la fase oscura.

Conducta sexual

Otro efecto de esta hormona es su participación en la conducta sexual (Drago, 1984). Inicialmente se encontró que la infusión de PRL en el gris central del cerebro medio inducía la conducta de lordosis y la receptividad sexual en ratas ovariectomizadas y con reemplazo de estrógenos. Estos efectos de PRL no eran mimetizados por la hormona de crecimiento ni otros neuropéptidos. En cambio, la infusión de suero anti PRL disminuyó la conducta de lordosis, lo que indicaba la especificidad de acción de PRL (Ben Jonathan y cols., 1996). Recientemente se demostró que la PRL posee acciones tanto facilitadoras como inhibitoras de la conducta sexual, dependiendo de la dosis administrada (Drago y Lissandrello, 2000).

Conducta de ansiedad

La administración intraventricular de una sonda antisentido para silenciar la expresión del receptor cerebral a PRL (PRL-R) provocó un incremento significativo de la conducta relativa a la ansiedad de ratas lactantes y al mismo tiempo alteró su conducta materna, pudiendo concluir que la PRL actúa a nivel cerebral modulando la respuesta conductual y neuroendocrina al estrés durante la lactancia (Torner y cols., 2002). Asimismo se ha comprobado que la PRL reduce la conducta de ansiedad en machos y hembras vírgenes, validándose el efecto ansiolítico en referencia al diazepam (Torner y cols., 2001).

Regulación neuroendocrina de neurotransmisores y neuropéptidos.

a) La PRL participa en la regulación de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares de los núcleos arqueados. La Hiperprolactinemia estimula la síntesis de dopamina y su liberación dentro de la circulación portal hipofisiaria, mientras que la hipoprolactinemia las disminuye (Ben Jonathan y cols., 1996). La interacción recíproca entre la PRL y la dopamina está mediada por un mecanismo de retroalimentación negativo. Esto permite que la PRL derivada de la hipófisis, llegue a los núcleos arqueados mediante el flujo retrogrado de sangre, para regular su propia liberación alterando la síntesis de dopamina, su principal inhibidor.

b) En años recientes, se reportó que la PRL regula la actividad del eje neuroendocrino denominado hipotálamo – hipófisis – suprarrenales (HPA), el cual reacciona en respuesta a la exposición de los organismos a situaciones de estrés. Así, se observó que la disminución de la expresión de los PRL-R cerebrales, mediante el uso de sondas antisentido, estimulaba una secreción mucho mayor de la hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH) en respuesta al estrés en ratas lactantes, y en ratas vírgenes. Esto significa que la PRL ejerce un rol inhibitorio sobre el eje HPA en respuesta al estrés, evento que se ha puesto en evidencia al silenciar los receptores cerebrales de PRL (Torner y cols., 2002).

Hiperprolactinemia

Un buen modelo experimental para evaluar el efecto de la prolactina (PRL) sobre el sistema nervioso central (SNC) y la conducta es la Hiperprolactinemia causada mediante un trasplante de una o varias hipófisis anteriores a la capsula renal.

Este modelo ha sido ampliamente validado desde hace varios años (Adler RA 1986 , Adler RA y cols 1983). El trasplante de hipófisis a la capsula de la glándula renal permite la síntesis y secreción de la PRL de manera continua a la circulación, ya que la hipófisis transplantada esta fuera del control dopaminérgico. La dopamina proveniente de la hipotálamo ejerce un control negativo sobre la síntesis y liberación de PRL hipofisiaria (Rillema JA, 1987), por lo tanto retirar la hipófisis del control del hipotálamo causa un aumento sostenido en la liberación de PRL. La capsula renal es un órgano blanco muy utilizado para recibir transplantes ya que permite la revascularización y sobrevivencia de los mismos dentro de una membrana que los limita. (Adler RA 1986).

IV. HIPOTESIS

El estrés prolongado deteriorara el aprendizaje espacial, y la prolactina mejorara el aprendizaje de los animales bajo estas condiciones.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

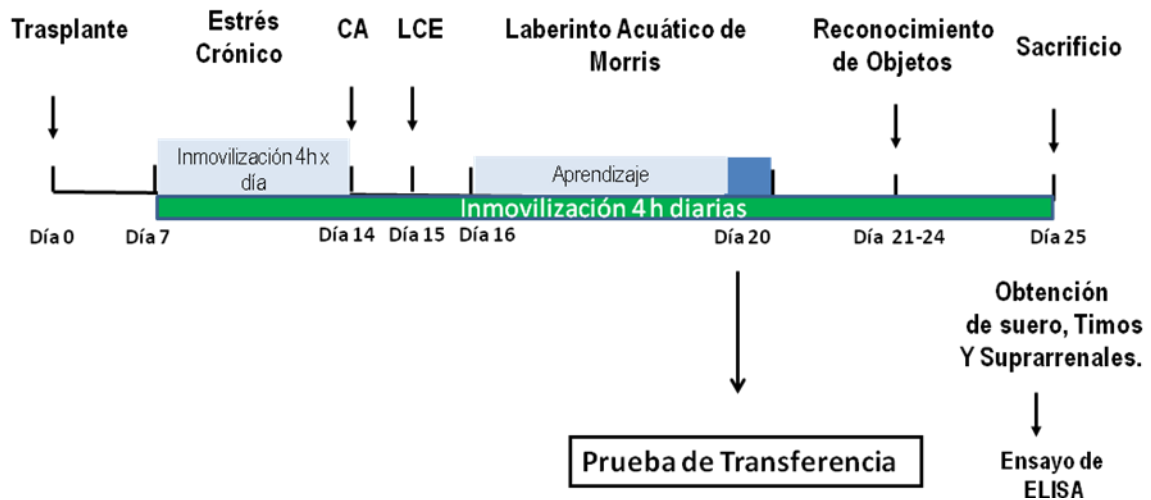
1) Desarrollar un modelo de estrés crónico en el laboratorio, mediante la inmovilización diaria de 4 horas durante 3 semanas.

- 2) Evaluar el papel de la PRL sobre la modulación de CA3 del hipocampo en tareas de aprendizaje específicas, en ratas macho sujetas a estrés crónico.
- 3) Evaluar el papel de la PRL sobre la modulación del GD del hipocampo en tareas de aprendizaje específicas, en ratas macho sujetas a estrés crónico.

RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO

Este proyecto resulta relevante ya que propone un nuevo efecto de la PRL como modulador del aprendizaje dependiente de hipocampo, y prevé la protección del hipocampo contra el daño producido por estrés.

DISEÑO EXPERIMENTAL



VI. Materiales Y Métodos

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán CIBIMI-IMSS. Instituto ubicado dentro de las instalaciones de la

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr. Ignacio Chávez, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Experimentación con animales

El estudio se realizó en ratas macho Sprague-Dawley de un peso de 260- 450 g de 3 a 4 meses de edad al inicio de los procedimientos experimentales, las cuales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones ambientales controladas de luz- oscuridad (12h/12h) y temperatura (22 ± 2 °C), con suministro de alimento y agua *ad libitum*. Se utilizó la siguiente estrategia experimental para modificar la concentración endógena de PRL en los animales como sigue:

Las ratas fueron sometidas a una cirugía para generar la hiperprolactinemia que consiste en el implante de dos hipófisis anteriores de ratas donadoras, a la capsula renal de otra rata receptora. Se manejo a otro grupo de animales los cuales fueron falsamente operados y que conformaron el grupo SHAM; ambos grupos se mantuvieron aislados en cajas durante 7 días para su recuperación. Terminando este periodo los animales fueron sometidos al protocolo de estrés crónico, que consistió en estrés por inmovilización por 4 horas diarias durante 3 semanas, y los animales control tuvieron manipulación de 5-10 min.

La primera semana de estrés los animales solo fueron sometidos al protocolo de estrés, y las siguientes 2 semanas fue simultanea la manipulación, primero fueron conducidos a las pruebas conductuales (que mas adelante se describen a detalle) esto fue por la mañana que siempre se mantuvo un horario de 9-12 e inmediatamente después fueron sometidas a estrés por inmovilización.

Los animales fueron reasignados en 4 grupos.

Grupos de animales:

Estrés crónico

- Ratas macho hiperprolactinémicas (n=6)
- Ratas macho sham (n=9)

Control

- Ratas macho hiperprolactinémicas (n=8)
- Ratas macho sham (n=7)

El día del sacrificio, se extrajeron los timos y las suprarrenales de las ratas de los distintos grupos con el objeto de confirmar los efectos crónicos del estrés en estos órganos.

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la guía de los Institutos de Salud de Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el cuidado y usos de animales de laboratorio (publicación NIH No 80-23), revisado en 1996. El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de Ética e Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, México. Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

Implante de hipófisis a capsula renal

El implante de hipófisis a la capsula de la glándula renal permite la síntesis y secreción de PRL de manera continúa a la circulación del animal receptor ya que la hipófisis implantada esta fuera del control dopaminérgico, el cual es inhibitorio.

Se utilizaron ratas macho a los cuales se les implantaron dos hipófisis anteriores en la capsula renal, usando como donadoras otras ratas macho de edad entre 3 y 4 meses.

Como anestésico para realizar esta cirugía se utilizó pentobarbital sódico en dosis de 4.5 mg por kg de peso mas atropina 10 U aplicada 15 minutos antes de la aplicación de este. Una vez anestesiado el animal, se rasura el lomo derecho y se realiza una incisión de piel y músculo en la parte dorsal del animal justo por debajo de las costillas, dando lugar a un pequeño orificio por el cual se expone el riñón; se abre un orificio en la capsula renal y se implantan dos hipófisis anteriores de donadores de características antes descritas. Para el caso del grupo Sham o falsamente trasplantado, se abre el orificio en piel y músculo para exponer el riñón; se rasga la capsula renal y sin implantar glándula alguna se devuelve el riñón a su lugar y se sutura la piel.

Protocolo de Estrés por Inmovilización.

Después de la cirugía para lograr la hiperprolactinemia, los animales tuvieron 7 días de recuperación posteriormente fueron sometidos a estrés por inmovilización durante 1 semana, que consistió en colocarlos en tubos de plástico (botellas de plástico de 250 ml) de 21 cm de largo x 6.5 de ancho, con orificios alrededor del tubo y un orificio frontal hacia su cara para que el animal tuviera libre entrada de aire, de tal manera que los animales no tuviera movimiento, y así permanecer durante 4 hr. Posteriormente para las siguientes 2 semanas fueron sometidos a pruebas de conducta que se realizaron por las mañanas y al término de las

mismas continuo la restricción de movimiento por 4 hr. De tal manera que el protocolo consistió en estrés por inmovilización por 4 hr. Diarias durante 3 semanas.

Determinación de PRL por ELISA.

Brevemente, se cubre una placa de ELISA con 10 ng/ml de PRL de rata (B-6, NIDDK, NIH, USA) en solución. Amortiguadora de carbonatos 0.1 M, y se incuba a 4°C durante toda la noche. Se preparan a la vez las “competencias” (Esta solución se denomina así debido a la competencia que ejerce la PRL del suero contra la PRL de la caja para unirse al anticuerpo), que también se incubarán toda la noche a 4°C. Estas consisten en tomar una alícuota de concentraciones conocidas de PRL para constituir una curva estándar, también alícuota de las muestras de suero de los diferentes grupos de animales. Estas se mezclan en partes iguales con una solución conteniendo el anticuerpo anti PRL de rata a una dilución final (1/30,000); NIDDK, NIH, USA) en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, con NaCl 0.9% y Tween-20 al 0.5 % (PBS-Tween) que contiene además suero de caballo al 1%. Al día siguiente, se lavan las placas con PBS-Tween y se incuban con la solución PBS-Tween-suero durante 1h a Temperatura ambiente. Después de lavar las placas, se añaden las competencias a los pozos (50 ul/pozo) y se incuban por 2h a T ambiente. Se lavan las placas y se añade a cada pozo 50 ul de un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (1/3000 dil final) y se incuban por 1 1/2h a T ambiente. Se lavan las placas y se añade solución reveladora que consiste de el sustrato ortofenilendiamina (OPD) en amortiguador de Citratos

0.5M, pH 5.2, activado con 10 ul de H₂O₂. Se incubó por 10 min en la oscuridad y se detiene la reacción con Acido. Clorhídrico 2N. La placa se lee en un lector de ELISA a 495 nm. El coeficiente de variación intraensayo fue de 4.00%.

Pruebas conductuales.

Evaluación del aprendizaje y memoria espaciales en el laberinto acuático del Morris.

El aprendizaje espacial fue evaluado mediante el laberinto acuático de Morris. Se utilizó una tina circular de color negro (140 cm. de diámetro, y 50 cm. de altura) que se llenó con agua teñida de color azul oscuro hasta una profundidad de 25 cm, a una temperatura de 30°C. La tina se colocó en un espacio donde pudieran identificarse una variedad de señales externas alrededor del laberinto (investigador, puerta, ventana, etc.,) útiles para la orientación espacial del animal. El laberinto se dividió conceptualmente en cuatro cuadrantes del mismo tamaño referidos a los puntos cardinales. Una plataforma de escape (13 x 13 cm) sumergida en 2 cm por debajo de la superficie del agua, se colocó en una posición fija en el centro de uno de los cuatro cuadrantes, a 28 cm de distancia de la pared del laberinto. La plataforma se mantuvo en el mismo cuadrante a lo largo del experimento. En el laberinto, se permitió a las ratas la búsqueda de la plataforma de escape usando solamente las referencias espaciales del ambiente, las cuales se conservaron constantes a través de los días de prueba. Cada rata ejecutó tres ensayos diarios con un intervalo de 20 min, durante 4 días. Para cada ensayo, la rata se introdujo al agua, de cara a la pared de la tina, en uno de los cuatro

cuadrantes alrededor del perímetro de la tina, el cual varió cada día de manera semi-aleatoria, pero fue el mismo en cada día de ensayo para todas las ratas. El ensayo finalizó cuando la rata encontró la plataforma antes de 60 segundos (latencia de escape); de lo contrario la rata era conducida hasta la plataforma por el experimentador donde era colocada durante 15 seg. El desempeño de la rata en cada ensayo se grabó mediante una video cámara (Sony Handy Cam CCD-TR490, Tokio) ubicada sobre el laberinto. Los valores de la distancia de nado (cm/seg), así como el predominio del nado en las zonas delimitadas por los cuatro cuadrantes fueron obtenidos para cada rata durante los tres ensayos diarios, y posteriormente fueron promediados y analizados.

Prueba de transferencia

Al término de los cuatro días de ensayos, cada rata se sometió a una prueba de transferencia (30 seg) para evaluar la memoria espacial, en la que se permitió a cada rata la búsqueda de la plataforma que había sido previamente retirada del laberinto. El número de cruces por el sitio o cuadrante correspondiente a la ubicación original de la plataforma fue registrado y analizado.

Prueba de Reconocimiento de Objetos

Esta prueba es utilizada para evaluar las propiedades amnésicas de diversas sustancias. Consiste en colocar a los animales en una tina circular (100 cm. De diámetro, 40 cm. De altura) conteniendo aserrín limpio. Alrededor de la tina se cubrió con una cortina circular de tela oscura, esto para no permitirles a los

animales observar objetos a su alrededor fuera de la arena y así evitar distraerse del objetivo.

Los animales se colocaron durante dos días por 15 min en la tina para lograr su habituación. Al día 3 se colocaron en la tina dos objetos uno frente al otro en posición norte y sur en la pantalla donde eran observados por el investigador y se colocaron los animales con cara frente a la pared de la tina y posteriormente se midió el tiempo en el que se acercaban a explorar los objetos. El tiempo disponible del experimento fue de 10 minutos divididos en dos momentos de 0-5min y de 5-10min.

Al día 4 se colocaron dos objetos uno de ellos conocido por el animal, es decir el mismo objeto del día 3 y otro distinto y también se midió el tiempo de exploración que realizó el animal con cada objeto.

En esta prueba se realizaron ensayos piloto los cuales consistían en colocar a las ratas en una arena abierta con diferentes objetos. Estos objetos tienen que ser de tamaño no mayor al cuerpo de los animales y de características similares, de tal manera que un objeto no fuera considerado más atractivo que otro por características como su color o textura. Entre cada ensayo los objetos fueron limpiados con etanol y agua destilada después de ser colocados con la rata, para evitar que las ratas siguientes exploraran más tiempo un objeto por su olor y por tal motivo no detectara el objeto novedoso y así desviar la atención de nuestro objetivo.

Laberinto elevado en cruz (EPM)

Una de las pruebas más utilizadas para evaluar el efecto de diversos tratamientos sobre las emociones de los animales de experimentación es la prueba del laberinto elevado en forma de cruz (EPM, de las siglas elevated plus maze, en inglés), el cual ha sido validado para la detección de respuestas emocionales a sustancias ansiogénicas y ansiolíticas (Pellow y cols, 1985). Esta prueba se basa en la creación de un conflicto entre la naturaleza exploratoria de la rata y su miedo innato a las áreas abiertas y expuestas. Se evalúan los siguientes parámetros durante cinco minutos: (i) número de entradas a los brazos abiertos y porcentaje respecto al total de entradas a todos los brazos, (ii) tiempo en los brazos abiertos y porcentaje respecto al tiempo total, (iii) número total de entradas a los brazos cerrados (índice de actividad total), (iv) número de entradas completas a los brazos abiertos de la cruz. Las entradas pueden ser parciales o completas, dependiendo de si el cuerpo del animal se ubica totalmente dentro de un mismo compartimento o si este solamente explora el área con la cabeza y miembros superiores. El predominio de la conducta exploratoria de los brazos abiertos de la cruz (alto porcentaje de entradas, tiempo y entradas completas en los brazos abiertos) indica una baja ansiedad en el animal de experimentación, mientras que lo opuesto se interpreta como una mayor ansiedad. El número de entradas a los brazos cerrados de la cruz se toma en cuenta como un índice de la actividad locomotora del animal.

Campo Abierto

Otra de las pruebas para evaluar la conducta de ansiedad de los animales es el campo abierto, ya que por su condición natural de los roedores para permanecer en los sitios oscuros y así mantenerse protegidos entonces se utiliza la estrategia de manipular las condiciones de iluminación en el campo abierto con el centro más iluminado y medir las veces que cruza el animal para evaluar su estado de ansiedad. Este laberinto es rectangular con medidas 80cm x 60cm y 30 cm de profundidad, y se divide en nueve partes en donde las 8 que son zonas externas tienen iluminación de 2-5 luxes y el centro queda más iluminado con 28 luxes. Los parámetros que se miden en esta prueba son 1) número de cruces al centro donde se evalúa exploración, 2) Tiempo en el centro, 3) Latencia al centro, y 4) número de cruces a la zona externa. Cuando predomina la conducta exploratoria número de cruces al centro, tiempo en el centro y menor latencia al centro se consideran estas variables como niveles de ansiedad bajos. Mientras que lo opuesto se denomina como estado de ansiedad elevado. El número de cruces a la zona externa indica el grado de locomoción de los animales

Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron utilizando el programa de estadística GB-Stat 6.0, de Dynamic Microsystems, Silver Springs, MD, USA.

Para medir las distancias en la prueba de laberinto de agua se utilizó una prueba Anova de medidas repetidas con una corrección post hoc de Newman-keuls utilizando como variables el grupo y el día. Para la prueba de reconocimiento de

objetos el tiempo se evaluó con una Anova y una corrección post hoc de Tukey por grupo y por objeto.

En latencias fue estadística no paramétrica anova de dos vías friedman, con el programa Systat Versión 5.0, prueba post hoc Wilcoxon

Para el laberinto en cruz elevada se utilizo un análisis de varianza completamente aleatorio con una prueba post hoc de Newman-keuls. Y prueba wilcoxon Rank sum/mann-whitney.

Para medir la prueba de Campo abierto el análisis de varianza completamente aleatorio con una prueba post hoc de Newman-keuls. Y estadística no paramétrica con corrección post hoc wilcoxon Rank sum/mann-whitney.

Para los timos y las suprarrenales se realizo un análisis de varianza con prueba post hot Newman-keuls.

VII. RESULTADOS

Se determinaron las concentraciones de PRL en suero de todos los grupos de animales con el objeto de verificar el efecto del trasplante. Los animales Hiperprolactinémicos Control (HC) tuvieron en promedio 150 ± 41.51 ng/ml de PRL en contraste con los del grupo Sham Control que tuvieron 62.68 ± 9.94 ng/ml de PRL, También determinamos las concentraciones en los grupos Hiperprolactinémicos Estresados (HE) que tuvieron 76.43 ± 23.82 ng/ml y el Grupo Sham Estresado (SE) con 47.29 ± 6.48 ng/ml (Fig. 2). En base a estos resultados

se excluyeron del estudio los animales cuyas concentraciones de PRL no correspondieron con su tratamiento.

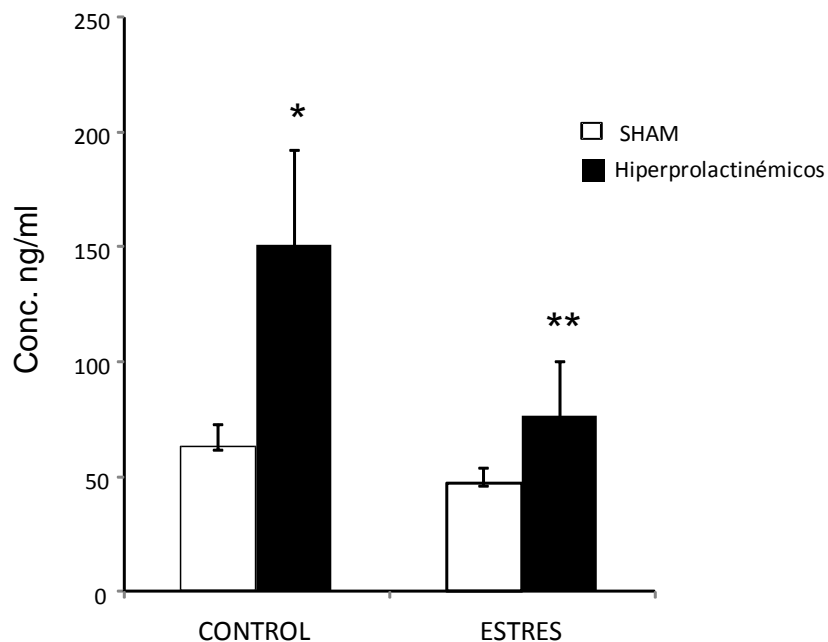


Figura 2: Concentraciones de prolactina en suero (ng/ml) en los grupos SC (n=7), HC (n=8), SE (n=9), HE (n=8). (prom. \pm s.e.m. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$)

Se pesaron los tejidos de timos y suprarrenales de todos los grupos. No se encontraron diferencias significativas en el peso de los timos [F (16,19) =0.594 $p=0.85$]. En los pesos de las suprarrenales de los grupos estresados fueron mayores significativamente, tanto sham como Hiperprolactinémicos [F (16,19) =0.016, $p=0.0013$].(Fig.3) La hiperprolactinemia ni tampoco el estrés altero el peso de los timos, mientras que en los grupos estresados se observo una hiperplasia en las suprarrenales en ambos grupos estresados. Estos resultados sugieren que los grupos que fueron sometidos a estrés realmente presentaban hiperplasia adrenal,

que es un parámetro que se presenta cuando hay estrés crónico. Aunque también se ha reportado hipoplasia en timos aquí no lo observamos.

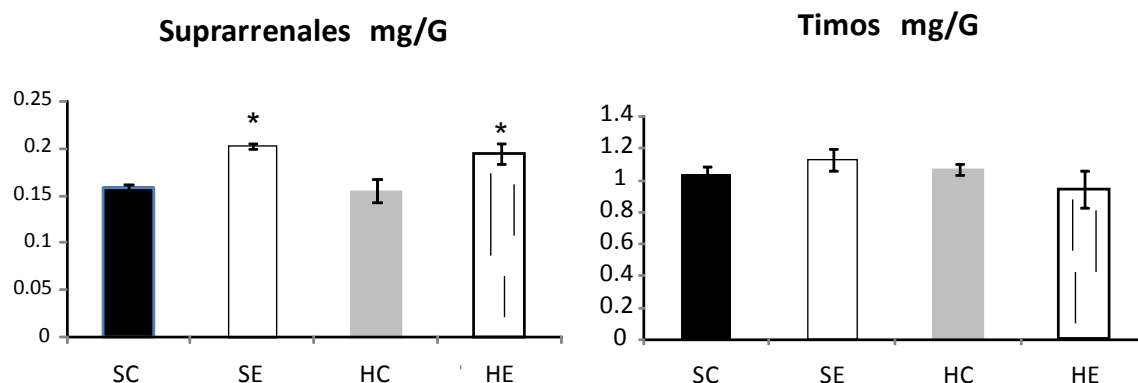


Figura 3: Pesos de Timos y suprarrenales. Miligramos de tejido por gramo de peso corporal (mg/G) (Prom. S.e.m \pm * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

A) Laberinto Acuático De Morris

La ejecución de las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de morris por los grupos de animales Sham e Hiperprolactinémicos, control así como estresados dio lugar a los siguientes resultados.

Se analizó la longitud de las trayectorias de nado realizadas por todos los grupos Sham Control (SC), Hiperprolactinémicos Control (HC), Sham Estrés (SE), Hiperprolactinémicos Estrés (HE) durante el periodo de 5 días de prueba. Dichas trayectorias mostraron una reducción progresiva de la longitud recorrida en los días de prueba sucesivos, resultando en curvas similares y sin diferencias intergrupales estadísticamente significativas. Al analizar la curva de cada grupo se

observo que los animales HC recorrieron una distancia significativamente menor [F(24,35) = 13.88, p < 0.0001] (Fig. 4) a la del día inicial desde los días 3 y 4 (p ≤ 0.0001) de prueba, mientras que los animales del grupo SC recorrieron una distancia significativamente menor solamente el día 4 [F(18,27) = 3.48, p = 0.0375]. Mientras que el grupo SE mostro una disminución en su distancia recorrida a partir del día 2 y los días sucesivos de prueba [F(27,39) = 6.40, p = 0.002], al igual que el grupo HE que mostro estadísticamente disminuidas sus distancias el día 2, 3 y 4 [F(21,31) = 5.88, p = 0.0044] (Tabla 1). Estos hallazgos sugieren que la PRL tiene un efecto facilitatorio en el aprendizaje de tipo espacial, y que nuestras condiciones de estrés no causan daño en el aprendizaje de tipo espacial, sino más bien facilitan el aprendizaje.

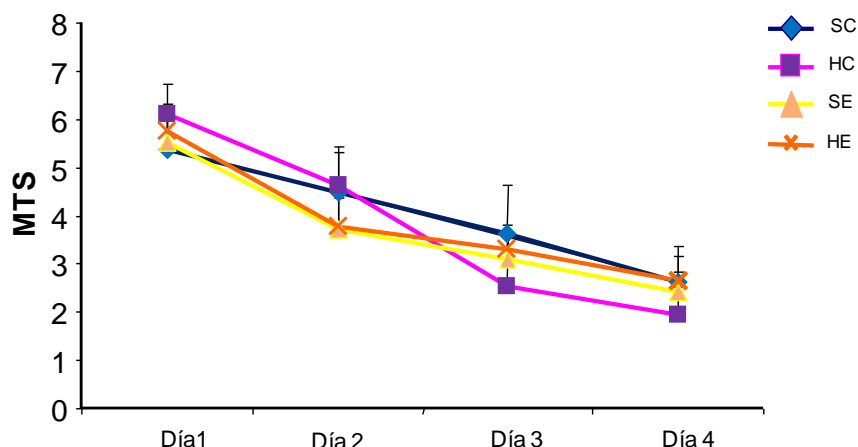


Figura 4: Distancia recorrida en metros a lo largo del entrenamiento en el laberinto acuático de morris. ◆ SC (N=7), ■ HC (N=9), ▲ SE (N=9), ✕ HE (N=8). (Prom. S.e.m ± *p < 0.05, **p < 0.01)

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
Sham Control	6.182±0.81	4.465±0.87	3.229±1.08	*2.614±0.97
Hiper-Control	6.364±0.71	5.236±0.86	**1.899±1.08	**1.949±0.53
Sham-Estrés	5.901±0.78	*3.308±0.90	*3.232±0.60	**2.288±0.43
Hiper-Estrés	5.578±0.67	**3.256±0.81	*3.067±0.49	**2.466±0.65

Tabla 1: Distancia recorrida en metros en el laberinto acuático de Morris. (Prom $S \pm S.e.m$ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

días de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris en donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas intergrupales, en cuanto al análisis intragrupal el grupo SC ($p=0.110$) no mostro diferencias en la latencia en ninguno de los cuatro días de prueba, mientras que el grupo HC ($p < 0.001$) en el día 3 y 4, SE ($p=0.001$) a partir del día 2, 3 y 4 redujeron significativamente sus latencias, y el grupo HE ($p=0.102$) no mostro diferencias significativas en sus latencias (Fig 5). Este dato nos confirma que la hiperprolactinemia facilita el aprendizaje, y que el estrés crónico no parece alterar este tipo de aprendizaje espacial.

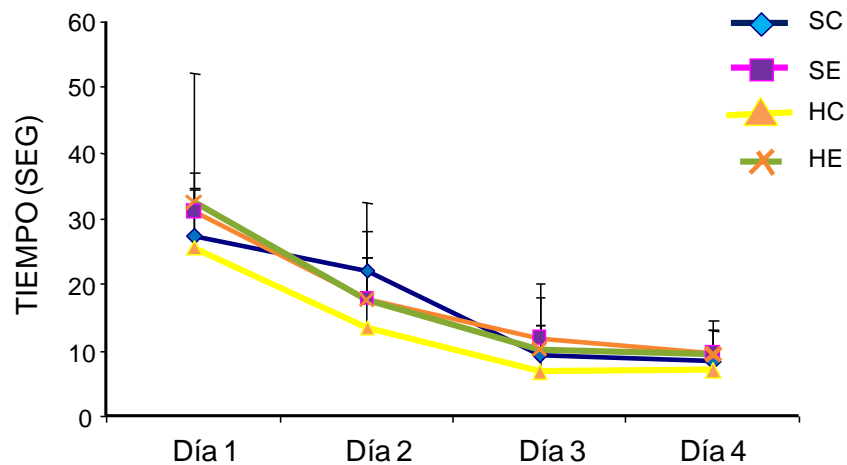


Figura 5: Latencia en el laberinto acuatico de Morris a lo largo del entrenamiento. SC(n=7), HC(n=8), SE(n=9), HE(n=6)(Prom s.e.m **p<0.01, *p<0.05)

Al término de los 4 días de nado se sometió a cada rata a la prueba de transferencia para evaluar su memoria espacial. La prueba de morris fue dividida en cuatro cuadrantes imaginarios; Norte donde se encontraba la plataforma, Sur el lado opuesto a la plataforma, Este y Oeste referidos a los lados adyacentes de la plataforma.

Se observó que los animales del grupo SC pasaron significativamente más tiempo en los cuadrantes Norte [$F(24,35) = 12.75$, $p < 0.0001$] al igual que los animales del grupo HC pasaron significativamente más tiempo en el cuadrante Norte con respecto a los otros cuadrantes [$F(27,39) = 13.84$, $p < 0.0001$]. (Fig 6). El grupo SE tuvieron significativamente más cruces en el cuadrante Norte donde estaba la plataforma [$F(27,39) = 10.31$, $p = 0.0001$] y el grupo HE, significativamente con más cruces en el cuadrante Norte [$F(24,35) = 5.37$, $p = 0.0057$]. Estos resultados

confirman que los animales estresados no se ven afectados en el aprendizaje dependiente de hipocampo y el aprendizaje por la presencia de altas concentraciones de PRL no se ve alterado.

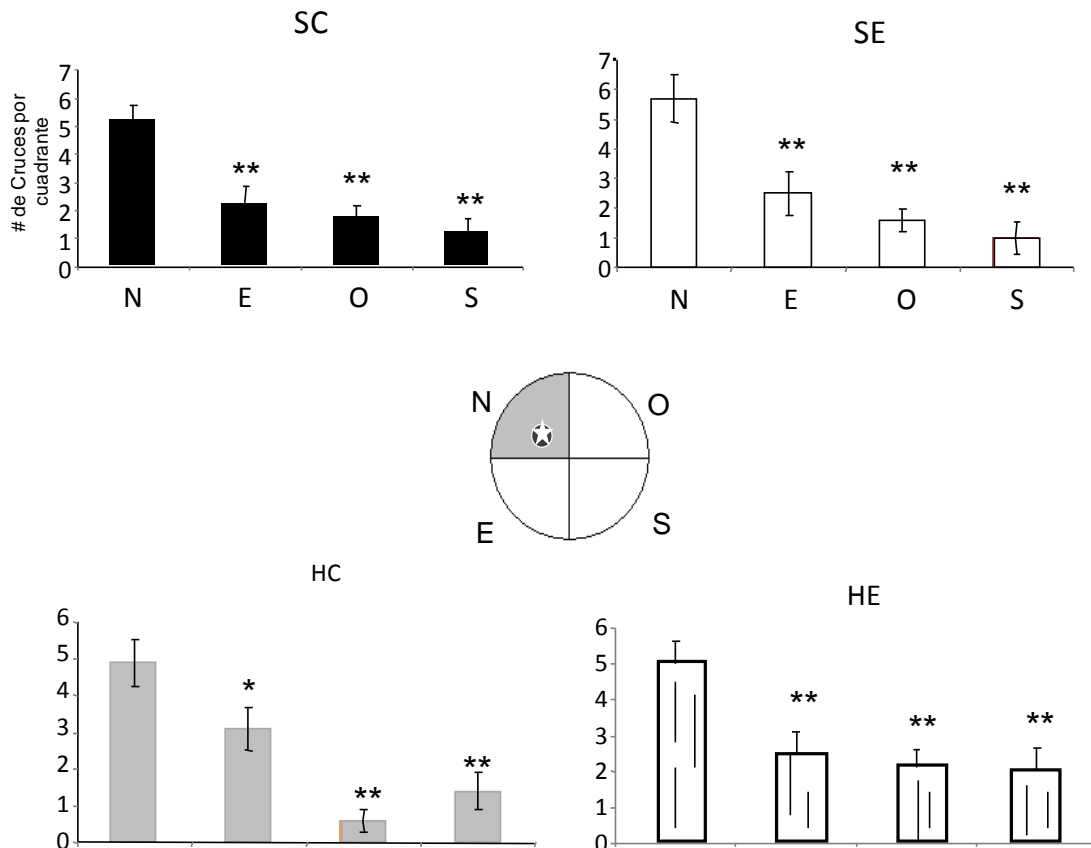


Figura: 6. Permanencia en el cuadrante (Norte), donde originalmente estuvo la plataforma durante el entrenamiento en el laberinto acuático de morris. Prueba de transferencia (número de cruces) SC (n=7), HC (n=8), SE N=9, HE (n=6) (Prom \pm s. e. m **p<0.01, *p<0.05)

B) Reconocimiento de objetos

Se evaluó el tiempo en segundos que emplea cada rata en explorar dos objetos [F(1,12) = 1.90, p = 0.193]. El primer día se les presentaron dos objetos desconocidos (Nuevo y Nuevo) y el segundo día nuevamente se les presentaron dos objetos,

uno ya conocido por los animales y el otro novedoso. El grupo de animales SC empleó en el primer día un tiempo similar en la exploración de ambos objetos desconocidos, mientras que en el segundo día el tiempo que emplearon para explorar el objeto conocido fue significativamente menor [$F(12,13) = 5.165$, $P = 0.0422$] que con el objeto nuevo. En contraste el grupo HC, empleo un tiempo similar al grupo Sham en la exploración inicial de los objetos 1 y 2, y al segundo día empleó aproximadamente una cantidad de tiempo similar en la exploración tanto del objeto conocido como del objeto novedoso $p = 0.3885$. En el grupo SE el primer día no hubo diferencias significativas en la exploración de los objetos, mientras que tampoco mostraron diferencias en la exploración del día 2 $p=0.3341$, el grupo HE no mostro diferencias en la exploración de los objetos en ninguno de los 2 días. Esto sugiere que la Hiperprolactinemia provoca una alteración en la memorización y reconocimiento de objetos novedosos, la cual depende del giro dentado del hipocampo. También con estos resultados se sugiere que el estrés en esta área del hipocampo parece tener un efecto dañino, ya que se muestra una alteración en el patrón de conducta normal de los animales (Fig. 7).

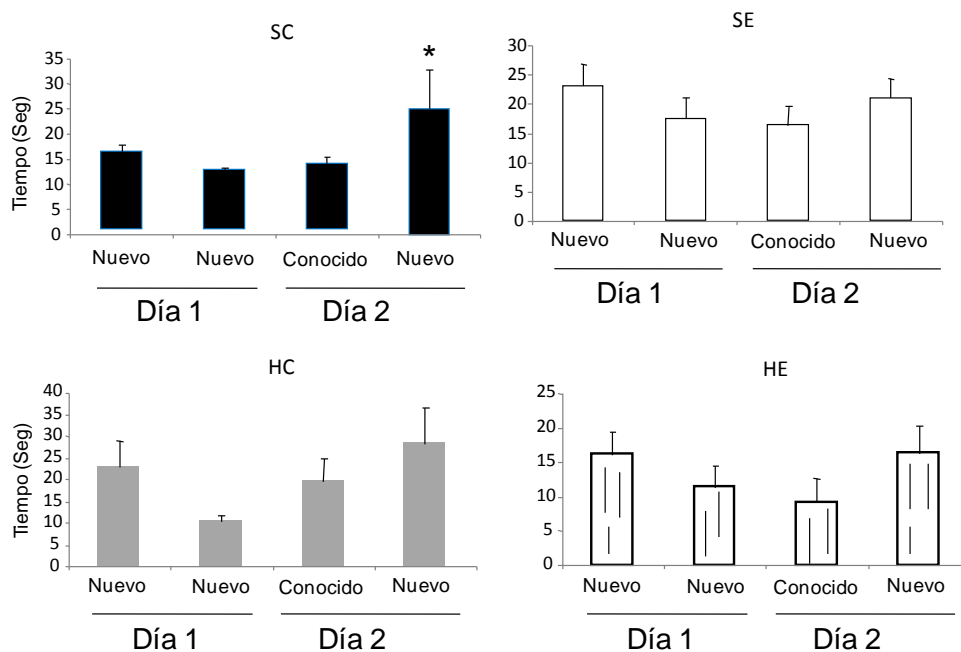


Figura 7: Parámetros conductuales en la prueba de reconocimiento de objetos de los grupos SC(n=7), HC(n=8), SE(n=9), HE(n=6). Tiempo que los animales invierten explorando el objeto novedoso con respecto al objeto conocido (Pom \pm s.e.m *p<0.05)

C) Laberinto en cruz

Se determinó el estado de ansiedad de todos los grupos de animales sometiéndolos a la prueba de laberinto elevado en cruz. En esta prueba se evalúan cuatro parámetros: porcentaje de entradas al brazo abierto con respecto al total, porcentaje de tiempo que las ratas permanecen en el brazo abierto con respecto al total, el número de entradas completas al brazo abierto y el número de entradas al brazo cerrado como índice de locomoción. Por convención se considera que evaluar estos parámetros en términos de porcentaje permite disminuir la variación dependiente del individuo y distinguir las variaciones dependientes al tratamiento. En esta prueba se observó el porcentaje de entradas

al brazo abierto en donde no hubo diferencia estadísticamente significativa, sin embargo se observó tendencia del grupo SE ($p=0.09$) comparado con su control SC a un mayor porcentaje de entradas al brazo abierto, no se apreciaron diferencias significativas en su grado de ansiedad. Sin embargo, el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos de la cruz mostró una tendencia por parte del grupo HC ($p=0.064$) a explorar más tiempo en los brazos abiertos del laberinto (Fig. 8), también el grupo HC [$F(1,25) = 6.12, p= 0.0204$] mostró estadísticamente mayor número de entradas a los brazos abiertos lo que sugiere que podrían ser menos ansiosos. Por otra parte se observó un aumento significativo en la locomoción de los animales HC y HE, reflejado en un aumento del número de entradas al brazo cerrado ($p<0.05$).

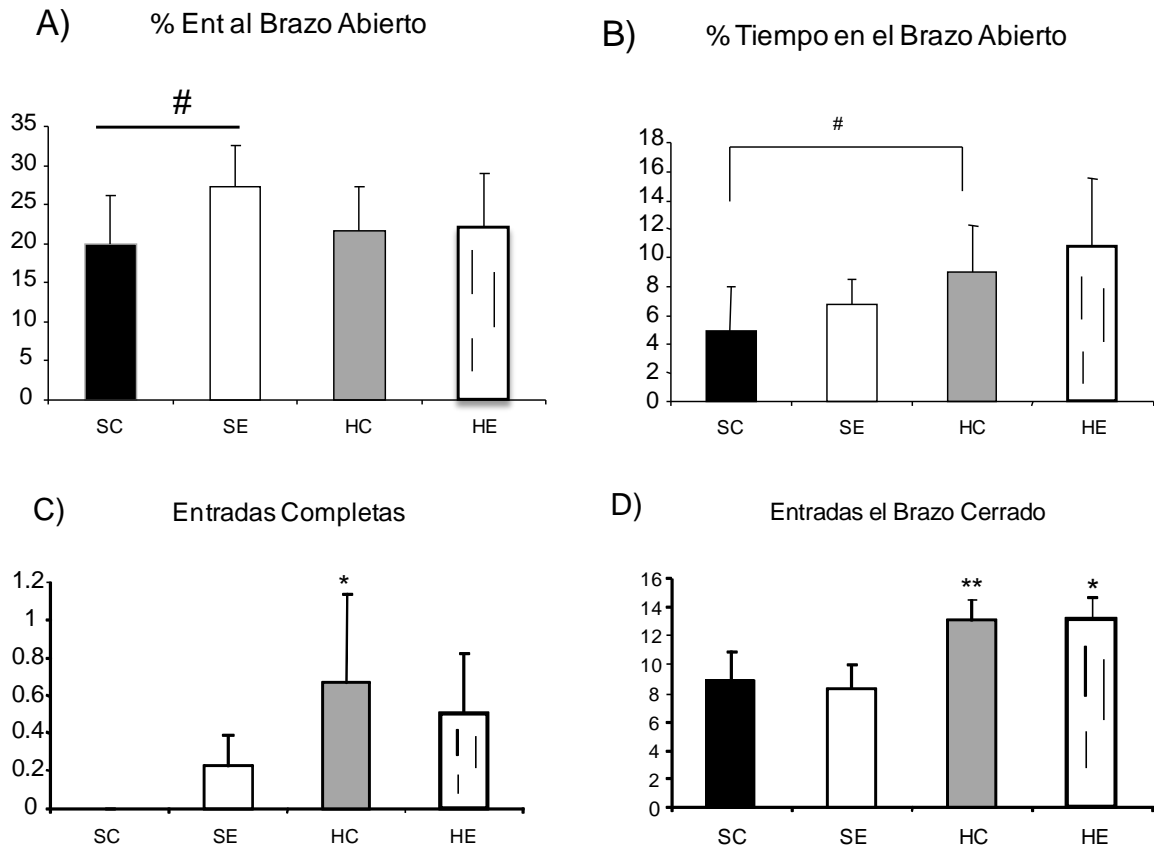


Figura 8: Graficas que muestran el comportamiento de los animales SC(n=7), SE(n=9), HC(n=6), HE(n=4) en el laberinto elevado en cruz. A) Porcentaje de entradas al brazo abierto. B) Porcentaje tiempo que permanecen en el brazo abierto. C) Entradas completas. D) Entradas al brazo cerrado. (Pom.± s. e.m** p<0.01, p*<0.05).

D

En esta prueba conductual se evaluó el estado de ansiedad de todos los grupos, en donde no hubieron diferencias estadísticas significativas en el número de cruces en la zona externa, tampoco en el tiempo en el centro. El grupo SE mostro significativamente mayor número de cruces al centro y el grupo SC mayor latencia a ir al centro. Estos resultados lo que nos indican es que los animales estresados tienen mayor exploración o menor estado de ansiedad que su control y esto parece demostrar más que fueron menos ansiosos, aunque mas bien parece ser

que tuvieron una mayor manipulación y por lo tanto se habituaron a tal manipulación.

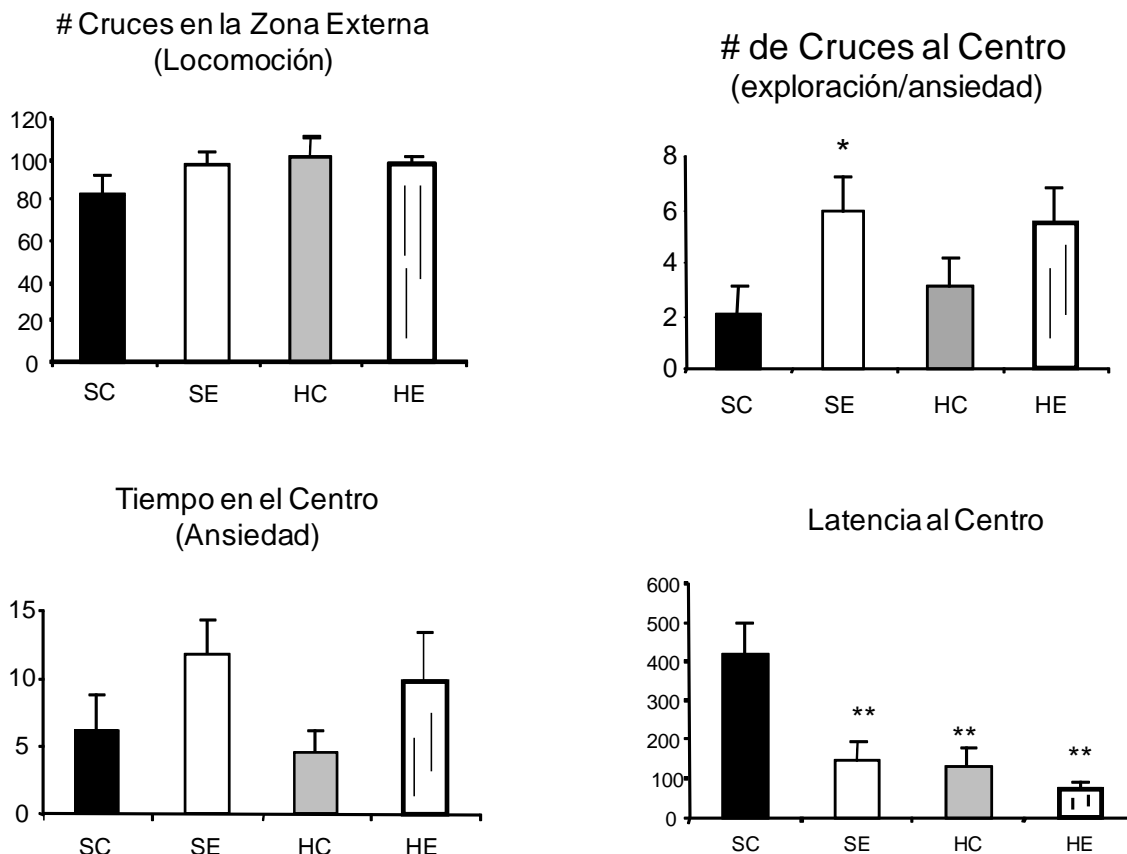


Figura 9: Graficas que muestran el estado de ansiedad de los animales SC(n=7), HC(n=8), SE(n=9), HE(n=6)(Prom.± s.e.m *p<0.05,**p<0.01).

VIII. DISCUSIÓN

Uno de los objetivos del presente proyecto fue desarrollar un modelo de estrés crónico y evaluar el efecto que tiene el estrés sobre la conducta de aprendizaje dependiente de hipocampo ya que se ha observado que la exposición crónica a estresores, o la administración prolongada de GCs reduce la generación de nuevas neuronas en giro dentado del hipocampo y modula la densidad de espinas sinápticas en la región CA1 del hipocampo, y causan una atrofia de las dendritas

apicales de la región CA3 (Wolf OT, 2003). Por otra parte, el objetivo principal fue investigar si la prolactina (PRL) protege al hipocampo de los efectos negativos de la exposición crónica al estrés, ya que se sabe que esta hormona tiene receptores en estructuras límbicas como el hipocampo (Crume rolle- Arias y cols., 1993; Bakowska y Morrell 1997; Chiu y Wise 1994; Torner y cols., 2009). Más aun, se ha visto la activación de genes como el ARNm de C-fos en zonas del hipocampo dorsal CA3 y giro dentado por exposición al estrés, y la administración de PRL disminuye tal activación de estas áreas y en hipocampo ventral disminuye la activación en CA1 con la administración de PRL y con el estrés-PRL se activa todas las áreas del hipocampo ventral (Donner et al, 2007). En nuestro laboratorio encontramos que en concentraciones elevadas de PRL mejora el aprendizaje dependiente de la área CA1 de hipocampo, y por otro lado altera de forma negativa el reconocimiento de objetos dependiente del área CA3 del hipocampo en condiciones sin estrés (Tinajero E, Lajud N, Olvera-Cortes ME y Torner L, 2008). En nuestros resultados el estrés por inmovilización al que sometimos a nuestros grupos de animales Sham estrés (SE) tanto como hiperprolactinémicos estresados (HE) presentaron hiperplasia en las suprarrenales lo indica que los animales estaban realmente estresados ya que es una medida que se utiliza para demostrar la condición de estrés, sin embargo en las pruebas conductuales no parece que las ratas sometidas a estrés por inmovilización tengan niveles elevados de ansiedad, por lo que suponemos que como estuvieron sometidas a manipulación diaria estos animales se habituaron a dicha manipulación. En las pruebas de aprendizaje de tipo espacial el estrés no parece tener efecto adverso en distancias, latencias y prueba de transferencia (memoria), por lo que suponemos que este tipo de estrés en particular no causa daño en este tipo de aprendizaje que depende de estas estructuras CA1 y CA3, o al parecer estas estructuras son menos vulnerables a este tipo de estrés, ya que se ha demostrado que dependiendo del tipo de estresores causa daño o no lo causan, así como en diferentes pruebas conductuales por los distintos sistemas de memoria que

existen, y también mencionan las diferencias por sexo en algunos casos las hembras son mas resistentes que los machos en algunos casos no lo son (Shors TJ, 2009). Mientras que en la prueba de conducta en el reconocimiento de objetos que depende del giro dentado y el área CA3 del hipocampo ahí el estrés si parece estar causando daño en el reconocimiento de un objeto nuevo y la PRL también causa daño en este tipo de prueba y esto confirma lo que ya antes habíamos encontrado, el efecto dañino por parte de PRL en el reconocimiento de un objeto nuevo. Los antecedentes que demuestran que la PRL modifica el estado de activación de estas zonas nosotros vimos el efecto que tiene sobre la conducta de aprendizaje mediante la manipulación de los niveles de dicha hormona en la circulación sanguínea como participaba en la modulación en estado de estrés crónico sobre la conducta de aprendizaje. Una forma de elevar las concentraciones de PRL, se utilizaron animales a los que se les hizo un implante de hipófisis anterior a la capsula renal. Ya que este modelo de hiperprolactinemia se encuentra ampliamente caracterizado (Adler, 1986), no consideramos necesario evaluar la sobrevivencia del implante en la capsula renal. En condiciones normales las ratas macho tienen concentraciones pequeñas de PRL en suero (Rillema JA,1987) razón por la cual consideramos que la evaluación de las concentraciones de PRL en suero mediante la técnica de ELISA se puede considerar como un buen referente de la sobrevivencia del implante; ya que solamente aquellos animales en los que el implante fue exitoso tendrán concentraciones elevadas de PRL (más de 3 veces por arriba del control). También como otro medida para observar la condición de estrés observamos las suprarrenales de los animales al final del experimento cuando sacrificamos a los animales para observar la sobrevivencia y observamos una mayor vascularización donde colocamos la hipófisis anterior. Así como también pesamos los timos por que se ha reportado que tanto en suprarrenales hay hiperplasia, en los timos hay hipoplasia, nosotros solo observamos hiperplasia en las suprarrenales. Por lo que podemos sugerir que los animales presentaban estrés crónico.

Por otro lado el implante de hipófisis anterior a la capsula renal es un modelo experimental que nos permite mantener elevadas las concentraciones de PRL de manera crónica sin tener que someter al animal a manipulaciones o inyecciones diarias que causarían un aumento en la respuesta al estrés que afectaría el desempeño en las pruebas de conducta. (Dalm y cols. 2008). Nuestros resultados muestran un efecto de la (PRL) sobre el aprendizaje espacial dependiente de hipocampo. La inducción de Hiperprolactinemia efectivamente provocó un aumento en la concentración de PRL en el suero de los animales implantados y aparentemente también en su compartimiento cerebral, ya que esta hormona se sabe que ingresa mediante transporte activo al cerebro vía sus propios receptores (Walsh y cols.,1987). Observamos que los animales Hiperprolactinémicos presentaron una mayor rapidez para aprender la tarea de navegación espacial que los animales control o Sham sin embargo, al ser confrontados para discriminar entre un objeto conocido y un objeto nuevo, los animales Hiperprolactinémicos tanto estresados como control resultan poco eficientes.

Asimismo, aunque no se apreciaron diferencias significativas en el estado de ansiedad entre los grupos de ratas, si se observó una tendencia hacia un menor estado de ansiedad en el grupo de ratas Hiperprolactinémicos, indicado por el porcentaje de tiempo que pasan estos animales explorando los brazos abiertos en el laberinto y una diferencia significativa a tener mayor número de entradas al brazo abierto ($p=0.0204$), mientras que los grupos estresados también parecen ser menos ansiosos pensamos que es mas por la manipulación que recibieron diaria durante el periodo de estrés, sin embargo en la prueba de reconocimiento de objetos que depende de la entrada de información de giro dentado hacia CA3 que se basa en el recuerdo de información (Kumaran D and A. Maguire E A, 2007) en

esta prueba si observamos el daño causado por el estrés. A la fecha existen muy pocos reportes de los efectos de PRL sobre la conducta cognoscitiva. Estudios previos con ratones transgénicos o knockout para el receptor de PRL, los cuales fueron evaluados utilizando el laberinto acuático de morris, no fueron capaces de encontrar diferencias en el aprendizaje de los ratones ya fueran heterocigotos u homocigotos (Goffin y cols, 1999). Estos estudios prácticamente descartaron el que la PRL tuviera algún efecto sobre el aprendizaje de tipo espacial el cual es dependiente de hipocampo. Sin embargo, se ha hipotetizado que en los animales transgénicos pueden ocurrir una serie de compensaciones fisiológicas que pudieran enmascarar el efecto de la carencia de un metabolito dado. Estas compensaciones fisiológicas no suceden de manera tan drástica en el modelo del transplante de hipófisis a la capsula renal, lo que explicaría la discrepancia entre los resultados reportados en los ratones transgénicos o knockout y los nuestros. Recientemente se observo que la administración intracerebroventricular (icv) de prolactina (PRL) en forma crónica altera los procesos de activación en zonas específicas del hipocampo, (Doner y cols., 2007) tanto bajo condiciones basales como en condiciones de estrés. Además existen algunos reportes que muestran la presencia de receptores específicos para PRL en el hipocampo mediante técnicas de inmunocitoquímica (Rocky y cols., 1994: Mustafa y cols .,1994), y western blot (L Torner, comunicación personal), Nuestros resultados de la misma manera que reportes previos (Alvarez y Banzan, 1994). Sugieren que la PRL ejerce una acción directa en el hipocampo. Alvarez y Banzan demostraron que la aplicación directa de la hormona en el hipocampo ventral de la rata evoca una alteración en la actividad exploratoria del animal y un aumento en su conducta de escape durante el nado forzado, apoyando esta teoría en este trabajo se demostró que el aumento sistémico de PRL también puede ejercer un efecto directo sobre el hipocampo. Tanto los resultados de estos autores como los de este proyecto nos indican que el hipocampo efectivamente parece ser otro órgano blanco de PRL, ya que las ratas Hiperprolactinémicas presentaron alteraciones en el desempeño de tareas

que tienen relación con esta estructura. Por ejemplo en el laberinto acuático de morris los animales Hiperprolactinémicos mostraron un mejor desempeño para encontrar la plataforma en menos días que los animales control. Estos resultados sugieren que la PRL parece tener una acción directa sobre las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, o al menos interaccionar con estructuras cerebrales que envíen sus aferentes a estas regiones hipocampales.

Por otro lado, la presencia de niveles altos de PRL parece inhibir la capacidad de la rata para discriminar entre un objeto conocido y uno nuevo, si bien a la vez aumenta el tiempo de exploración de los objetos. La prueba del reconocimiento de objetos involucra la participación del giro dentado durante el desempeño de la tarea, por lo que esta hormona podría tener efectos como neuropéptido directamente en el giro dentado o bien, actuar de forma indirecta a través de otras áreas relacionadas.

Si bien algunos estudios han mostrado la presencia de los receptores de PRL en el hipocampo (Rocky y cols., 1994; Mustafa y cols., 1994), no se ha descrito en forma precisa su localización exacta en las distintas regiones hipocampales e incluso recientemente otro grupo cuestiono la expresión de dichos receptores (Mak y cols., 2007). Por ello al presente desconocemos si la PRL pudiera ejercer sus acciones de forma directa en las distintas regiones hipocampales o bien, actuar de forma indirecta sobre alguna otra estructura cerebral. Se requieren más estudios al respecto para esclarecer esta pregunta.

Nuestros estudios mostraron diferencias significativas en el nivel de ansiedad de las ratas SE pareciendo ser menos ansiosas con mayor número de entradas al brazo abierto en laberinto en cruz, y mayor número de cruces al centro, y mostrnado tendencia a un mayor tiempo en el centro tanto los HE como los SE. Así como también las ratas Hiperprolactinémicas a ser menos ansiosas. Esto se esperaba porque en estudios anteriores habían demostrado que la PRL tiene un efecto ansiolítico en ratas hembras y macho (Torner y cols, 2001; Doner y cols., 2007). Nuestro análisis mostró sin embargo que las ratas Hiperprolactinémicos

exploraban durante más tiempo los brazos abiertos, y diferencia significativamente mayor en número de entradas a los brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz lo que sugiere a ser menos ansiosos. Además de que prolactina causa una mayor locomoción. La tendencia podría tener significancia estadística con una (n) mayor de animales. Así mismo la prolactina no parece tener efecto sobre el estrés pero en perspectiva de este trabajo podríamos ver como se modifica la estructura para que la conducta de aprendizaje se manifieste y por otro lado podríamos probar otro tipo de estresor más potente como es el estrés psicosocial para ver si causa daño en el aprendizaje de tipo espacial modificando la estructura neural implicada.

IX. CONCLUSIÓN

La disminución significativa de la distancia y de la latencia recorrida por las ratas hiperprolactinémicas con respecto al control, en el laberinto acuático de morris indica que la prolactina (PRL) ejerce un efecto facilitatorio sobre el aprendizaje dependiente de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. En cuanto a la exposición crónica al estrés, este procedimiento no parece causar daño sobre la prueba que evalúa el aprendizaje de tipo espacial por el contrario los animales estresados parecen ser favorecidos ya que mejoran su desempeño en este laberinto.

Los resultados obtenidos en la prueba de reconocimiento de objetos muestran que la PRL ejerce un efecto inhibitorio sobre el aprendizaje dependiente de giro dentado. En este caso los animales Sham estresados presentaron un deterioro del aprendizaje, ya que fallaron en efectuar el reconocimiento de un objeto nuevo.

Si bien en las pruebas de ansiedad los grupos de animales estresados parecen mostrar una disminución en sus niveles de ansiedad, esto pudiera ser

consecuencia de la manipulación realizada diariamente al estresar a los animales. No obstante, si se observó el efecto de la exposición a estrés crónico en las pruebas conductuales para giro dentado y en la hiperplasia observada en las suprarrenales.

Recientemente se ha empezado a investigar el papel de las hormonas maternas en la mediación de los cambios observados en el aprendizaje espacial y la memoria asociados a la maternidad. Buckwalter y cols., (2001) encontraron que a 2 años post parto, existe una mejora en las habilidades cognitivas comparadas con etapas avanzadas del embarazo y el periodo post parto temprano, sugiriendo que la maternidad tenía efectos de mejoría sobre la cognición. Asimismo, aproximadamente 75% de las mujeres reportan pérdida transitoria de memoria de corto plazo, olvidos, desorientación, confusión, falta de concentración o dificultades para leer durante la etapa tardía del embarazo y el periodo inmediatamente posterior al parto (Crawley et al., 2003).

Hallazgos similares se han encontrado en modelos animales: el embarazo se asocia con deterioro de la memoria espacial tanto en primates como en roedores (Buckwalter y cols., 1999, Galea y cols., 2000), mientras que la maternidad se asocia con un aumento de la memoria espacial en roedores (Kinsley y cols., 1999).

Kinsley y cols., (1999) reportaron que la maternidad mejora el aprendizaje espacial y la memoria en la rata, ya que sus tiempos de latencia fueron mas cortos comparados con ratas control en una versión seca del laberinto acuatico.

Tomizawa y cols., (2003) mostraron que la oxitocina es importante para la facilitación de la memoria de referencia, pero no para la memoria de trabajo. Dado que la prolactina es otra de las hormonas maternas, ya que aumenta durante el embarazo y su concentración es alta durante la lactancia, nuestros resultados sugieren en este contexto que la prolactina podría participar en los cambios de aprendizaje espacial y memoria que ocurren durante esta etapa fisiológica.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Adler, RA. (1986). The anterior pituitary-grafted rat: a valid model of chronic hiperprolactinemia. *Endocr Rev.* **3**, 302-13.
- Alvarez EO, Banzan AM, (1994) Behavioral actions of Prolactin locally applied into the hipocampus of adult female rats. *J Neural Transm.* **95**, 17-28.
- Bakowska JC, and Morrell, JI. (1997) Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *J Comp Neurol.* **386**, 161-177.
- Baulieu EE, Kelly PA, (1990) Hormones, from molecules to disease I. Hermann. Publishers in arts and science. **90**, 135
- Baulieu, EE, Kelly PA, (1990) Hormones, from molecules to disease I. Hermann. Publishers in arts and science. **90**, 1358
- Bern HA, and Nicoll, CA. (1968) The comparative endocrinology of prolactin. *Rec Prog Horm Res.* **24**, 681-720.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* **19**, 225-268,
- Bole-Feysot, C, Goffin, V, Edery, M, Binart, N, and Kelly, PA. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and

phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* **19**, 225-268.

- Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S (1989). The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci*; **48**,26-69.
- Brezun JM and Daszuta A.(1999). *Neuroscience* 89: 999–1002.
- Bridges RS, DiBiase, R, Loundes, DD, and Doherty, PC. (1985) Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science* **227**, 782-784.
- Bridges RS, Numan, M, Ronsheim, PM, Mann, PE, and Lupini, CE. (1990) Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci. USA* **87**, 8003-8007.
- Cameron HA and Gould E (1994). *Neuroscience* 61: 203–209.
- Chiu S, and Wise, PM. (1994) Prolactin receptor mRNA localization in the hypothalamus by in situ hybridization. *J Neuroendocrinol.* **6**,191-199.
- Chrousos, G. P. (2009). "Stress and disorders of the stress system." *Nat Rev Endocrinol* **5** (7): 374-81.
- Clapp C, Torner, L, Gutierrez-Ospina, G, Alcantara, E, Lopez-Gomez, FJ, Nagano, M, Kelly, PA, Mejia, S, Morales, MA, and Martinez de la Escalera, G. (1994) The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **91**, 10384-10388.
- Clapp C, Torner, L, Gutierrez-Ospina, G, Alcantara, E, Lopez-Gomez, FJ, Nagano, M, Kelly, PA, Mejia, S, Morales, MA, and Martinez de la Escalera, G. (1994) The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **91**, 10384-10388.
- Cooke N. E., Coit D., Weiner R. I., Baxter J. D., Martial J.A., Kelly P.A (1980) Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger.

J Biol. Chem. **25**,:6502-6510

- Crumeyrolle-Arias M, Latouche, J, Jammes, H, Djiane, J, Kelly, PA, Reymond, HJ, and Haour, F. (1993) Prolactin receptors in the rat hypothalamus: Autoradiographic localization and characterization. *Neuroendocrinology* **57**, 457-466.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, and Fuchs E (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**,12796–12801.
- D'Esposito M (2008) Working Memory. Handbook of clinical neurology, 88,237-247.
- Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N (1987): Regulation of ACTH secretion: Variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res* **43**,113–173.
- Dalm S, Brinks V, van der Mark MH, de Kloet ER, Oitzl MS (2008). Non-invasive stress-free application of glucocorticoid ligands in mice. *May* **15**, 170(1): 77-84.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels MJ (1998): Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Rev* **19**,269 –301.
- Djohar N, Koehl M, Le Moal M. *Physiol Rev* 85: 523–569, 2005;
- Donner N, Bredewold R, Maloumby R, Neumann ID (2007). Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur J Neurosci* 25(6):1804-1814.
- Donner N, Bredewold R, Maloumby R, Neumann ID (2007). Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur J Neurosci* 25(6):1804-1814.
- Drago F, and Lissandrello, CO. (2000) The “low-dose” concept and the paradoxical effects of prolactin on grooming and sexual behaviour. *Eur J Pharm.* **405**, 131-137.

- Drago F, Bohus B, Bitetti R, Scapagnini U, van Ree JM, de Wied D (1986) Intracerebroventricular injection of anti-prolactin serum suppresses excessive grooming of pituitary homografted rats. *Behav Neural Biol.* Jul;46(1):99-105.
- Drago F, Bohus B, Bitetti R, Scapagnini U, van Ree JM, de Wied D. Intracerebroventricular injection of anti-prolactin serum suppresses excessive grooming of pituitary homografted rats. *Behav Neural Biol.* 1986 Jul;46(1):99-105.
- Emanuele NV, Jurgens, JK, Halloran, MM, Tentler, JJ, Lawrence, AM, and Kelley, MR. (1992) The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol Endocrinol.* **6**, 35-42.
- Foreman N, Stevens R. (1987). Relation ships between the superior colliculus and hippocampus : neural and behavioural considerations. *Behav Brain Sci* **10**:101-52.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G (2000) Prolactin:Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews* **80**: 1523-1631.
- Freeman ME, Kanyicska, B, Lerant, A, and Nagy, G. (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* **80**, 1523-1631.
- Fuxe K, Hökfelt, T, Eneroth, P, Gustafsson, JA, and Skett, P. (1977) Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science* **196**, 899-900.
- Goffin V, Binart, N, Clement- Lacroix P, Bouchard, B, Bole- Feysot, C. (1999) From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **15**, 189-201.
- Hansen BL., Hansen, GN, and Hagen, C. (1982) Immunoreactive material resembling ovine prolactin in perikarya and nerve terminals of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.* **226**, 121-131.

- Harlan RE, Shivers, BD, Fox, SR, Kaplove, KA, Schachter, BS, and Pfaff DW. (1989) Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Neuroendocrinology* **49**, 7-22.
- Keller-Wood ME, Dallman MF (1984): Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5:1–23.
- Kempermann G, Kuhn HG, and Gage FH (1997). *Nature* 386: 493–495.
- Kumaran, D., & Maguire, E. A. (2007). Which Computational Mechanisms Operate in the Hippocampus During Novelty Detection. *Hippocampus*, 00-00.

- Levine S, Ursin H (1991): What is stress? In: Brown MR, Koob GF, and Rivier C, editors. *Stress, Neurobiology and Neuroendocrinology*. New York: Marcel Dekker: pp 1–21.
- Li HY, Ericsson A, Sawchenko PE (1996): Distinct mechanisms
- López JF, Akil H, and Watson SJ (1999) Role of Biological and Psychological Factors in Early Development and Theirs Impact on Adult Life. Falta revista y mas.....
- Lucas BK, Ormandy, CJ, Binart, N, Bridges, RS, and Kelly, PA. (1998) Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* **139**, 4102-4107.
- Mak GK, Enwere EK, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I, Weiss S. (2007) Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci.* **10(8):1003-11**.
- Mangurian L. P, Jusjus A.R, Walsh R.J (1999) Prolactin receptor localization to the area postrema. *Brain Res* **836:218-220**.
- Morgado I (2005) *Psicobiología del Aprendizaje y la Memoria: Fundamentos y Avances Recientes*. *Rev Neurol* 40 (5): 289-297.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O' Keefe J. (1982);. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297:681-3**.

- Mustafa A, Nyberg F, Bogdanovic N, Islam A, Roos P, Adem A (1994) Somatogenic and lactogenic binding sites in rat brain and liver: quantitative autoradiographic localization. *Neurosci Res* **20**:257-263.
- Mustafa A, Nyberg F, Bogdanovic N, Islam A, Roos P, Adem A (1994) Somatogenic and lactogenic binding sites in rat brain and liver: quantitative autoradiographic localization. *Neurosci Res* **20**:257-263.
- Noel MB, and Woodside, B. (1993) Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats. *Physiol. Behav.* **54**, 151-154.
- Nogami H, Hoshino R, Ogasawara K, Miyamoto S, Hisano S. (2007) Region-specific expression and hormonal regulation of the first exon variants of rat prolactin receptor mRNA in rat brain and anterior pituitary gland.
- O'Keefe J, Nadel L, Keightly S, Kill D. (1975) Fornix lesions selectively abolish place learning in the rat. *Exp Neurol*; **48**: 152-66.
- O'Keefe J, Speakman A. (1987) Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Exp Brain Res*; 68: 1-27.22.
- Olton DS, papas BS. (1979); Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychología* **17**:669-82.
- Ormerod BK, Lee TT, and Galea LA. (2003). *J Neurobiol*55: 247–260.
- Parlow A. F., Shome B. (1976) Rat prolactin: the intire linear aminoacid sequence. *Fed. Proc.* **35**:219
- Paut-Pagano, L, Roky, R, Valatx, J, Kitahama, K, and Jouvét, M. (1993) Anatomical distribution of prolactin-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroendocrinology* **58**, 682-695.
- Reul JM, de Kloet ER (1985): Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* **117**:2505–2511.

- Roky R, Valatx, JL, Paut-Pagano, L, and Jouvet, M. (1994) Hypothalamic injection of prolactin or its antibody alters the rat sleep-wake cycle. *Physiol. Behav.* **55**, 1015-1019.
- Roky R, Valatx, JL, Paut-Pagano, L, and Jouvet, M. (1994) Hypothalamic injection of prolactin or its antibody alters the rat sleep-wake cycle. *Physiol. Behav.* **55**, 1015-1019.
- Roky, R, Valatx, JL, Paut-Pagano, L, and Jouvet, M. (1994) Hypothalamic injection of prolactin or its antibody alters the rat sleep-wake cycle. *Physiol. Behav.* **55**, 1015-1019.
- Scoville, WB and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20(1),11-21.
- Shiu RP, Kelly PA, and Friesen HG.(1980) Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones. *Science* 180(89):968-71.
- Shiu, RP, Kelly, PA, and Friesen, HG. (1980) Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones. *Science* 180(89):968-71.
- Shors TJ, (2009) Learning during Stressful Times. *Learning and memory* 11,137-144.
- Squire LR. (1987) *Memory and brain*. New York: Oxford University.
- Torner L, Toschi, N, Nava, G, Clapp, C, and Neumann, ID. (2002). Increased hypothalamic expression in lactation: involvement in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 1381-1389.
- Torner L, Toschi, N, Pohlinger, A, Landgraf, R, and Neumann, ID. (2001) Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J. Neurosci.* 21, 3207-3214.
- Walsh RJ, Slaby FJ, and Posner, BI. (1987) A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120, 1846-1850.

- Wolf OT. HPA axis and memory (2003). Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism. 17:287-299.